

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCAR-  
UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE  
JABOTICABAL - UNESP  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL**

**INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO REDUZ  
TERMOGÊNESE DURANTE A INFLAMAÇÃO SISTÊMICA  
INDUZIDA POR LPS EM PINTAINHOS**

Valter Dantonio Junior

Jaboticabal 2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCAR-  
UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE  
JABOTICABAL - UNESP  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL**

**INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO REDUZ  
TERMOGÊNESE DURANTE A INFLAMAÇÃO SISTÊMICA  
INDUZIDA POR LPS EM PINTAINHOS**

Valter Dantonio Junior

Dissertação apresentada ao Programa  
Interinstitucional de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas, para obtenção do  
título de MESTRE EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS.

*Orientação: Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego*  
Agências Financiadoras: FAPESP e CNPq

Jaboticabal 2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

D194is Dantonio Junior, Valter.  
Inibição da síntese de óxido nítrico reduz termogênese durante a inflamação sistêmica induzida por LPS em pintainhos / Valter Dantonio Junior. -- São Carlos : UFSCar, 2014.  
49 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Fisiologia. 2. LPS. 3. Temperatura corporal. 4. *L-NAME*. 5. Pintainhos. 6. Consumo de oxigênio. I. Título.

CDD: 612 (20<sup>a</sup>)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Valter Dantonio Junior

Dia 29/08/2014

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kênia Cardoso Bicego.....

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Camila Almeida.....

Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco.....

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego, que há 6 anos me orienta, sempre com muita dedicação. Em quem tenho não apenas o respeito, mas também a admiração profissional, como professora e pesquisadora. Por participar de forma ativa na pesquisa e no crescimento científico de seus orientados.

À Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão, por estar presente também há 6 anos no meu desenvolvimento científico. Por ser sempre muito solícita quando necessitamos de alguma ajuda, tanto científica quanto pessoal. Por auxiliar no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza e à Profa. Dra. Maria Célia Portella, que há um ano os acompanho com técnico. Por serem muito compreensíveis e solícitos.

Ao Euclides pela auxílio prático no projeto. Sempre auxiliando na aquisição e manutenção dos animais, além da amizade em todos esses anos.

À Damaris, por sempre se mostrar muito solícita e pelo seu bom humor que contagia no departamento.

Ao Renato e o Rodrigo, responsáveis do setor de transportes da FCAV-UNESP, pela disposição e liberação dos carros para aquisição dos pintainhos.

Ao Wagner e à Clara, secretários do departamento de Fisiologia, sempre muito solícitos, principalmente nas requisições.

À todos os docentes e funcionários do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, pela convivência no dia a dia esses anos.

Aos meus pais, Felícia Conceição Furini e Valter Dantonio, pelo apoio e incentivo em todas as escolhas da minha vida. Por serem presentes e amigos. Minha base, referência, meu chão. Obrigado pela educação, carinho e amor incondicional. À minha irmã, Cássia, por estar sempre me apoiando e torcendo pelo meu sucesso, além do seu carinho de irmã, sei que sempre posso contar. À minha Avó, Ana, que apesar dos problemas da idade sempre se preocupa comigo e sei que deseja meu bem.

À minha companheira Carolina Alves, que além de namorada se tornou minha melhor amiga. Por todo apoio nesses anos, seja no mestrado ou em qualquer decisão da minha vida. Por estar sempre ao meu lado, nas horas boas e ruins. Pela família maravilhosa que me acolheu como filho, neto, sobrinho e tio. Pela dedicação em me fazer o homem mais feliz a cada dia que passa.

Aos meus queridos amigos de Ribeirão Preto, da família Villa D'Talia, Leandro Gobbi, Leandro Schiavinatto, Bruno, Juninho, Zaíra, Ana, Carol, Lays, que sempre me incentivaram na minha profissão e carreira científica, como em outras decisões importantes na minha vida. Que mesmo sem entender muitas vezes meus projetos e ficando perplexos por me ver trabalhar com lagartos e pintainhos, nunca deixaram de apoiar, se interessar e fazer piadas também. Por todos os anos de amizade sincera e verdadeira, são amigos para toda a vida.

Aos meus outros amigos de Ribeirão Preto, Mariana e Anna Lígia, que apesar da distância, sempre mantivemos uma amizade verdadeira. A Ana Paula Nogueira, pela amizade, alegria e carinho.

Aos meus queridos amigos e irmãos, da família Chernobio, Adriano, Igor, Rodrigo e André Felipe, por todos esses anos de cumplicidade, parceria, apoio, convivência, ajuda científica e em todos aspectos, bom humor e amizade sincera. Que se tornaram mais que amigos, mas

verdadeiros irmãos. À Thais e Mariana, agregadas especiais que são muito queridas em nossa casa. A Vanirda, por manter a casa em ordem, pelo carinho e amizade. E aos eternos agregados Danilo, Marcelo, Nathan, pela parceria. Em especial à Tavani, que se tornou uma irmã pra mim, em vários aspectos, por quem tenho muito carinho e admiração. Ao casal Douglas e Gabriela, pela convivência e sempre estarem bem próximos à família Chernobio.

Aos todos os companheiros da 6º Turma de Ciências Biológicas da UNESP-Jaboticabal (nossa Bio07). Por toda a experiência acadêmica juntos, união, cumplicidade.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia, Elisa, Vivian, Danúzia, Luis Gustavo, Luana, Débora, Danúzia, Camila, Carolina Scarpellini, Caroline Silva, Vítor, Bruno, Gabriela, Lara, Lucas, Aretuza, Lays, Baiana, Jolene, Tiago. Agradecimento especial à Danuzia e Elisa pela companhia desde o início do mestrado, em praticamente todas as disciplinas e viagens para Araraquara e São Carlos, sempre com muita cumplicidade e bom humor. À Carolina Scarpellini por estar sempre disposta a ajudar, principalmente na parte da informática, e pela amizade nesses anos. A Vivian, Débora, Camila, Aretuza, que estão a mais tempo no laboratório, e sempre foram muito solícitas e tem meu respeito e admiração profissional. Ao Bruno pelo auxílio em quase todos os protocolos experimentais e na manutenção dos animais. Um agradecimento especial a todos que dispuseram tempo para acompanhar os motoristas da UNESP para aquisição dos pintainhos.

Aos amigos do Laboratório de Genética Aplicada, Cláudio, André, Lucas, Omori, Raphael, Carla, Érica, pela convivência e incentivo nesse último ano.

Aos Alunos ingressantes em 2012 do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Aos pintainhos, que proporcionaram o desenvolvimento da pesquisa, no qual sempre tratei com muito respeito e dentro das normas éticas.

Ao Marcelo E. Batalhão, pela excelente assistência nas dosagens de nitrito e nitrato, sempre muito solícito. E à Marcia H.M.R. Fernandes, pelo auxílio na respirometria, ajudando e ensinando como desenvolver o protocolo experimental e as análises.

Ao Alexandre e à Mara da secretaria do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (UFSCar-UNESP) pela dedicação e atenção no trabalho desempenhado junto aos discentes vinculados ao programa.

A todos os professores do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (UFSCar-UNESP) por fazerem parte da minha formação acadêmica.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fisiologia Comparada (INCT) pelo apoio financeiro.

Ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, à UNESP Jaboticabal e Araraquara, e a UFScar, por auxílios financeiros, seja em congresso ou transporte, e por fazerem parte de minha formação profissional.

## RESUMO

Doses baixas e altas de LPS (endotoxina de bactéria Gram negativa) são utilizadas como modelo para o estudo da febre e do choque endotoxêmico, respectivamente. Em ratos, o óxido nítrico (NO) sistêmico afeta diretamente a termogênese, mas não constitui um mediador da resposta febril. Alguns poucos estudos em aves, sugere uma sinalização pirogênica do NO no encéfalo, mas não há evidências suficientes para confirmar essa sugestão. Nossa hipótese é que, em comparação com os mamíferos, o NO sistêmico apresenta ação termogênica similar durante desafio com endotoxinas em aves, mesmo no início da vida. Sendo aves de desenvolvimento precoce, os frangos têm capacidade termorreguladora por mecanismos comportamentais e autonômicos imediatamente após a eclosão, o que constitui um modelo interessante para estudar a termorregulação no início da vida. Desse modo, nós investigamos o papel do NO na febre e no choque endotoxêmico induzidos por LPS em pintainhos de 5 dias de idade. LPS nas doses de 2 (LPS-2) e 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  induziu febre 3-5 horas após a injeção, enquanto que 50 e 100 (LPS-100)  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de LPS causaram queda da Tc na primeira hora seguida por febre 4-5 horas após a injeção. A menor (LPS-2; induz febre) e a maior (LPS-100; induz queda de Tc seguida por febre) doses de LPS foram escolhidas para a realização dos protocolos seguintes. As concentrações plasmáticas de nitrito + nitrato aumentaram 4 horas, mas não 1 hora, após as injeções de LPS-2 e LPS-100 (maior aumento com a dose mais elevada). Não houve correlação entre os aumentos de Tc e as concentrações de nitrato nas duas doses de LPS. Injeções intramusculares de 50 mg/kg de L-NAME (inibidor não seletivo de NOS) inibiu a febre induzida por LPS-2 e LPS-100, e aumentou a magnitude da queda de Tc provocada pelo LPS-100. L-NAME reduziu o consumo de oxigênio dos animais tratados com LPS-2 e LPS-100, sendo a queda mais acentuada nesse último grupo. Além disso, o comportamento de

agrupamento (redução da perda de calor) induzido por LPS-100 foi acentuado pelo pre-tratamento com L-NAME. Por outro lado, nos pintainhos mantidos em ambiente quente, que não interferiu com a Tc dos animais, os efeitos do LPS-2 e LPS-100 sobre a TC não foram afetados pelo L-NAME. Juntos esses resultados indicam que o NO parece não ser um mediador de febre e choque endotóxico em pintainhos, mas afeta a termogênese nesses animais, o que pode constituir um efeito comum do NO nos vertebrados endotérmicos.



## ABSTRACT

Low and high LPS doses (endotoxin) have been used as models to study fever and endotoxic shock, respectively. In rats, systemic nitric oxide (NO) directly affects thermogenesis, but does not mediate those responses. Even though few studies in birds suggest NO as a pyrogenic signalling to brain, there is not enough evidence for confirming this suggestion. We hypothesise that, compared to mammals, systemic NO presents similar thermogenic action during endotoxin challenge in birds, even in early life. As precocial birds, chickens have a developed thermoregulatory capacity immediately after hatching, which constitutes an interesting model to study thermoregulation in early life. Thus, we investigated the role of NO in LPS-induced fever and endotoxic shock in 5-day-old chicks. The doses of 2 (LPS2) and 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of LPS induced fever 3-5 hours after intramuscular (IM) injection, while 50 and 100 (LPS100)  $\mu\text{g kg}^{-1}$  decreased Tc within the first hour followed by fever at 4-5 hours post-injection. Plasma nitrate levels increased 4 hours, but not 1 hour, after treatment with LPS2 and LPS100 (higher increase). There was no correlation between plasma nitrate concentrations and Tc at both LPS doses. L-NAME (non-selective NOS inhibitor; 50  $\text{mg kg}^{-1}$ ; IM) inhibited LPS2- and LPS100-induced fever and increased the magnitude of the fall in Tc caused by LPS100. In contrast, no effect of L-NAME was observed in LPS-treated chicks in warm conditions. L-NAME decreased oxygen consumption in LPS2- and LPS100-treated chicks, but the response was more pronounced with LPS100. Moreover, LPS-induced huddling (heat conservation behaviour) was accentuated by L-NAME. Our results seem to indicate that, like in rats, systemic NO is not a mediator of fever and endotoxic shock in chicks, but does affect thermogenesis in these animals, which may constitute a common effect of NO in the endothermic vertebr

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
1.1 Termorregulação: Ênfase em aves .....	9
1.2 Febre e Choque endotoxêmico .....	11
1.3 Papel do óxido nítrico na termorregulação.....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 Objetivos específicos .....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1 Medidas de Temperatura Corporal (Tc) .....	18
3.2 Drogas Utilizadas .....	18
3.3 Dosagens das Concentrações Plasmáticas de Nitrato + Nitrito .....	18
3.4 Medidas de Consumo de Oxigênio .....	19
3.5 Protocolos experimentais.....	19
3.5.1 Protocolo 1.....	20
3.5.2 Protocolo 2.....	20
3.5.3 Protocolo 3.....	21
3.5.4 Protocolo 4.....	21
3.5.5 Protocolo 5.....	22
3.5.6 Protocolo 6.....	22
3.6 Análise estatística .....	23
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
4.1 Protocolo 1 .....	25
4.2 Protocolo 2 .....	26
4.3 Protocolo 3 .....	27
4.4 Protocolo 4 .....	28
4.5 Protocolo 5 .....	29
4.6 Protocolo 6 .....	30
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
5.1 <i>Termorregulação de pintainhos frente ao tratamento com LPS</i> .....	32
5.2 <i>Óxido Nítrico e febre/queda de Tc induzida por LPS em pintainhos</i> .....	34
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 TEMORREGULAÇÃO: ÊNFASE EM AVES

Sendo animais endotérmicos, as aves, assim como os mamíferos, apresentam mecanismos termorreguladores comportamentais e também autonômicos para perda e ganho de calor que são fundamentais para a manutenção da T<sub>c</sub> dentro de uma estreita faixa de variação que é característica de cada espécie (*cf.* KLUGER, 1991; BLATTEIS, 1998; GORDON, 2001). Segundo a definição do Glossário de Termos da Fisiologia Térmica (IUPS Thermal Commission, 2001) as respostas autonômicas são diferenciadas das comportamentais por serem involuntárias e não necessariamente por serem dependentes de regulação pelo sistema nervoso autonômico. Esse termo tem sido usado em substituição àquele usado no passado, “mecanismo fisiológico”. Dentre esses mecanismos estão o de ganho (conservação e produção) e os de perda (dissipação) de calor (BRANCO *et al.* 2006). A conservação de calor ocorre principalmente por vasoconstrição periférica (aves e mamíferos) e piloereção (mamíferos) (BÍCEGO *et al.*, 2007). Já os mecanismos de produção de calor, além daquele resultante do metabolismo basal (termogênese obrigatória), podem ser dependentes ou não do tremor da musculatura esquelética. A principal forma de produção de calor em aves é por tremor, assim como em humanos adultos e na maioria dos grandes mamíferos. No entanto, a produção de calor independente de tremor pode ser originada no próprio músculo esquelético de aves (revisado por BICUDO *et al.*, 2002) ou no tecido adiposo marrom (TAM) presente em mamíferos placentários – muito importante para os de pequeno porte, recém nascidos e para os aclimatados ao frio (MACKOWIAK e PLAISANCE, 1998; BRANCO *et al.*, 2006). Já os mecanismos de perda de calor são basicamente: vasodilatação periférica, ofegação (aves e alguns mamíferos como cães, gatos e

ovelhas), sudorese (humanos, equinos, bovinos, entre outros) e produção de saliva para ser espalhada sobre a superfície corporal (combinação de mecanismo autonômico e comportamental observado em roedores e cangurus) (BÍCEGO *et al.*, 2007).

O mecanismo termorregulador comportamental está relacionado com a procura por um ambiente quente ou frio, o contato com superfícies quentes ou frias, a utilização de posturas corporais encolhidas ou estiradas e o comportamento de agrupar-se ou não, o que evita ou facilita a troca de calor do animal com o ambiente (revisado por BÍCEGO *et al.*, 2007)

Os mecanismos termorreguladores autonômicos e comportamentais são regulados pelo sistema nervoso central (SNC). Pelo menos em ratos já foram descritos os circuitos neurais envolvidos em cada termofetor (termogêneses por tremor e independente deste e alteração vasomotora) tendo uma região que se situa entre o diencéfalo e o telencéfalo, a área pré-óptica do hipotálamo anterior (APO), como um sítio chave na regulação desses efetores (MORRISON e NAKAMURA, 2011). Para os termofetores comportamentais ainda existem poucas evidências das regiões envolvidas na sua regulação em mamíferos, tendo participação de regiões hipotalâmicas (MARUYAMA *et al.*, 2003). A APO contém neurônios sensíveis ao calor – que aumentam sua atividade com o aumento da temperatura, inibindo mecanismos de ganho de calor e ativando mecanismos de perda de calor – e insensíveis à variação de temperatura, que se conectam por meio de sinapses excitatórias e inibitórias com os neurônios efetores de perda e de produção de calor, respectivamente. É considerado que a APO exerça um importante papel integrador de todas as informações térmicas vindas das várias regiões do organismo (MATSUDA *et al.*, 1992; BOULANT, 1998). Já em aves, vários estudos em pombos, pinguins, codornas, patos e frangos demonstraram uma fraca ou inapropriada função termosensorial hipotalâmica para regulação da  $T_c$

(revisado por BÍCEGO *et al.*, 2007). Nesse contexto, o aquecimento da APO induz moderadas respostas de perda de calor, enquanto o resfriamento da APO causa nenhuma resposta termogênica ou até redução desta. Por outro lado, pardais, emus e gansos apresentam termosensibilidade hipotalâmica semelhante à dos mamíferos. Assim, a regulação da Tc pelo SNC de aves ainda é um assunto que merece investigação.

Atualmente são descritos 5 estados térmicos que os endotérmicos podem apresentar: eutermia, hiper e hipotermia, febre e anapirexia (GORDON, 2001). Eutermia é a condição em que o animal apresenta a Tc típica da espécie num determinado momento do dia. Quando ocorrem aumentos ou reduções extremas da temperatura ambiente, a Tc pode acompanhar essas alterações, mesmo com a ativação de mecanismos de perda ou ganho de calor, o que se caracteriza por quadros de hipertermia ou hipotermia, respectivamente. Os outros dois estados térmicos referem-se a alterações reguladas da Tc. Nestes casos, ocorre uma ativação de mecanismos termorreguladores apropriados para elevar a Tc (ativação de respostas de ganho de energia térmica), ou seja, induzir febre (KLUGER, 1991) ou para reduzi-la (ativação de respostas de perda de energia térmica), o que é chamado de anapirexia (GORDON, 2001; STEINER e BRANCO, 2002a).

## **1.2 FEBRE E CHOQUE ENDOTOXÊMICO**

A febre constitui um dos eventos mais comuns que fazem parte de uma ampla resposta de defesa do organismo a infecções, traumas ou lesões denominada resposta de fase aguda (BLATTEIS e SEHIC, 1997). Salvo algumas exceções, tanto vertebrados endotérmicos quanto ectotérmicos (peixes, anfíbios e répteis), além de invertebrados, desenvolvem febre em resposta a pirogênicos exógenos tais como bactérias gram-positivas e gram-negativas, vírus ou fungos (KLUGER, 1991; BÍCEGO *et al.*, 2007).

Para os animais endotérmicos, a febre é resultado de um aumento na produção metabólica de calor e/ou uma redução na perda de calor, além da conservação de calor por mecanismo comportamental (COOPER, 1995). Muitos estudos têm sido feitos, prioritariamente em mamíferos, para se identificar os mecanismos envolvidos na resposta febril. O LPS, ou lipopolissacarídeo (endotoxina), que é um composto purificado da parede celular de bactérias gram-negativas, é um dos pirogênicos exógenos mais utilizados para induzir febre em animais experimentais (KLUGER, 1991; BLATTEIS, 2006; BÍCEGO *et al.*, 2007). Em mamíferos, várias evidências indicam que o LPS ao penetrar no organismo estimula as células do sistema imunológico a liberarem uma complexa variedade de mediadores solúveis, denominados pirogênicos endógenos, tais como as citocinas interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, interferons e fator de necrose tumoral. Tais pirogênicos fazem parte de uma ampla cascata de eventos que culminam na sinalização da APO, principal região do encéfalo envolvida no desenvolvimento da febre (BOULANT, 1998; 2006; BÍCEGO *et al.*, 2007; MORRISOM e NAKAMURA, 2011) em geral pela prostaglandina E<sub>2</sub> (MILTON, 1989; MATSUDA *et al.*, 1992; SCAMMELL *et al.*, 1996; 1998; OKA *et al.*, 1997), para que ocorra a elevação da T<sub>c</sub> (*cf.* BLATTEIS *et al.*, 2000; NETEA *et al.*, 2000; ROTH e SOUZA, 2001). Pode-se observar que, enquanto o conhecimento dos mecanismos envolvidos na resposta febril de mamíferos encontra-se em constante progresso, pouco se sabe a respeito do desenvolvimento da febre em aves (GRAY *et al.*, 2013). Estudos em frangos indicam que a febre induzida por LPS também é dependente de prostaglandinas (JOHNSON *et al.*, 1993; MACARI *et al.*, 1993), mas estas parecem não atuar na POA (FRAIFELD *et al.*, 1995).

Em situações de infecção generalizada, uma síndrome clínica conhecida como choque séptico pode ocorrer, sendo caracterizada pela redução da T<sub>c</sub>, em vez de febre

(ROMANOVSKY *et al.*, 1996), e pela hipotensão, que geralmente se apresenta com diminuição drástica da resistência vascular sistêmica e um distúrbio generalizado do fluxo sanguíneo (PARRILLO *et al.*, 1990). Altas doses de LPS, tendem a causar diminuição Tc em vez de febre, o que tem sido utilizado em mamíferos (ROMANOVSKY *et al.*, 1996; ALMEIDA *et al.*, 2006; AKARSU & MAMUK, 2007) como um modelo para estudar o choque endotoxêmico. A queda de Tc pode inibir a ocorrência de hipóxia tecidual induzida por diminuição da perfusão e pode desempenhar um papel defensivo após a injeção de LPS (ROMANOVSKY *et al.*, 1997; CORRIGAN *et al.*, 2013). Tanto em ratos (STEINER *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2006) quanto em frangos (DE BOEVER *et al.*, 2009) altas doses de LPS podem induzir diminuição de Tc no início (pico da concentração de pirogênio no sangue) seguida de resposta febril após algumas horas (quando o LPS vai sendo metabolizado e sua concentração vai diminuindo no sangue). Além disso, as injeções intramusculares de altas doses de LPS induzem inflamação em frangos, causando hipotensão com uma fase inicial de queda da Tc (1h) e aumento de expressão de RNAm de IL-6, IL-1 $\beta$ , TL1A nos leucócitos tendo um aumento tardio da concentração plasmática de IL-6 três horas após a injeção de LPS (DE BOEVER *et al.*, 2009).

É interessante notar que uma importante evidência experimental indica que a queda de Tc durante o choque endotoxêmico também pode ser considerada uma resposta regulada (tanto quanto a febre), ou seja, uma anapirexia. Foi demonstrado que alta dose de LPS induz redução da temperatura ambiente de preferência (coincidente com a queda de Tc; ROMANOVSKY *et al.*, 1997; ALMEIDA *et al.*; 2006) seguida por escolha por ambiente mais quente (coincidente com o desenvolvimento da febre; ALMEIDA *et al.*; 2006) em ratos. Isso indica que o animal procura um ambiente em que é facilitada a perda de calor para o meio o que facilita a queda da Tc (o

comportamento oposto seria esperado caso essa queda de Tc fosse uma hipotermia) e depois dificulta a perda de calor para o ambiente para facilitar o aumento da Tc na febre (efeito oposto ocorreria numa hipertermia). Tais evidências não existem para aves.

### **1.3 PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA TERMORREGULAÇÃO**

#### *Mamíferos*

O óxido nítrico (NO) é um gás sintetizado a partir do catabolismo da L-arginina (L-Arg) que, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), resulta na formação de L-citrulina e NO (*cf.* MONCADA *et al.*, 1991). Foram identificadas, até o momento, três isoformas de NOS, a endotelial (NOSe) e a neuronal (NOSn), que são expressas constitutivamente, e a induzível (NOSi), que geralmente não é expressa nas condições basais mas é ativada por uma variedade de estímulos, inclusive infecção e inflamação (MONCADA *et al.*, 1991).

Nos mamíferos, existem vários estudos indicando efeitos termorreguladores diferentes do NO na periferia e no SNC. Infusão icv de doadores de NO em coelhos causa vasodilatação nas orelhas, aumento da frequência respiratória e da perda evaporativa de água (ERIKSSON *et al.*, 1997), enquanto que L-NAME induz queda na perda de calor respiratória (MATHAI *et al.*, 1997). A injeção icv de L-NAME inibe as respostas de perda de calor durante o exercício físico em ratos (LACERDA *et al.*, 2005) e inibe a supressão da febre que ocorre próximo do parto em ratas prenhes (BEGG *et al.*, 2007, 2008). Tais estudos indicam um efeito termolítico do NO atuando no SNC. Corroborando esses dados, na APO o NO parece atuar como uma molécula antipirética durante a febre induzida por LPS em ratos (STEINER *et al.*, 2002b) e como um mediador de anapirexia (resposta oposta à febre) induzida por hipoxia em ratos (STEINER e BRANCO, 2002a) e também em sapos, que são animais ectotérmicos e,



sendo assim, termorregulam basicamente pelo comportamento (GUERRA *et al.*, 2008). Entretanto, recentemente foi demonstrado que o NO atuando no *locus coeruleus*, o maior núcleo noradrenérgico do encéfalo, que fica situado na ponte, desempenha um papel propirético, ou seja, facilita o aumento da Tc induzida por LPS (SORIANO *et al.*, 2010). Desse modo, o efeito termorregulador do NO no SNC parece depender da região em que atua.

Em relação ao efeito periférico do NO em mamíferos, vários estudos em ratos indicam uma ação termogênica desse mediador gasoso, pois injeção periférica de L-NAME induz hipotermia em ratos (revisão de GERSTBERGER, 1999). Além disso, injeção intraperitoneal de L-NAME (100 mg/kg) não afeta a Tc, a taxa metabólica e nem a perda evaporativa de calor de ratos mantidos a 30°C, mas reduz a Tc e inibe o aumento da taxa metabólica naqueles mantidos a 18°C (KAMERMAN *et al.*, 2003). Os dados da literatura indicam um efeito do bloqueio periférico da síntese de NO diretamente na inibição da termogênese do tecido adiposo marrom de ratos, induzindo vasoconstrição desse tecido e bloqueando a sua ativação pela adrenalina (NAGASHIMA *et al.*, 1994; STEINER e BRANCO, 2001; KAMERMAN *et al.*, 2003). Portanto, pelo menos em ratos, o NO periférico parece afetar diretamente em um termoefetor (termogênese), mas não atuar como um mediador febrigênico sinalizando o SNC para ativar mecanismos de ganho de calor (STEINER *et al.*, 2004).

#### Aves

Nas aves, foram demonstradas várias funções do NO como a vasodilatação (WANG *et al.*, 2002; WEIDONG *et al.*, 2002) similar à observada em mamíferos (PALMER *et al.*, 1987), tendo implicação no desenvolvimento da hipertensão pulmonar induzida por endotoxina em frangos (MARTINEZ-LEMOZ *et al.*, 1999; WIDEMAN *et*

*al.*, 2004). Além disso, transmissões sensoriais, tais como visual e olfatória, e consolidação da memória são outras importantes funções moduladas pelo NO no SNC de aves (revisado por TODA e AYAJIKI, 2006).

Quanto ao papel do NO na termorregulação de aves há muito poucos dados a esse respeito na literatura. Recentemente foi demonstrado pelo nosso laboratório que a inibição da síntese de NO pela injeção intramuscular (100 mg/kg) ou intracerebroventricular (a partir de 45 µg/animal) de L-NAME reduz a Tc de pintainhos de frango de 5 dias de idade (COLEONE *et al.*, 2009), indicando que esse inibidor poderia estar afetando a produção de calor desses animais. Mecanismos de febre e choque endotoxêmicos também são menos compreendidos em aves. Apenas um estudo em patos demonstrou que a injeção intraabdominal de 200 mg/kg de L-NAME inibe a febre induzida por LPS (GRAY *et al.*, 2005), o que levou os autores a sugerirem um papel propirético do NO em aves. Entretanto, é preciso ser levado em conta que a inibição da febre por L-NAME sistêmico nos patos pode ser por um efeito direto em um dos termofetores de produção de calor e não exatamente numa via de sinalização de febre, como é descrito para mamíferos (STEINER *et al.*, 2004). Essa é uma hipótese testada no presente trabalho em pintainhos de frangos. Quanto ao choque endotoxêmico, um estudo relatou aumentos da expressão de RNAm da NOSi e da concentração de nitrito no pulmão e no fígado de pintainhos de galinha de 4 dias de idade, 3 horas após a injeção de LPS numa dose 100 vezes maior (10 mg/kg; NIKAMI *et al.*, 2008) do que a utilizada no presente estudo (100 µg/kg).

## 2 OBJETIVOS

Os frangos, por serem animais de desenvolvimento precoce, já apresentam capacidade termorreguladora imediatamente após a eclosão, sendo quase totalmente cobertos por penugens e capazes de responder efetivamente ao calor e ao frio (*cf.* DAWSON e WHITTOW, 2000) e de desenvolver febre (SCHROTT *et al.*, 1999; SCHROTT e SPARBER, 2001; 2004) e choque endotoxêmico induzidos pelo LPS (NIKAMI *et al.*, 2008; DE BOEVER *et al.*, 2009). Entretanto, muito pouco é sabido sobre os mecanismos neuroquímicos envolvidos nas respostas térmicas nesta fase inicial.

Com base nas considerações acima, investigamos o papel do NO sistêmico na queda de Tc e na febre induzidas por LPS em pintainhos (*Gallus domésticos*) de 5 dias de idade.

### 2.1 Objetivos específicos:

- Determinar as doses de LPS indutoras de febre e de queda de Tc.
- Verificar a ativação da via do NO pelo LPS, pelas medidas das concentrações dos metabólitos nitrito e nitrato no plasma e se há alguma correlação entre essas variáveis e as alterações de Tc.
- Verificar o efeito da inibição da síntese de NO pelo L-NAME sobre a Tc e os mecanismos efetores termogênico e comportamental.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados neste estudo pintainhos (*Gallus gallus*), da linhagem comercial Cobb 500, com 5 dias de idade (massa corporal de 65 a 85 g). As aves receberam água *ad libitum* e ração comercial seguindo a composição nutricional dos ingredientes e os níveis nutricionais indicados por Rostagno *et al.* (2000). Os animais foram mantidos em grupos em câmaras climatizadas a 31-32 °C até os 5 dias de idade pós-eclosão (algumas diferenças são descritas em protocolos experimentais específicos, apresentados abaixo). Nenhuma vacina foi aplicada às aves. O estudo foi conduzido com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV (protocolo: 008184/13).

#### **3.1 Medidas de Temperatura Corporal (Tc)**

A Tc foi monitorada medindo-se a temperatura colônica por meio de um sensor (Yellow Spring Instrument, Co. Ohio, EUA) inserido 3 cm pela cloaca do animal e conectado a um tele-termômetro (modelo 45TUC, Yellow Spring Instrument Co. Ohio, EUA).

#### **3.2 Drogas Utilizadas**

LPS- lipopolissacarídeo de *E. coli*, 0127:B8 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

L-NAME- Hidrocloro de N $\omega$ -Nitro-L-arginina metil éster (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS)

#### **3.3 Dosagens das Concentrações Plasmáticas de Nitrato + Nitrito**

Os animais foram decaptados e realizada a colheita de sangue total. Após a colheita do sangue as amostras foram centrifugadas (3000 rpm por 10 min a 4°C) e o

plasma estocado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . No dia do ensaio, as amostras de plasma foram desproteinizadas com etanol 95%, a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 30 minutos e subsequentemente centrifugadas (10.000 rpm por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ ). O sobrenadante foi usado para as medidas de nitrato de acordo com a técnica de quimioluminescência para NO/ozônio, previamente descrita por Archer (1993), utilizando-se um analisador de NO (Sievers 280 NOA, Boulder, CO). Esses procedimentos foram realizados no laboratório de Fisiologia da Profa. Dra. Évelin C. Carnio, da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

### **3.4 Medidas de Consumo de Oxigênio**

O consumo de oxigênio foi determinado por meio de um sistema de respirometria aberta. Um fluxo contínuo de gás de 1L/min foi mantido na câmara experimental e as concentrações de  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$  de entrada e saída foram monitoradas por analisadores de gases (Sable Systems International, Inc, Las Vegas, EUA) conectados a um computador para registro e armazenamento dos dados. Consumo de  $\text{O}_2$  e excreção de  $\text{CO}_2$  foram determinados com base na taxa de fluxo e na diferença de concentração dos gases na entrada e na saída da câmara, sendo os valores apresentados em STPD (condições padrão de temperatura, pressão e ar seco). O ar de entrada dos analisadores foi seco por meio de absorvedor de umidade Drierite (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

### **3.5 Protocolos Experimentais**

Em todos os protocolos os experimentos foram realizados com animais não-anestesiados de 5 dias de idade dentro do intervalo de 8h00 - 15:00. Do segundo ao quarto dia a temperatura colônica foi medida três vezes, separadas por intervalos de 1

hora, para a habituação dos animais a tal processo e, assim, evitar influências de manipulação na Tc no dia do experimento. A temperatura ambiente foi mantida a 31-32 °C. Possíveis diferenças nessas condições gerais descritas acima são apresentadas nos protocolos específicos.

### *3.5.1 Protocolo 1: Efeito de diferentes doses de LPS sobre a Tc de pintainhos de 5 dias de idade*

A Tc foi medida antes e 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a injeção intramuscular (im) de solução salina apirogênica ou de LPS, nas doses de 2, 10, 50 e 100 µg/kg. Além do grupo salina, a Tc foi medida em outro grupo de animais que não receberam injeção (grupo “intacto”) para se testar o efeito somente da injeção intramuscular na Tc dos animais.

As injeções intramusculares de LPS foram realizadas na coxa dos animais. Foram feitos testes com injeções intra músculo peitoral, mas estas se mostraram mais difíceis de serem realizadas e com a possibilidade de atingirem órgãos internos devido à reduzida espessura desse músculo, resultando em valores de Tc com alta variação individual. Como as medidas de Tc foram semelhantes após injeção tanto no peito como na coxa, e os valores de Tc após esse último procedimento tiveram reduzida variabilidade individual, optamos pelo segundo procedimento.

### *3.5.2 Protocolo 2: Efeito da injeção im de LPS sobre a concentração plasmática de nitrato + nitrito em pintainhos*

A possível ativação da via NO periférico com o uso do LPS foi testada por meio de determinação da concentração plasmática dos metabólitos nitrato + nitrito (GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2004; COLEONE *et al.*, 2009;) após as injeções de LPS. A Tc foi

mensurada e seguida pela colheita de sangue total para a determinação da concentração plasmática de nitrato antes e 1 e 4 horas após a injeção im de LPS 2 e 100 µg/kg ou salina. Estas doses foram seleccionadas com base nos resultados do protocolo 1, em que o LPS 2 µg/kg induziu apenas febre e o LPS 100 µg/kg induziu queda de Tc seguida por febre (Fig. 1). Os tempos de colheita de sangue foram coincidentes com as respostas de queda (1h) e de aumento da Tc (4h) (Fig. 1).

### *3.5.3 Protocolo 3: Efeito da injeção im de L-NAME sobre as alterações de Tc induzidas por LPS em pintainhos*

A Tc foi mensurada antes e 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a injeção im de solução salina apirogênica ou LPS nas doses de 2 e 100 µg/kg (seleccionadas a partir do protocolo 1). O L-NAME (50 mg/kg) ou salina (veículo) foi injectado(a) 50 minutos antes da solução salina ou LPS. A dose de L-NAME foi escolhida com base em um estudo anterior de nosso laboratório (COLEONE *et al.*, 2009) em que foi demonstrado que 50 mg/kg é a maior dose im de L-NAME que não altera a Tc de pintainhos intactos.

### *Protocolo 4: Efeito da injeção im de L-NAME e de LPS sobre o consumo de oxigênio de pintainhos*

A fim de investigar o efeito da inibição do NO no mecanismo de termogênese (termofetor autônomo) durante desafio com LPS, foram feitas medidas de consumo de oxigênio (uma medida indireta da taxa metabólica). Cada animal foi colocado na câmara de respirometria para um tempo de aclimação de cerca de 30 minutos. Após este tempo, o L-NAME (50 mg/kg, im) foi injetado, seguido por solução salina ou com LPS (2 e 100 µg/kg) 50 minutos mais tarde. Em seguida, a tampa da câmara foi selada e o consumo de oxigênio foi determinado em intervalos de 40 minutos, de 0,5 a 4 horas

após as injeções de LPS ou de solução salina. A temperatura corporal foi medida imediatamente antes da injeção de L-NAME (Ti) e 4 horas após tratamento com LPS (Tf).

*Protocolo 5: Efeito da injeção im de L-NAME sobre as alterações de Tc induzidas por LPS em pintainhos submetidos a uma condição de calor (36°C)*

Este protocolo baseia-se na suposição de que num ambiente quente a exigência termogênica para o desenvolvimento de febre é reduzida e a Tc aumenta pela ativação de mecanismos de conservação de calor. Neste caso, se o efeito de L-NAME sobre as alterações induzidas por LPS em Tc demonstradas no Protocolo 3 é inibida no calor, isso significa que o L-NAME impede especificamente um efector termogénico e não um sinal febrigênico, conforme foi demonstrado em ratos (STEINER *et al.*, 2004). Assim, temperatura no interior da câmara experimental foi alterada de 32 para 36°C no dia 4, pelo menos 12 horas antes do experimento. Na manhã do dia 5, a Tc dos pintainhos foi mensurada antes e 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a injeção im de solução salina ou LPS nas doses de 2 e 100 µg/kg. L-NAME (50 mg/kg, im) ou salina foi administrado 50 minutos antes da injeção de LPS ou salina.

*Protocolo 6: Efeito da injeção im de L-NAME e LPS sobre a termorregulação comportamental de pintainhos*

Agrupamento é um mecanismo de conservação de calor usados por grupos de mamíferos recém-nascidos (Mortola & Feher 1998, Pereira *et al.*, 2006) e aves (GILBERT *et al.*, 2008, WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2011) em condições de frio. A febre é conhecida por ser provocada por mecanismos autonômicos e comportamentais de ganho de calor (BÍCEGO *et al.*, 2007). O agrupamento é um comportamento previsível



durante o desenvolvimento de febre. Neste caso, se L-NAME apenas inibir a termogênese e não um sinal febrígeno espera-se uma resposta comportamental mais proeminente (maior agrupamento) compensatória de conservação de calor para aumentar  $T_c$  durante o desenvolvimento de febre. Para testar esta hipótese, um dia antes do experimento, os animais foram divididos em grupos de 5 indivíduos em câmaras climatizadas  $\sim 30-31^\circ\text{C}$ . Na manhã seguinte (dia 5), foram feitas injeções de L-NAME (50 mg/kg, im) ou salina 1h antes da injeção de LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , im) ou salina. Os animais foram monitorados por uma *webcam* (LifeCam HD-3000, Microsoft), que foi programada para tirar fotos a cada 2 minutos até 4 horas após a injeção de LPS. A  $T_c$  foi mensurada no início (imediatamente antes da injeção de L-NAME) e no final (4 horas após o tratamento com LPS) do experimento, para não interferir com o comportamento dos animais ao longo dos tratamentos. Foram determinados o comportamento de agrupar-se dos pintainhos e a área ocupada pelo grupo nos diferentes tratamentos.

### 3.6. Análise Estatística

Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Para serem demonstrados os efeitos do LPS e do L-NAME sobre a  $T_c$  dos pintainhos, os índices térmicos (IT) foram calculados como a área sob a curva para as primeiras 2 horas (redução da  $T_c$  induzida por LPS) e nas últimas 3 horas (febre induzida por LPS) ( $^\circ\text{C}\cdot\text{h}$ ). Os Índices Térmicos foram comparados por meio de análise de variância de uma via (one-way, ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. As concentrações plasmáticas de nitrato + nitrito foram comparadas por análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA; fatores: tempo e tratamento), seguido pelo teste de Bonferroni. Para os experimentos de comportamento foi determinado o número de pintainhos isolados (não agrupados) e a área de superfície

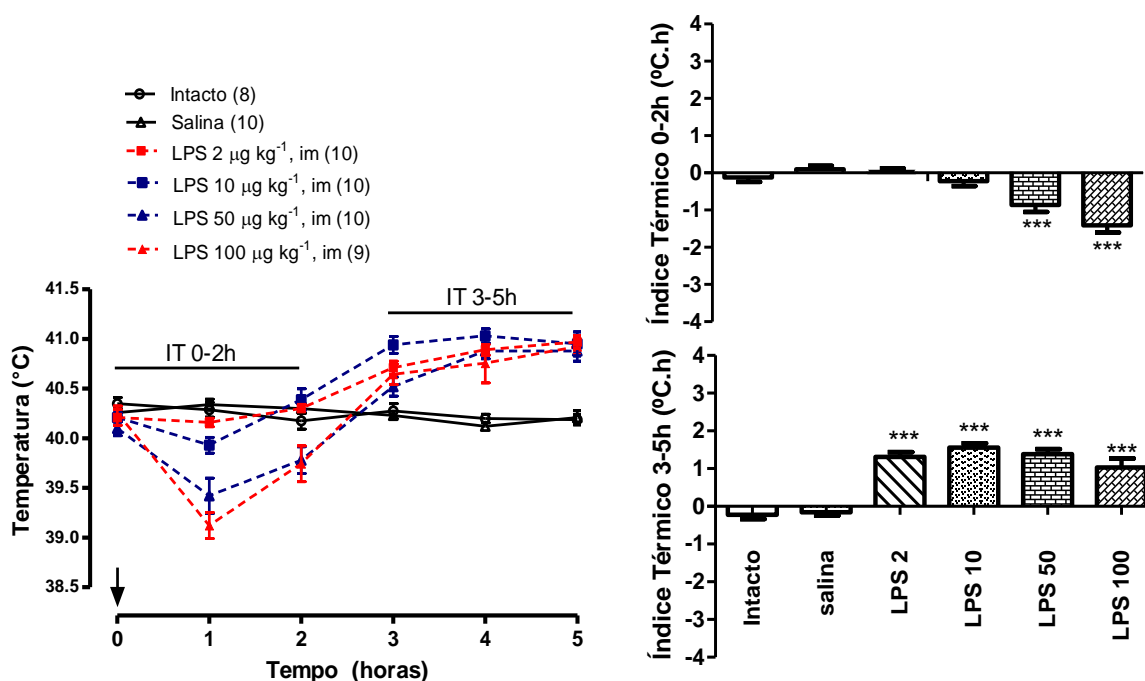
total ocupada pelos cinco pintainhos, o efeito do LPS e do L-NAME sobre os parâmetros comportamentais e o consumo de oxigênio foi verificado pelo uso de análise de variância de duas vias de medidas repetidas (Two-way ANOVA; fatores: tempo e tratamento). As análises do consumo de oxigênio foram feitas nos tempos 30, 70, 110, 150, 190 e 240 minutos após a injeção de LPS ou salina. Neste caso, as diferenças entre as médias foram identificadas por teste post-hoc de Holm Sidak. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos em todos os casos.

## 4. RESULTADOS

A temperatura corporal ( $T_c$ ) inicial dos pintainhos antes da injeção, nos grupos intacto, salina, LPS 2, 10, 50 and 100 mg/kg foi  $40.3 \pm 0.1$ ,  $40.3 \pm 0.1$ ,  $40.2 \pm 0.1$ ,  $40.2 \pm 0.1$ ,  $40.1 \pm 0.1$ ,  $40.2 \pm 0.1$  °C, respectivamente. Nenhuma diferença estatística foi observada entre estas  $T_c$ s, bem como entre as  $T_c$ s iniciais dos outros protocolos ( $p > 0,05$ ; ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey). A injeção de salina (veículo) não mudou a  $T_c$  em nenhum dos protocolos realizados (Fig. 1-6).

### 4.1 Protocolo 1: Efeito de diferentes doses de LPS sobre a $T_c$ de pintainhos de 5 dias de idade

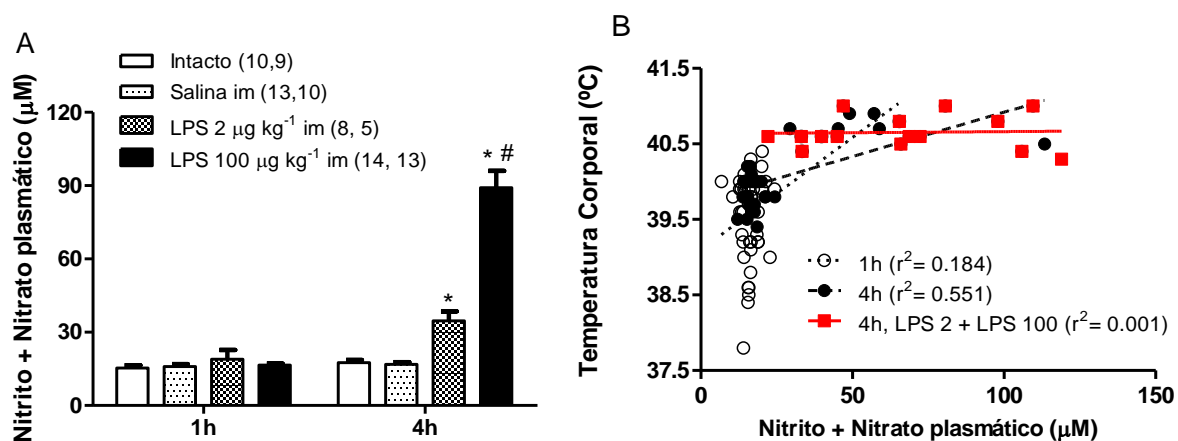
Na Fig.1 são apresentados os resultados do efeito da injeção im de diferentes doses de LPS sobre a  $T_c$  de pintainhos. Todas as doses de LPS 2, 10, 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aumentaram a  $T_c$  de 3-5 horas após a injeção (Fig. 1C). LPS nas doses de 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mas não de 2 e 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , causaram um decréscimo na  $T_c$  na primeira hora após a injeção (Fig. 1B).



**Fig. 1A–C.** **A-** Efeito da injeção intramuscular (im) de LPS (2, 10, 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ou solução salina apirogênica (veículo) sobre a temperatura corporal dos pintainhos de 5 dias de idade. **B-** Índice térmico de pintainhos até 2 horas após a injeção im de LPS ou de veículo (0-2h). **C-** Índice térmico de pintainhos 3-5 horas após injeção im de LPS ou veículo (3-5h). Número de animais entre parêntesis. \*\*\* Significa diferença estatística em relação ao grupo salina ( $p < 0,001$ ). "Intacto" animais não receberam nenhuma injeção. Ta= temperatura ambiente.

#### 4.2 Protocolo 2: Efeito da injeção im de LPS sobre a concentração plasmática de nitrato + nitrito em pintainhos

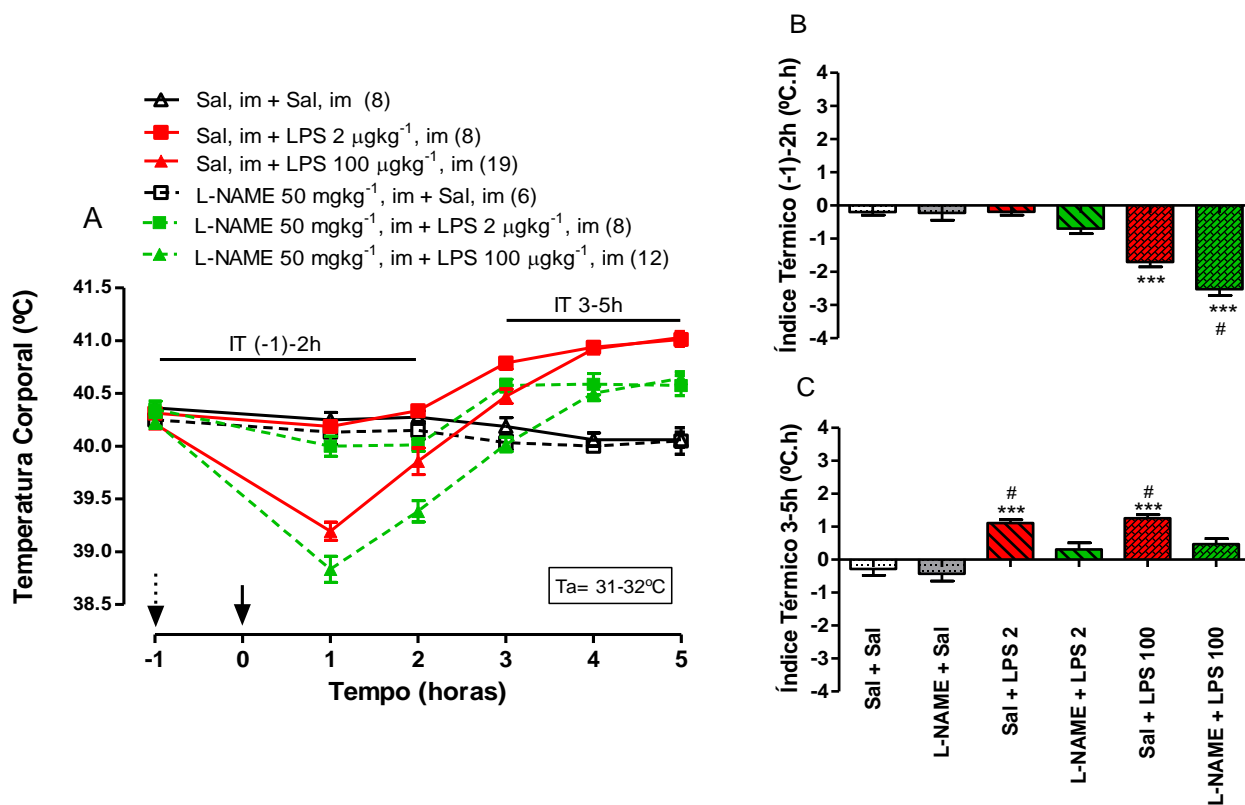
A concentração plasmática de nitrato + nitrito em pintainhos intactos (“não injetados”) foi  $16,45 \pm 0,82 \mu\text{M}$ . Como pode ser visto na Fig. 2A, a solução salina não alterou esta variável 1 e 4 horas após as injeções, enquanto os tratamentos com LPS nas doses de 2 e 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  aumentaram significativamente as concentrações plasmáticas de nitrato + nitrito 4 h, mas não 1 h após as injeções. No entanto, a dose mais elevada de LPS induziu um aumento mais evidente da Tc no tempo 4h do que a dose menor (Fig. 2). No tempo 1h após as injeções observou-se uma fraca correlação entre Tc e concentração plasmática de nitrato + nitrito ( $r^2 = 0,184$ ). Já no tempo 4 h houve uma correlação mediana ( $r^2 = 0,551$ ) entre as Tc e as concentrações de nitrato + nitrito de todos os tratamentos, mas nenhuma correlação entre essas duas variáveis foi observada quando considerados apenas os tratamentos com as duas doses de LPS ( $r^2 = 0,001$ ).



**Fig. 2A-B.** **A-** A concentração plasmática de nitrato + nitrito 1 e 4 horas após a injeção intramuscular (im) de LPS (2 and 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) ou solução salina em pintainhos de 5 dias de idade. Número de animais entre parênteses (primeiro número refere-se ao tempo de 1h e segundo número refere-se ao tempo de 4h). \* Significa diferença estatística em relação ao grupo salina ( $p < 0,01$  e  $0,001$ , respectivamente). # Significa diferença estatística entre os grupos LPS 100 e LPS 2 ( $p < 0,001$ ). "Intacto" refere-se a animais que não receberam nenhuma injeção. **B-** Correlação entre a concentração plasmática de nitrato + nitrito e a Tc dos pintainhos de todos os grupos nos tempos 1h e 4 h e dos grupos LPS 2 e LPS100 no tempo 4h. Ta= 31-32°C.

#### 4.3 Protocolo 3: Efeito da injeção im de L-NAME sobre as alterações de Tc induzidas por LPS em pintainhos

A injeção intramuscular de L-NAME na dose de 50 mg/kg (Fig. 3) não alterou a Tc de pintainhos, mas aumentou a magnitude da queda da Tc induzida por LPS 100 mg/kg (Fig. 3B) e uma atenuação das respostas febris das duas doses de LPS, 2 e 100 mg/kg (Fig. 3C).

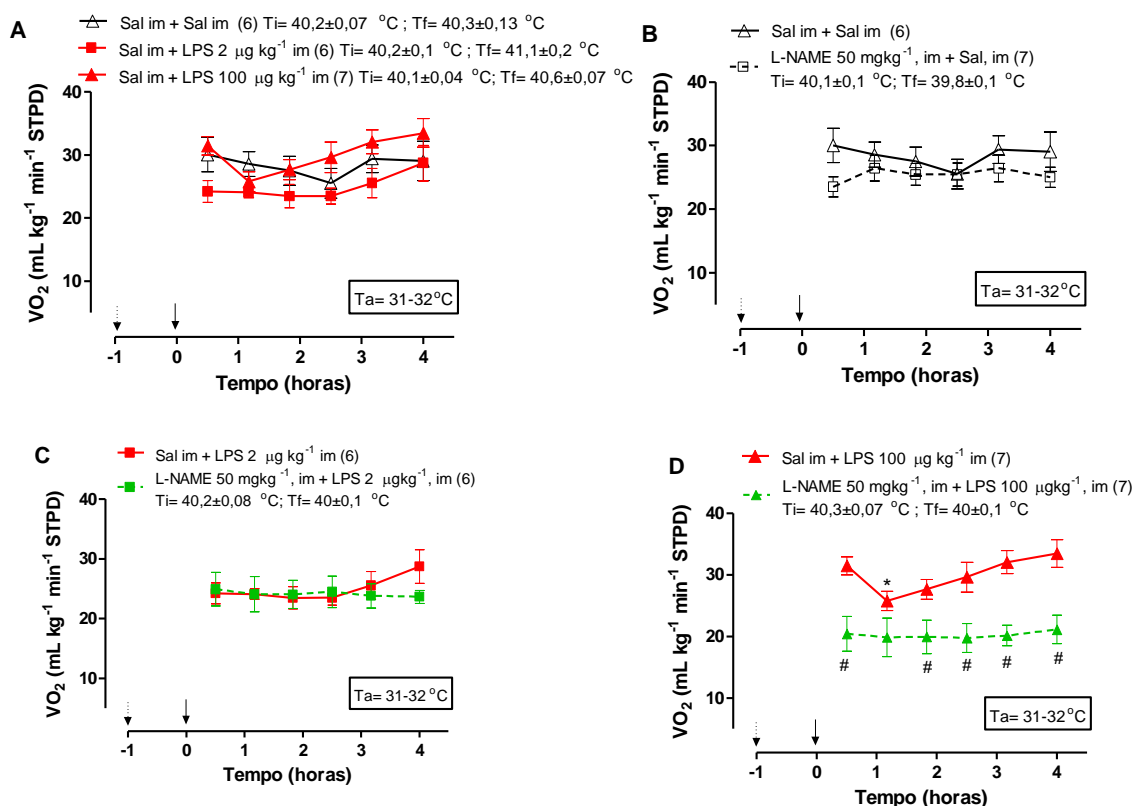


**Fig. 3 A-C:** **A-** Efeito do pretratamento com L-NAME (im) sobre as mudanças na temperatura corporal induzidas por LPS em pintainhos de 5 dias de idade. Os animais receberam injeção intramuscular (im) de L-NAME (50 mg/kg) ou salina apirogênica 1h antes da injeção im de LPS (2 and 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) ou salina. **B-** Índice térmico de pintainhos até 2 horas após a injeção im de LPS ou de veículo (0-2h). **C-** Índice

térmico de pintainhos 3-5 horas após injeção im de LPS ou veículo (3-5h). As setas tracejada e contínua indicam os tempos de injeção de L-NAME e LPS, respectivamente. \*\*\* indica diferença significativa em relação ao grupo sal ( $p < 0,001$ ). # indica diferença significativa em relação aos grupos LPS pretratados com L-NAME ( $p < 0,05$ ). Ta= temperatura ambiente.

#### 4.4 Protocolo 4: Efeito da injeção im de L-NAME e de LPS sobre o consumo de oxigênio de pintainhos

Na Fig. 4 é apresentado o efeito ao longo do tempo do LPS e do L-NAME ou salina sobre o consumo de oxigênio de pintainhos. A injeção im de salina não alterou o consumo de oxigênio. Esta variável foi reduzida 70 minutos após a injeção im de LPS  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Two-way ANOVA; efeito tempo:  $p < 0,05$ ). O consumo de oxigênio foi significativamente menor no grupo L-NAME + LPS 100 do que no grupo salina + LPS ( $P < 0.05$ ).

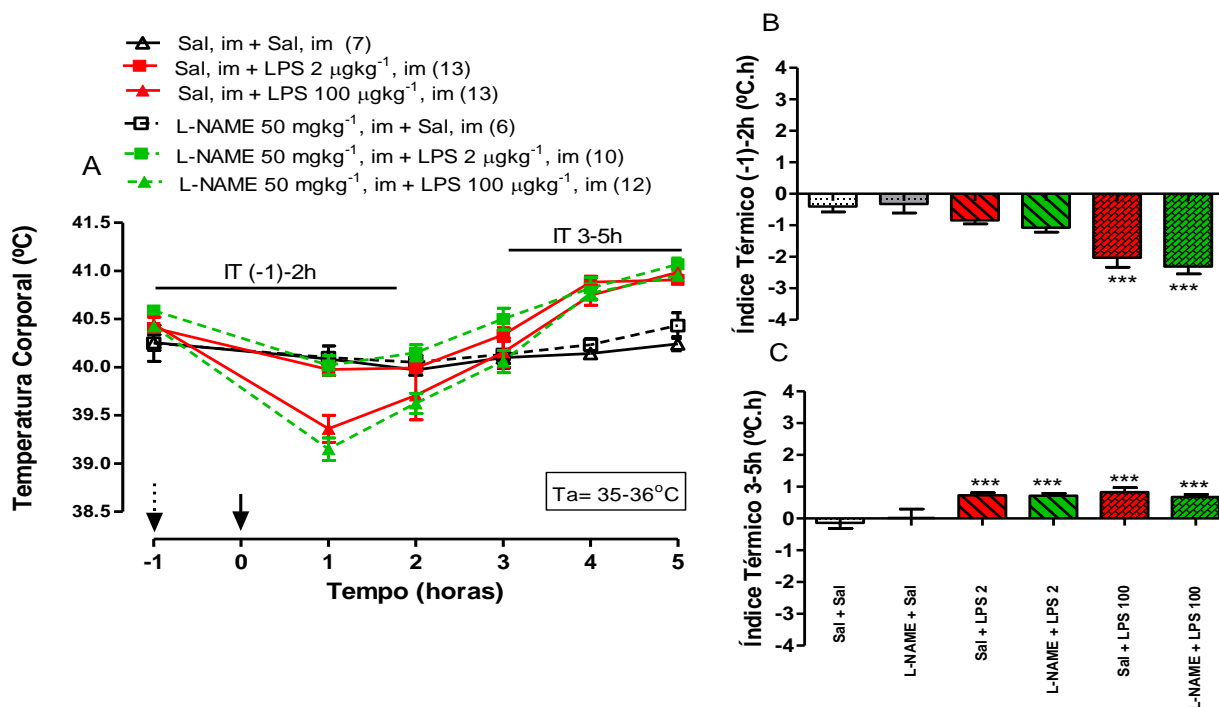


**Fig. 4 A-D:** Efeito das injeções intramusculares (im) de L-NAME ( $50 \text{ mg/kg}$ ) ou salina 50 minutos antes das injeções im de LPS ou salina sobre o consumo de oxigênio ( $\text{VO}_2$ ) de pintainhos de 5 dias de idade. **A-** Comparações entre as curvas dos tratamentos salina, LPS 2 e  $100 \text{ mg/kg}$ . **B-** Comparação entre as curvas dos tratamentos com salina precedidos do tratamento com salina (mesma curva do gráfico A) ou L-NAME. **C-** Comparação entre as curvas dos tratamentos com LPS  $2 \mu\text{g/kg}$  precedidos do tratamento com salina (mesma curva do gráfico A) ou L-NAME. **D-** Comparação entre as curvas dos tratamentos com LPS  $100 \mu\text{g/kg}$  precedidos do tratamento com salina (mesma curva do gráfico A) ou L-NAME. Ta=

temperatura ambiente. \* indica diferença significativa ao longo do tempo no mesmo tratamento ( $p < 0,05$ ). # indica diferença significativa no mesmo tempo entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5 Protocolo 5: Efeito da injeção im de L-NAME sobre as alterações de Tc induzidas por LPS em pintainhos submetidos a uma condição de calor ( $36^{\circ}\text{C}$ )

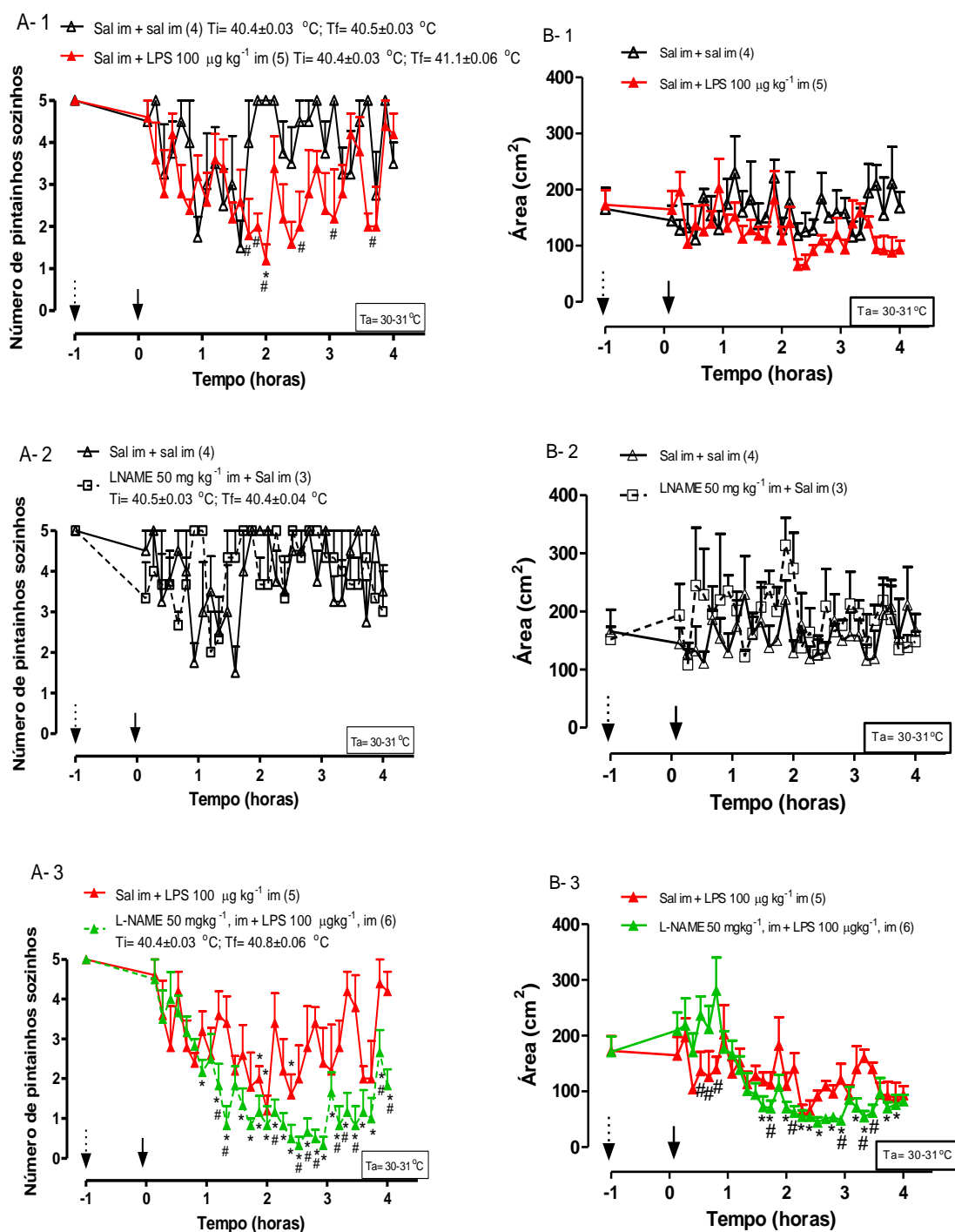
Na Fig 5. observou-se que, ao submeter os pintinhos a um ambiente quente, com temperatura em torno de  $35\text{-}36^{\circ}\text{C}$  não houve efeito da salina e do L-NAME sobre a Tc. Além disso, a dose menor de LPS induziu aumento da Tc 4-5 horas após a injeção, não sendo alterada pelo pre-tratamento com L-NAME (Fig. 5C). Em relação ao efeito da dose maior de LPS, esta causou queda e aumento da Tc 1 e 4-5 horas após a injeção, respectivamente, sendo que esses efeitos não foram afetados pelo L-NAME (Fig. 5B e C).



**Fig. 5 A-C:** A- Efeito do pretratamento com L-NAME (im) sobre as mudanças na temperatura corporal induzidas por LPS em pintainhos de 5 dias de idade mantidos em ambiente quente ( $35\text{-}36^{\circ}\text{C}$ ). Os animais receberam injeção intramuscular (im) de L-NAME ( $50 \text{mg/kg}$ ) ou salina apirogênica 1h antes da injeção im de LPS ( $2$  and  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) ou salina. B- Índice térmico de pintainhos até 2 horas após a injeção im de LPS ou de veículo (0-2h). C- Índice térmico de pintainhos 3-5 horas após injeção im de LPS ou veículo (3-5h). As setas tracejada e contínua indicam os tempos de injeção de L-NAME e LPS, respectivamente. \*\*\* indica diferença significativa em relação ao grupo salina ( $p < 0,001$ ).

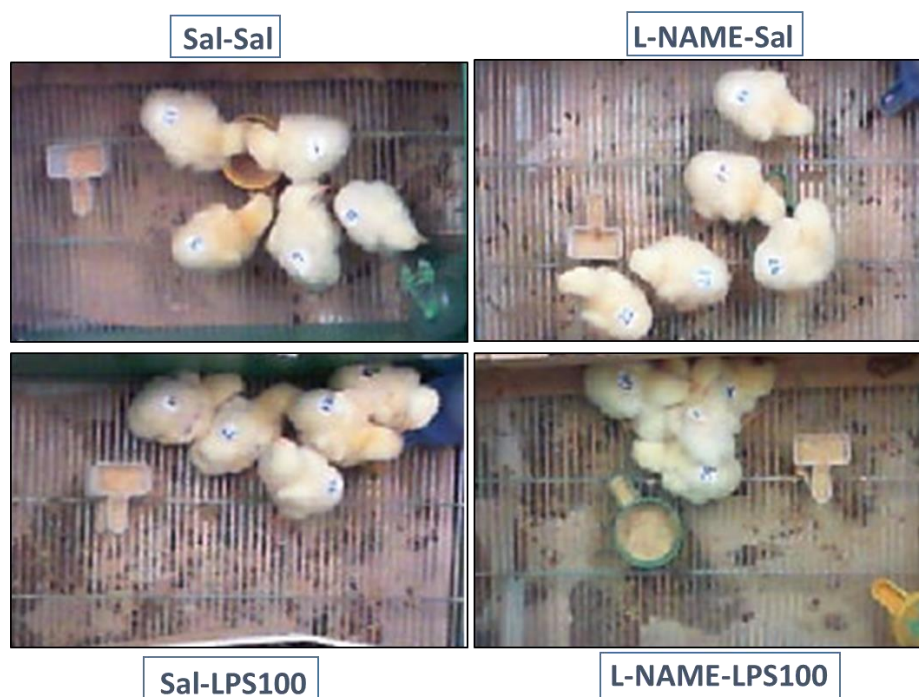
#### 4.6 Protocolo 6: Efeito da injeção im de L-NAME e LPS sobre a termorregulação comportamental de pintainhos

Os tratamentos com salina ou L-NAME não alteraram o número de indivíduos desagrupados (Fig. 6A) nem a área ocupada pelo grupo de pintainhos (Fig. 6B). A injeção de LPS induziu redução dos dois parâmetros analisados, sendo que o pretratamento com L-NAME intensificou essa resposta (Figs. 6A e B; Fig. 7).





**Fig. 6 A-B:** Efeito das injeções intramusculares (im) de L-NAME (50 mg/kg) ou salina 50 minutos antes das injeções im de LPS (100 µg/kg) ou salina sobre o número de indivíduos desagrupados (**A 1-3**) e a área total ocupada pelo grupo de pintainhos (**B 1-3**) de 5 dias de idade. **A1 e B1-** Comparação entre as curvas dos tratamentos com salina ou LPS precedidos do tratamento com salina. **A2 e B2-** Comparação entre as curvas dos tratamentos com salina precedido do tratamento com salina (mesmas curvas dos gráficos A1 e B1) ou L-NAME. **A3 e B3-** Comparação entre as curvas do tratamento com LPS 100 µg/kg precedido dos tratamentos com salina (mesmas curvas dos gráficos A1 e B1) ou L-NAME. Ta= temperatura ambiente. \* indica diferença significativa ao longo do tempo no mesmo tratamento ( $p < 0,05$ ). # indica diferença significativa no mesmo tempo entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).



**Fig. 7:** Fotos representativas dos grupos que receberam injeção intramuscular de salina (sal) ou L-NAME (50 mg/kg) seguida 50 minutos após pela injeção de LPS (100 µg/kg; LPS100) ou salina. As fotos são do tempo 152 minutos após a injeção de LPS ou salina. Temperatura ambiente de 30-31°C.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Termorregulação de pintainhos frente ao tratamento com LPS

No presente estudo, a dose mais baixa de LPS causou somente febre nos pintainhos, enquanto as doses mais elevadas causaram uma queda na Tc seguida por febre (Fig. 1). Este padrão de respostas a doses altas de LPS é semelhante ao observado em ratos em ambiente moderadamente frio, entre 20.5 e 24 °C (STEINER *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2006). No caso dos pintainhos, a temperatura ambiente (Ta) de 31-32 °C é considerada dentro do conforto térmico dos animais, já que eles apresentam comportamentos normais de exploração do ambiente, procura por alimento e água e não ficam agrupados (observações pessoais; veja foto do grupo sal-sal da Fig. 7). É interessante notar que, mesmo aumentando a Ta para 35-36°C (que não foi suficiente para aumentar a Tc em eutermia; Fig. 5) ainda foi possível observar a resposta de queda de Tc na primeira hora após injeção de LPS-100 nos pintainhos. Além disso, em patos adultos, injeção intravenosa de 100 µg/kg de LPS induz febre sem queda inicial da Tc (MALONEY e GRAY, 1998). Esses dados podem indicar que os pintainhos de frangos de corte são mais sensíveis ao LPS do que ratos e patos adultos.

Em ratos, ambas as respostas, aumento e queda de Tc frente ao LPS parecem ser reguladas, pois o animal seleciona maior Ta durante a resposta febril, e menor Ta durante a queda da Tc (ALMEIDA *et al.*, 2006). Neste caso, se a diminuição de Tc fosse uma hipotermia, seria esperada a seleção de Ta mais elevada pelo animal, evitando a redução da Tc, mas em vez disso, parece haver uma anapirexia, uma redução regulada da Tc (BÍCEGO *et al.*, 2007). Quanto aos dados em aves, demonstrou-se uma

grande redução na Tc, que não é seguida por febre, após a injeção intravenosa de LPS (cepa *E. coli* 0111:B4) numa dose tão alta quanto 10 mg/kg (dose 100 vezes maior do que a utilizada no presente estudo) em pintainhos de galinha poedeira de 4 dias de idade, o que leva à redução da sobrevivência dos animais (NIKAMI *et al.*, 2008). Já em galinhas de 5 semanas de idade, a dose de LPS (cepa *E. coli* O127:B8) de 2,5 mg/kg reduz a Tc e induz febre 2 e 10 horas após a injeção, respectivamente (DE BOEVER *et al.*, 2009). Não há nenhum estudo demonstrando essa regulação (anapirexia) ou não-regulação (hipotermia) da diminuição da Tc por altas doses de LPS em aves. No caso dos pintainhos do presente estudo, não foi possível verificar alguma alteração comportamental (espalhamento maior dos indivíduos do grupo) induzida pela maior dose do LPS na primeira hora pós injeção (Fig. 6 A e B), o que talvez seria mais evidente caso os animais fossem expostos ao frio. Entretanto, pode-se verificar que o agrupamento dos pintainhos é inibido até próximo de 2 horas após a injeção de LPS (coincidindo com a queda de Tc) e é ativado após esse tempo (coincidindo com o aumento progressivo da Tc) (Fig. 6A). Mais estudos são necessários para confirmar se a queda de Tc frente a altas doses de LPS é realmente uma resposta regulada, ou seja, uma anapirexia.

LPS-100 diminuiu o consumo de oxigênio uma hora após a injeção (Fig. 5), coincidindo com a diminuição da Tc (Figs. 1-5), voltando a aumentar após 3 horas, quando a Tc é aumentada. Estas semelhanças no curso do tempo da Tc e da taxa metabólica indicam que a redução da Tc é principalmente devida à diminuição da termogênese. Esta é a primeira vez que isso é demonstrado em aves. O mesmo padrão é observado em ratos abaixo da termoneutralidade (DE RIJK *et al.*, 1994), o que pode sugerir que essa resposta é amplamente distribuída entre endotérmicos. Em seres humanos adultos (PARRILLO *et al.*, 1990), ratos (GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2002) e

galinhas de 5 semanas de idade (DE BOEVER *et al.* De 2009) a redução da Tc coincide com hipotensão. Apesar de não ter sido medida a pressão arterial de nossos pintainhos, podemos especular que esta variável também seja reduzida durante a queda de Tc.

Para induzir o aumento da Tc e desenvolver febre, os pintainhos utilizaram os mecanismos de produção (Fig. 4) e conservação de calor (Fig. 6). Foi observado aumento da taxa metabólica 3-4 horas após injeção de LPS-100 e tendência de aumento não significativo após 4 horas da injeção de LPS-2. Quando havia a possibilidade da termorregulação comportamental os pintainhos utilizaram-se do agrupamento, redução da superfície de contato com o ambiente, na fase de aumento da Tc após injeção de LPS-100. Além disso, observa-se também que o comportamento auxilia em grande parte no aumento da Tc, pois, ao ter a possibilidade de termorregular comportamentalmente, observou-se um aumento maior da Tc após 4h da injeção de LPS-100 (Fig 6- A1,  $T_f - T_i = \sim 0.7 \text{ }^\circ\text{C}$ ), quando comparado com o experimento de respirometria, no qual os animais ficaram isolados na câmara experimental, apresentando um aumento de temperatura menor (Fig. 5 A,  $T_f - T_i = \sim 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

### 5.2 Óxido Nítrico e febre/queda de Tc induzida por LPS em pintainhos

A administração periférica de LPS desencadeia expressão de NOS induzível (NOSi), resultando na produção abundante de NO tanto em frangos de 5 semanas de idade (BOWEN *et al.*, 2007) quanto em ratos (SAIA *et al.*, 2008). Em nossos pintainhos de 5 dias de idade, a concentração plasmática de nitrito + nitrato não se alterou 1 hora após a injeção de nenhum dos tratamentos, mas aumentou significativamente no tempo 4 horas para ambas as doses de LPS (Fig. 2). Resultados semelhantes foram relatados em frangos de 3,8 kg de massa corporal, em que a injeção intravenosa de LPS de *Salmonella typhimurium* (1 mg/kg) induz aumento de nitrato plasmático 5h, mas não

2h, após a injeção (CHAPMAN e WIDMAN, 2006). Esse perfil de resposta também é verificado em ratos, em que as concentrações plasmáticas de nitrato não aumentaram antes de 2h após a injeção intravenosa de uma alta dose de LPS (GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2004). Em pintainhos de 4 dias de idade, a concentração de nitrito e a expressão de RNAm da NOSi aumentam no pulmão e no fígado 3 horas após a injeção de LPS 10 mg/kg (NIKAMI *et al.*, 2008). Estes fatos poderiam indicar que o NO originado na periferia está envolvido na sinalização ao SNC para mudanças na Tc induzidas pela endotoxina. Entretanto, várias outras evidências do presente estudo e da literatura são contrárias a essa hipótese.

Não foi observada correlação entre as alterações de Tc induzidas por LPS 2 e 100 µg/kg e as concentrações plasmáticas dos produtos do metabolismo do NO nos nossos pintainhos (Fig. 2). A concentração plasmática de nitrito + nitrato 4h após injeção de LPS-100 é cerca de 2,6 vezes maior do que a de LPS-2 sendo que a Tc apresenta aumentos semelhantes em ambos os grupos (Figs. 1 e 3). Tal resultado pode ser indicativo de ausência de participação do NO periférico tanto na queda quanto no aumento da Tc induzidos por LPS. Evidência em ratos é consistente com a idéia de uma ação do NO no encéfalo e não na periferia, como sinalização para a febre e choque endotoxêmicos (GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2003; STEINER *et al.*, 2004; SOSZYNSKI *et al.*, 2013). Neste caso, foi sugerido que a redução da Tc e a hipotensão por altas doses de LPS em ratos pode envolver uma liberação dependente de arginina vasopressina (AVP) no hipotálamo (GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2002; 2003).

De acordo com Pereira *et al.*, (2006) e Mortola e Feher (1998) ratos neonatos termorregulam pelo comportamento, ficando mais unidos quando expostos a uma Ta baixa e se espalhando quando submetidos à hipóxia (indutor de anapirexia) nessa mesma Ta. No caso da febre, por ser um aumento regulado da temperatura corporal

(resposta oposta à anapirexia; IUPS Glossary, 2001), é esperado que os animais jovens que nascem ou eclodem em grupos optem por ficarem mais juntos, como uma forma de elevar, ou auxiliar na manutenção de sua Tc mais alta (semelhante ao que ocorre no frio). Os pintainhos do presente estudo preferiram ficar mais unidos no momento em que começou a aumentar sua Tc após a injeção LPS-100 (Fig.6 A-1 e B-1). Já no grupo “L-NAME+LPS100” mantido a 31-32°C a diminuição da Tc foi potencializada no início (1h) e o subsequente aumento da Tc foi reduzido (Fig. 3), enquanto a taxa metabólica permaneceu baixa todo o tempo (Fig. 4 D). Nesse caso, o pré-tratamento com L-NAME induziu um maior agrupamento dos pintainhos a partir do tempo 2h depois da injeção de LPS-100 quando comparado ao grupo “Salina + LPS100” (Figs 6 e 7), indicando que os animais ativaram ainda mais os mecanismos comportamentais de conservação de calor para compensar a redução da termogênese pelo L-NAME (Fig. 4). Caso o L-NAME estivesse inibindo uma via nitrérgica sinalizadora de febre, seria esperado que este agente inibisse todos os termofetores de ganho de calor, autonômicos e comportamentais. Vale mencionar que o L-NAME é um agente vasoconstritor e que, portanto, deve atuar aumentando a conservação de calor e evitando a queda de pressão arterial durante o choque endotoxêmico, mas mesmo assim, causou maior queda de Tc e inibiu o aumento subsequente da Tc dos pintainhos. Juntos, esses resultados indicam que o L-NAME atenua a termogênese nos pintainhos com desafio pirogênico do LPS e, para compensar essa falha da produção de calor, os animais potencializam a atividade de outros efetores, como o comportamental, para aumentar a Tc. Isto é evidenciado também pela falta de efeito do L-NAME sobre a Tc dos animais tratados com LPS-2 ou LPS-100 e mantidos em ambiente quente (Fig. 5). Nessa condição, não há grande demanda termogênica para aumento da Tc induzida por um agente pirogênico, pois há uma menor tendência à perda de calor corporal para o

ambiente e, portanto, a inibição da termogênese não constitui um fator limitante para a alteração da Tc. Estudos em ratos também mostram que ocorre efeito inibidor do L-NAME do aumento da Tc frente ao LPS quando os animais são expostos a 24 °C, mas nesse caso, efeito oposto, isto é, aumento maior de Tc, é observado a 31°C (STEINER *et al.*, 2004). Além disso, em ratos não infectados, o L-NAME não afeta a Tc de animais a 30°C mas reduz essa variável quando são expostos a 18°C (KAMERMAN *et al.*, 2003).

Esse cenário em relação aos pintainhos do presente estudo parece ser o mesmo relatado por Gray *et al.* (2005) sobre a inibição do aumento de Tc pelo L-NAME periférico em patos adultos tratados com LPS. É interessante notar que esse efeito termogênico do NO periférico deve ter sido conservado nos animais endotérmicos, aves e mamíferos. Como mencionado acima, Kamerman *et al.* (2003) demonstrou que o L-NAME afeta termogênese em ratos expostos ao frio e várias evidências indicam que o NO na periferia não atua como sinalizador febril também em ratos (STEINER e BRANCO, 2001; STEINER *et al.*, 2004). Os efeitos inibidor e estimulador da injeção sistêmica de L-NAME sobre a febre e a redução da Tc, respectivamente, induzidas por altas doses de LPS, parecem ser resultado da inibição direta da termogênese no tecido adiposo marron (TAM) em ratos. As aves, diferentemente dos mamíferos, não possuem TAM, assim produzem calor utilizando termogênese por tremor, ou até sem tremor, em músculo esquelético. Ainda não é bem definido como as aves geram energia térmica sem tremor, mas existem evidências sugerindo mecanismos dependentes de Ca<sup>2+</sup> (BÍCUDO *et al.*, 2002) ou da atividade de proteínas desacopladoras de prótons, avUCP (COLLIN *et al.*, 2003) ou hmUCP (BÍCUDO *et al.*, 2002), análogas à UCP-1 do TAM de mamíferos (revisão de BÍCEGO *et al.*, 2007). Mais estudos são necessários para identificar o efeito do óxido nítrico nos mecanismos termogênicos específicos de aves.

Não pode ser descartada a hipótese de que os resultados observados no presente estudo teriam influência da idade dos animais, já que utilizamos animais de 5 dias de vida pós-eclosão. Entretanto, as semelhanças de respostas observadas nos nossos pintainhos em relação àquelas de ratos adultos ou frangos e galinhas mais velhos (STEINER *et al.*, 2004; CHENG, *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2006; DE BOEVER *et al.*, 2009), como descrito acima, e o fato dos frangos serem animais de desenvolvimento precoce, sendo capazes de ativar termorregulação autonômica e comportamental logo no início da vida pós-eclosão (cf. DAWSON e WHITTOW, 2000, Mortola, 2009; Toro *et al.* 2014) indica que o NO periférico parece atuar na termogênese tanto de aves quanto mamíferos, mas não deve constituir um sinal febrigênico para o SNC nesses animais. É evidente que são necessários mais estudos para confirmar essa hipótese.



## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados do presente estudo são consistentes com a noção de que o óxido nítrico sistêmico não parece estar envolvido na febre e na queda da Tc induzidas por LPS, sendo que os efeitos do L-NAME periférico estão mais relacionados com a inibição da termogênese do que da sinalização febril em pintainhos de 5 dias.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALMEIDA, M.C.; STEINER, A.A.; BRANCO, L.G.; ROMANOVSKY, A.A. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. **The European Journal of Neuroscience**, 23(12):3359-67, 2006.

ARCHER, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **FASEB J.**, 7:349–360, 1993.

AKARSU, E.; MAMUK, S. Escherichia colilipopolysaccharides produce serotype-specific hypothermic response in biotelemetered rats. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, 292, R1846R1850, 2007.

BEGG, D.P.; KENT, S.; MCKINLEY, M.J.; MATHAI, M.L. Suppression of endotoxin-induced fever in near-term pregnant rats is mediated by brain nitric oxide. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 292, 2174–2178, 2007.

BEGG, D.P.; MATHAI, M.L.; MCKINLEY, M.J.; FRAPPELL, P.B.; KENT, S. Central nitric oxide synthase inhibition restores behaviorally mediated lipopolysaccharide induced fever in near-term rats. **Physiol. Behav.**, 94, 630–634, 2008.

BÍCEGO, K.C.; BARROS, R.C.H.; BRANCO, L.G.S. Physiology of temperature regulation: Comparative aspects. **Comp. Biochem. and Physiol.**, 147: 616–639, 2007.

BICUDO, J.E.P.W.; BIANCO, A.C.; VIANNA, C.R. Adaptive thermogenesis in hummingbirds. **The Journal of Experimental Biology**, 205, 2267–2273, 2002.

BLATTEIS, C.M. e SEHIC, E. Fever: how may circulating pyrogens signal the brain? **News Physiol. Sci.**, 12: 1-9, 1997.

BLATTEIS, C.M. Body temperature. In: Blatteis CM (ed) *Physiology and Pathophysiology of temperature regulation*. **World Scientific**, cap. 2: 15-21, 1998.

BLATTEIS, C.M.; SEHIC, E.; LI, S. Pyrogen sensing and signaling: old views and new concepts. **Clin. Infect. Dis.**, 31(S5): S168-S177, 2000.

BLATTEIS, C.M.; SEHIC, E. Citokynes and fever. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 840: 608-618, 2006.

BOULANT, J.A. Hypothalamic neurons: mechanisms of sensitivity to temperature. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 856: 108-115, 1998.

BOULANT, J. A. Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. **J Appl Physiol**, 100: 1347–1354, 2006.

BOWEN, O.; ERF, G.; CHAPMAN, M.; WIDEMAN, R. Plasma nitric oxide concentrations in broilers after intravenous injections of lipopolysaccharide or microparticles. **Poultry Science**, 86, 2550-2554, 2007.

BRANCO, L. G. S.; GARGAGLIONI, L. H.; BARROS, R. C. H. Anapyrexia during hypoxia. **Journal of Thermal Biology.**, 31: 82–89, 2006.

CHAPMAN, M.E.; WIDEMAN, R.F.JR. Evaluation of total plasma nitric oxide concentrations in broilers infused intravenously with sodium nitrite, lipopolysaccharide, aminoguanidine, and sodium nitroprusside. **Poult Sci.**, 85(2):312-20, 2006.

CHENG, H.W.; FREIRE, R.; PAJOR, E.A. Endotoxin stress responses in chickens from different genetic lines. 1. Sicknes, behavioral, and physical responses. **Poult. Sci.**, 83(5):707-15, 2004.

COLEONE, A.C.; TORRES, K.A.A.; CARNIO, E.C.; GARGAGLIONI, L.H.; MACARI, M.; FURLAN, R.L.; BÍCEGO, K.C. Role of brain nitric oxide in the thermoregulation of broiler chicks. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 154, 204-210, 2009.

COLLIN,A.; BUYSE, J.; VAN AS, P.; DARRAS, V.M.; MALHEIROS, R.D.; MORAES,V.M.B., REYNS,G.E., TAOUIS, M., DECUYPERE, E. Cold induced

enhancement of avian uncoupling protein expression, heat production, and triiodothyronine concentrations in broiler chicks. **General and Comparative Endocrinology**, 130, 70–77, 2003.

COOPER, K. E. Fever and antipyresis: the role of the nervous system. Cambridge, UK: **Cambridge University Press**, 1995.

CORRIGAN, J.J.; FONSECA, M.T.; FLATOW, E.A.; LEWIS, K.; STEINER, A.A. Hypometabolism and hypothermia in the rat model of endotoxic shock: independence of circulatory hypoxia. **J Physiol.**, 592: 3901-16, 2014.

DAWSON, W.R.; WHITTOW, G.C. Regulation of body temperature. In: Whittow, G.C. (ed.) **Sturkie's Avian Physiology**, Orlando, Academic Press, cap 14: 344-390, 2000.

DE BOEVER, S.; CROUBELS, S.; MEYER, E., SYS, S.; BEYAERT, R.; DUCATELLE, R.; DE BACKER, P. Characterization of an intravenous lipopolysaccharide inflammation model in broiler chickens. **Avian Pathology**, 38:5,403-411, 2009.

DE RIJK, R.; VAN KAMPEN, H.M.; ROOIJEN, N.V.; BERKENBOSCH, F. Hypothermia to endotoxin involves reduced thermogenesis, macrophage-dependent mechanisms, and prostaglandins. **Am. J. Physio.**, 266 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 35): R1-R8, 1994.

DAWSON, W.R.; WHITTOW, G.C. Regulation of body temperature. **Sturkie's Avian Physiology.**, cap 14: 344-390, 2000.

ERIKSSON, S.; HJELMQVIST, H.; KEIL, R.; GERSTBERGER, R. Central application of a nitric oxide donor activates heat defense in the rabbit. **Brain Res.**, 774, 269-273, 1997.

FRAIFELD, V.; BLAICHER-KULICK, R.; DEGEN, A.A.; KAPLANSKI, J. Is hypothalamic prostaglandin E2 involved in avian fever? **Life Sci.**, 56(16): 1343-1346, 1995.

GERSTBERGER, R. Nitric oxide and body temperature control. **News Physiol. Sci.**, 14: 30–36, 1999.

GILBERT, C.; BLANC, S.; MAHO, Y.L.; ANCEL, A. Energy saving processes in huddling emperor penguins: from experiments to theory. **J Exp. Biol.**, 211: 1-8, 2008.

GIUSTI-PAIVA, A.; DE CASTRO, M.; RODRIGUES, J.A.; CARNIO, E.C. Inducible nitric oxide synthase pathway in the central nervous system and vasopressin release during experimental septic shock. **Crit Care Med.**, Vol. 30, No. 6, 2002.

GIUSTI-PAIVA, A.; BRANCO, L.G.S.; DE CASTRO, M.; RODRIGUES, J.A.; CARNIO, E.C. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock:involvement of vasopressin. **Eur J Physiol.**, 447: 175–180, 2003.

GIUSTI-PAIVA, A., MARTINEZ, M.R., FELIX, J.V.C., ROCHA, M.J.A., CARNIO, E.C., ELIAS, L.L.K., RODRIGUES, J.A. Simvastatin decreases nitric oxide overproduction and reverts the impaired vascular responsiveness induced by endotoxic shock in rats. **Shock**, Vol. 21, No. 3, pp. 271–275, 2004.

GORDON, C.J. The therapeutic potential of regulated hypothermia. **Emerg. Med. J.**, 18: 81-89, 2001.

GRAY, A.D.; MALONEY, S.K.; KAMERMAN, P.R. Lipopolysaccharide-induced fever in Pekin ducks is mediated by prostaglandins and nitric oxide and modulated by adrenocortical hormones. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 289, 1258-1264, 2005.

GUERRA, A.R.G.; GARGAGLIONI, L.H; SOUZA, C.R.N.; ABE, A.S.; BRANCO, L.G.S.; BÍCEGO, K.C. Role of central nitric oxide in behavioral thermoregulation of toads during hypoxia. **Physiol. Behav.**, 2008.

IUPS THERMAL COMMISSION. Glossary of terms for thermal physiology. **Jpn J. Physiol.**, 51:245-80, 2001.

JOHNSON, R.W.; CURTIS, S.E.; DANTZER, R.; KELLEY, K.W. Central and peripheral prostaglandins are involved in sickness behavior in birds. **Physiol. Behav.**, 53(1): 127-131, 1993.

KAMERMAN, P.R.; LABURN H.P.; MITCHELL D. Inhibitors of nitric oxide synthesis block cold-induced thermogenesis in rats. **Can J Physiol Pharmacol.**, 81(8):834-8, 2003.

KLUGER, M.J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiol. Rev.**, 71(1): 93-127, 1991.

LACERDA, A.C.; MARUBAYASHI, U.; COIMBRA, C.C. Nitric oxide pathway is an important modulator of heat loss in rats during exercise. **Brain Res. Bulletin**, 67, 110-116, 2005.

MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GREGORUT, F.P.; SECATO, E.R.; GUERREIRO, J.R. Effects of endotoxin, interleukin-1 beta and prostaglandin injections on fever response in broilers. **Brit. Poul. Sci.**, 34: 1035-1042, 1993.

MACKOWIAK, P.A.; PLAISANCE, K.I. Benefits and risks of antipyretic therapy. **Ann. N. Y. Acad Sci.**, 29; 856:214-23, 1998.

MALONEY, S.K.; GRAY, D.A. Characteristics of the febrile response in Pekin ducks. **J. Comp. Physiol B.**, 168(3):177-82, 1998.

MARUYAMA, M.; NISHI, M.; KONISHI M.; TAKASHIGE, Y.; NAGASHIMA, K.; KIYOHARA, T.; KANOSUE, K. Brain regions expressing Fos during thermoregulatory behavior in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 285(5):R1116-23, 2003.

MATHAI, M.L.; HEJELMQVIST, H., KEIL, R. GERSTBERGER, R. Nitric oxide increases cutaneous and respiratory heat dissipation in conscious rabbits. **Am. J. Physiol.**, 272, 1691-1697, 1997.

MATSUDA, T.; HORI, T.; NAKASHIMA, T. Thermal and PGE<sub>2</sub> sensitivity of the organun vasculosum lamina terminalis region and preoptic area in rat brain slices, **J. Physiol.**, 454 pp. 197–212., 1992.

MILTON, AS. Thermoregulatory actions of eicosanoids in the central nervous system with particular regard to the pathogenesis of fever. **Ann NY Acad Sci.**, 559: 392-410, 1989.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43(2), 109-142, 1991.

MORRISON, S.F.; NAKAMURA, K. Central neural pathways for thermoregulation. **Front. Biosci. (Landmark Ed)**., 1;16:74-104., 2011.

MORTOLA, J.P.; FEHER, C. Hypoxia inhibits cold-induced huddling in rat pups. **Respir. Physiol.**, 113(3):213-22, 1998.

MORTOLA, J.P. Gas exchange in avian embryos and hatchlings. **Comp. Biochem. Physiol. A**, 153: 359–377, 2009.

NAGASHIMA T.; OHINATA H.; KUROSHIMA A. Involvement of nitric oxide in noradrenaline-induced increase in blood flow through brown adipose tissue. **Life Sci.**, 54(1):17-25, 1994.

NIKAMI, H.; MAHMOUD, M.E.; SHIMIZU, Y.; SHIINA, T.; HIRAYAMA, H.; IWAMI, M.; DOSOKY, R.M.; AHMED, M.M.; TAKEWAKI, T. Capsaicin pretreatment attenuates LPS-induced hypothermia through TRPV1-independent mechanisms in chicken. **Life Science**, v.82(23-24), 2008..

NETEA, M.G.; KULLBERG, B.J.; VAN DER MEER, J.W. Circulating cytokines as mediators of fever. **Clin. Infect. Dis.**, 31(s5): S178-S184, 2000.

OKA, K.; OKA, T.; HORI, T. Prostaglandin E<sub>2</sub> may induce hypothermia through EP1 receptor in the anterior wall of the third ventricle and neighboring preoptic regions. **Brain Res.**, 767: 92-99, 1997.

PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327, 524–526, 1987.

PARRILLO, J.E.; PARKER, M.M.; NATANSON, C.; SUFFREDINI, A.F.; DANNER, R.L.; CUNNION, R.E.; OGNIBENE, F.P. Septic shock in humans: Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. **Annals of Internal Medicine**, v. 113(3):227-42, 1990.

PEREIRA, D.H.; BRANCO, L.G.; CÁRNIO, E.C.; BARROS, R.C. nNOS is involved in behavioral thermoregulation of newborn rats during hypoxia. **Physiol. Behav.**, 30;89(5):681-6, 2006.

ROSTAGNO, H. S.; SILVA, D.J.; COSTA, P.M. Composição de alimentos e exigências nutricionais de aves e suínos. **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa. M.G., 11-13, 2000.

ROMANOVSKY, A.; SHIDO, O.; SAKURADA, S.; SUGIMOTO, N.; NAGASAKA, T. Endotoxin shock: thermoregulatory mechanisms. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v270, R693R703, 1996.



ROMANOVSKY, A.; SHIDO, O.; SAKURADA, S.; SUGIMOTO, N.; NAGASAKA, T. Endotoxin shock-associated hypothermia. How and why does it occur? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.813, 733-737, 1997.

ROTH, J.; DE SOUZA, G.E. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokines formation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 34(3): 301-314, 2001.

SAIA, R.; ANSELMO-FRANCI, J.; CARNIO, E. Hypothermia during endotoxemic shock in female mice lacking nitric oxide synthase. **Shock**, 29, 119-126, 2008.

SCAMMELL, T.E.; ELMQUIST, J.K.; GRIFFIN, J.D.; SAPER, C.B. Ventromedial preoptic prostaglandin E<sub>2</sub> activates fever-producing autonomic pathways. **J Neurosci.**, v16: 6246-6254, 1996.

SCAMMELL, T.E.; GRIFFIN, J.D.; ELMQUIST, J.K.; SAPER, C.B. Microinjection of a cyclooxygenase inhibitor into the anteroventral preoptic region attenuates LPS fever. **Am. J. Physiol.**, 43: R783-R789, 1998.

SCHROTT, L.M.; SWEENEY, W.; BODENSTEINER, K.; SPARBER, S.B. Ritanserin exposure during late embryogenesis fails to alter the behavioral, febrile, and corticosterone response to lipopolysaccharide in young chickens. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 64, 81-89, 1999.

SCHROTT, L.M., SWEENEY, W., BODENSTEINER, K., SPARBER, S.B. Ritanserin exposure during late embryogenesis fails to alter the behavioral, febrile, and corticosterone response to lipopolysaccharide in young chickens. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v64, 81-89, 1999.

SCHROTT, L.M.; SPARBER, S.B. Embryonic "binge" cocaine exposure alters neural-immune and neural-endocrine interactions in young chickens: involvement of 5-HT<sub>2</sub> receptors. **Dev. Brain Res.**, v130, 99-107, 2001.

SCHROTT, L.M.; SPARBER, S.B. Suppressed fever and hypersensitivity responses in chicks prenatally exposed to opiates. **Brain Behav. Immun.**, v18: 515-525, 2004.

SORIANO R.N.; RAVANELLI, M.I.; BATALHAO, M.E.; CARNIO, E.C.; BRANCO, L.G.S. Proipyretic role of the locus coeruleus nitric oxide pathway. **Exp. Physiol.**, 95.6 pp 669–677, 2010.

SOSZYNSKI, D.; DANILUK, M.; GALAZKA, M.; DMITRUK, K. Blockade of nitric oxide formation in the rat brain does not disturb development of endotoxin tolerance. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 64, 6, 779-788, 2013.

STEINER, A.A.; BRANCO, L.G.S. Nitric oxide in the regulation of body temperature and fever, **J. Therm. Biol.**, 26 (2001), pp. 325–330, 2001.

STEINER, A.A.; BRANCO, L.G.S. Hypoxia-induced anapyrexia: implications and putative mediators. **Ann. Rev. Physiol.**, 64: 263-288, 2002a.

STEINER, A.A.; RODRIGUES, J.A., MCCANNIS, S.M., BRANCO, L.G.S. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp. Physiol.**, 282: R584–R593, 2002b.

STEINER, A.A.; RUDAYA, A.Y.; IVANOV, A.I.; ROMANOVSKY, A.A. Febrigenic signaling to the brain does not involve nitric oxide. **British Journal of Pharmacology**, 141, 1204–1213, 2004.

TODA, N.; AYAJIKI, K. Phylogenesis of constitutively formed nitric oxide in non mammals. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v157, 31-80, 2006.

TORO-VELASQUEZ, P.A.; BÍCEGO, K.C.; MORTOLA, J.P. Chicken hatchlings prefer ambient temperatures lower than their thermoneutral zone. **Comp. Biochem. Physiol. A**, 176: 13–19, 2014.

WANG, J.; WANG, S.; XIANG, R.; SUN, W. Effect of L-NAME on pulmonary arterial pressure, plasma nitric oxide and pulmonary hypertension syndrome morbidity in broilers. **Br. Poul Sci.**, 43(4), 615-620, 2002.

WEIDONG, S.; XIAOLONG, W.; JINYONG, W.; RUIPING, X. Pulmonary arterial pressure and eletrocardiograms in broiler chickens infused intravenously with L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase, or sodium nitroprusside (SNP), a nitric oxide donor. **Br. Poul Sci.**, 43(2), 306-312, 2002.

WIDEMAN, R.F.; CHAPMAN, M.E.; WANG, W.; ERF, G.F. Immune Modulation of the Pulmonary Hypertensive Response to Bacterial Lipopolysaccharide (Endotoxin) in Broilers. **Poul. Sci.**, 83, 624–637, 2004.

WOJCIECHOWSKI, M.S.; JEFIMOW, M.; PINSHOW, P. Heterothermy, and the energetic consequences of huddling in small migrating passerine birds. **Int. Comp. Biol.**, 51 (3): 409–418, 2011.