

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 21/09/2022.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANAPIREXIA E FEBRE EM RESPOSTA A ENDOTOXINA EM
AVES:
DESAFIOS METABÓLICOS E MEDIADORES BIOQUÍMICOS**

Lara do Amaral Silva

Mestre em Zootecnia

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANAPIREXIA E FEBRE EM RESPOSTA A ENDOTOXINA EM
AVES:
DESAFIOS METABÓLICOS E MEDIADORES BIOQUÍMICOS**

Lara do Amaral Silva

Orientadora: Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Zootecnia (Bioquímica e Fisiologia Animal)

A485a Amaral-Silva, Lara do
 Anapirexia e febre em resposta a endotoxina em aves : Desafios metabólicos e mediadores bioquímicos / Lara do Amaral-Silva. -- Jaboticabal, 2020
 178 p. : il., tabs., fotos

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
 Orientadora: Kênia Cardoso Bicego

 1. Anapirexia. 2. Ciclo-oxigenase. 3. Desafios metabólicos. 4. Febre. 5. Pintinhos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ANAPIREXIA E FEBRE EM RESPOSTA A ENDOTOXINA EM AVES: DESAFIOS METABÓLICOS E MEDIADORES BIOQUÍMICOS

AUTORA: LARA DO AMARAL SILVA

ORIENTADORA: KÊNIA CARDOSO BÍCEGO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. KÊNIA CARDOSO BÍCEGO

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV/UNESP



Prof. Titular LUIZ GUILHERME DE SIQUEIRA BRANCO

Departamento de Fisiologia / USP - Ribeirão Preto/SP

(VIDEOCONFERÊNCIA)



Prof. Dr. GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

(VIDEOCONFERÊNCIA)



Profa. Dra. MARIA CAMILA ALMEIDA

PPG em Biosistemas / Universidade Federal do ABC - SP

(VIDEOCONFERÊNCIA)



Prof. Dr. JOÃO PALERMO NETO

FMVZ/USP / São Paulo/SP

(VIDEOCONFERÊNCIA)



Jaboticabal, 21 de setembro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Lara do Amaral Silva- Filha de Uilson Roberto Silva e Marcia Maria do Amaral, nasceu no dia 20 de agosto de 1991 na cidade de São Paulo- SP. Ingressou no curso de Zootecnia da Universidade do Oeste Paulista em 2009 e concluiu este como melhor aluna da turma em 2012. Durante o período de graduação realizou iniciação científica sob orientação da professora Dra. Lilian Francisco Arantes de Souza onde foi bolsista PROBIC nos anos de 2010 e 2011. Em março de 2014 iniciou o Mestrado pelo programa de pós graduação em Zootecnia (Área de concentração: Bioquímica e Fisiologia Animal) pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista- UNESP, campus de Jaboticabal, sob orientação da professora Dra. Kênia Cardoso Bicego, onde foi bolsista CNPq e FAPESP. Em fevereiro de 2016 defendeu a dissertação de mestrado sendo considerada aprovada pela banca examinadora. Em março de 2016 Lara iniciou o curso de doutorado também pelo programa de pós graduação em Zootecnia (Área de concentração: Bioquímica e Fisiologia Animal) pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista- UNESP, campus de Jaboticabal, sob orientação da professora Dra. Kênia Cardoso Bicego. De abril de 2018 até abril de 2019 Lara fez intercâmbio institucional na “University of North Texas”, Estados Unidos da América sob a supervisão do professor Dr. Warren W. Burggren. Durante o curso de doutorado, foi bolsista CNPq e FAPESP, agência que também financiou o período de intercâmbio pelo programa BEPE-FAPESP. Em setembro de 2020 submeteu-se à defesa da tese para obtenção do título de Doutor no qual foi aprovada por unanimidade.

EPÍGRAFE

“Next time your found, with your chin on the ground
There a lot to be learned, so look around

Just what makes that little old ant
Think he'll move that rubber tree plant
Anyone knows an ant, can't
Move a rubber tree plant

But he's got high hopes, he's got high hopes
He's got high apple pie, in the sky hopes

So any time your gettin' low
'stead of lettin' go
Just remember that ant
Oops there goes another rubber tree plant”

High Hopes, Doris Day

AGRADECIMENTOS

Este trabalho e minha caminhada durante o doutorado foram sonhos realizados em conjunto, desde a construção dos conhecimentos necessários, das oportunidades, da minha possibilidade de trabalhar com pesquisa até a construção da instituição e ambiente de trabalho que ocupei durante este período. Assim, agradeço a todos que na caminhada direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse possível. Reconheço também que sou muito pequena neste Universo e agradeço a Deus pela oportunidade da vida e pela condução de tudo para que eu pudesse estar no momento que me encontro.

À professora Kênia, pela orientação e pelo exemplo de mulher forte e determinada na ciência, mas que executa sua função de maneira amigável, respeitosa e incentivadora. Espero que nossa parceria científica e amizade sejam cultivadas após o fim da nossa relação como orientadora-orientada.

Ao professor Warren Burggren, por me acolher em seu laboratório durante o sanduiche, pelo reconhecimento dos meus esforços e por me incentivar e recomendar a outras posições após este período.

Aos outros professores que abriram seus laboratórios para que eu pudesse desenvolver esse projeto, em especial ao professor Marcos Tulio por investir intensamente no projeto, desenvolvimento de técnica e escrita.

Aos técnicos e funcionários que fazem o seu melhor para que a Universidade esteja viva e funcione como unidade de conhecimento.

À professora Izabelle A. M. A. Teixeira pela ótima gestão como coordenadora do PPG zootecnia (2012-2017) e por usar seus conhecimentos como tal para discutir a dilação do prazo para minha defesa devido ao estágio no exterior em reunião com o conselho no último ano. A qualidade desta tese seria imensamente inferior sem o tempo necessário para realiza-la.

Agradeço aos amigos dos laboratórios da FCAV, da UNT e da vida, pessoas boas que estiveram comigo durante essa caminhada me apoiando de muitas maneiras. Seria impossível citar o nome de cada um, mas agradeço muito pelas alegrias e sonhos compartilhados. Sinto que em muitos momentos o doutorado não seria possível sem o suporte dessas pessoas que levarei sempre comigo.

Ao Cameron que não só apoiou meus planos e minha caminhada no fim do doutorado, mas também passou horas corrigindo meu inglês nos manuscritos.

Agradeço profundamente aos meus pais que sempre me apoiaram mesmo sem entenderem o que eu fazia. A minha mãe que me apoia diariamente, me acolhe e faz de tudo para tornar a minha caminhada mais fácil principalmente na fase final do doutorado. Ao meu pai com quem eu sempre posso contar. Obrigada por me trazerem até aqui com amor e dedicação de uma vida.

À minha família biológica e à que foi construída pelo caminho, obrigada pelo amor, acolhimento e apoio. Como já dizia meu vô: -Três palavras pra você: estuda, estuda e estuda.

À todas as pessoas que lutam a favor da manutenção do ensino público brasileiro gratuito e de qualidade, e reconhecem o poder de evolução através educação. Aos que mostram que a educação é um caminho a pessoas que não possuem essa perspectiva na vida. Durante o meu processo de educação em particular a todos que me abriram portas, mostraram um caminho e acreditaram em mim quando eu mesma não sabia o que era possível.

Às iniciativas governamentais e privadas que financiam ciência e a plataformas e ferramentas que tornam o acesso ao conhecimento e a pesquisa gratuitos (Image-J, Mendeley, R, Sci-Hub, Grammarly, entre outros).

Finalmente à Fundação de pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro com bolsa de estudos durante o doutorado (processo 2017/00864-6) e doutorado sanduiche (processo 2017/21581-2). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro com bolsa de estudos no início do doutorado (processos 141180/2016-1 e 141616/2017-2). A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela manutenção do programa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Página	
CERTIFICADO CEUA.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1- Febre	3
2.2- Anapirexia ou Hipotermia regulada.....	4
2.3- Demandas energéticas das respostas térmicas a desafios imunes	5
2.4- Mediadores de resposta térmica a desafios imunes.....	7
3- OBJETIVO GERAL.....	9
3.1 -Objetivos específicos.....	9
4- REFERÊNCIAS.....	10
CAPÍTULO 2 - Regulated hypothermia in response to endotoxin in birds¹	18
KEY POINTS SUMMARY	19
ABSTRACT	19
INTRODUCTION	20
MATERIALS AND METHODS.....	22
Ethical Approval	22
Animals	22
Body temperature	22
Animal O ₂ consumption	23
Lung ventilation.....	24
Mitochondrial respiration in skeletal muscle.....	24
Heat loss index	25
Protocols.....	26
Statistics	28
RESULTS	28
Thermogenesis inhibition during systemic inflammation	28
Thermolytic mechanisms during systemic inflammation	31

DISCUSSION	31
Thermogenesis inhibition	32
Thermolysis activation	33
Conclusion and perspectives	35
REFERENCES.....	36
TABLE.....	45
FIGURES AND LEGENDS.....	46
CAPÍTULO 3 - Biochemical mediators of regulated hypothermia and fever in response to endotoxin in birds: Cyclooxygenases and Prostaglandins.....	53
ABSTRACT	54
INTRODUCTION	54
METHODS.....	56
Animals	56
Body temperature	57
Oxygen consumption and lung ventilation	57
Heat Loss index	58
Behavioral thermoregulation	59
Prostaglandins assay.....	59
Protocols.....	60
Data Analysis.....	61
RESULTS	62
Effect of COX-1 and 2 inhibitors in the thermal response to LPS	62
COX-2 inhibition on the thermoeffectors response to LPS.....	63
LPS effect on Prostaglandins.....	65
DISCUSSION	65
Cyclooxygenase role on the biphasic thermal response to LPS	65
Mechanisms of fever inhibition by COX-2	66
Prostaglandins involved in the biphasic thermal response to LPS.....	67
REFERENCES.....	69
TABLE.....	76
FIGURES.....	77
SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	86

CAPÍTULO 4 - Regulated hypothermia is favored and fever is eliminated in immune challenged birds facing metabolic trade-offs.....	89
ABSTRACT	90
INTRODUCTION	90
MATERIAL AND METHODS	92
Animals and housing.....	92
Experimental procedures	93
Body temperature measurements.....	93
Metabolic and ventilatory measurements.....	93
Skin Temperature - Heat loss index.....	94
Behavioral thermoregulation	95
Statistical analysis.....	95
RESULTS	96
Effect of metabolic trade-offs on the chicks' body temperature and thermoeffectors	96
Effect of metabolic trade-offs on the thermal response to LPS	96
DISCUSSION	99
REFERENCES.....	103
FIGURES	108
SUPPLEMENTARY MATERIAL	117
CAPÍTULO 5 - Metabolic and Hematological Responses to Endotoxin-Induced Inflammation in Chicks Experiencing Embryonic 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin Exposure	119
ABSTRACT	120
INTRODUCTION	120
MATERIAL AND METHODS	123
Animals	123
Embryonic Injection Sites.....	124
Experimental protocol	124
Respirometry Protocol	126
Blood analysis.....	128
Data analysis and statistics.....	129
RESULTS	130

Embryos survival curves	130
TCDD effects on wet and dry body mass.....	130
TCDD effects on metabolic rate and ventilation	131
LPS Immune challenge.....	131
DISCUSSION	135
TCDD effects	135
Effect of TCDD on the LPS response	137
Conclusion and Translational value	141
REFERENCES.....	142
TABLE.....	148
FIGURES	149
SUPPLEMENTAL DATA.....	160
CAPÍTULO 6 – Considerações finais	162



CERTIFICADO CEUA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
 Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto intitulado **“Mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na resposta térmica à inflamação sistêmica em pintainhos”**, protocolo nº 5140/17, sob a responsabilidade do Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de abril de 2017.

Vigência do Projeto	10/04/2017 a 01/03/2020
Espécie / Linhagem	<i>Gallus gallus domesticus</i> / Coob 500
Nº de animais	290
Peso / Idade	~80 gramas/ 5 dias
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Empresa Globoaves, Itirapina-SP

Jaboticabal, 06 de abril de 2017.


Profª Drª Lizândra Amoroso
 Coordenadora – CEUA

ANAPIREXIA E FEBRE EM RESPOSTA A ENDOTOXINA EM AVES: DESAFIOS METABÓLICOS E MEDIADORES BIOQUÍMICOS

RESUMO – Apesar das respostas térmicas frente a infecção por patógeno serem decisivas para a sobrevivência das aves, muito ainda há por ser entendido sobre os mecanismos da febre e nada se sabe sobre a queda de temperatura corporal durante a inflamação sistêmica em aves. No presente trabalho desafiamos pintinhos *Gallus gallus* com altas doses de endotoxina para estudar os mecanismos fisiológicos e bioquímicos da termorregulação de aves frente à inflamação sistêmica. Primeiramente, descrevemos a queda de temperatura corporal durante a inflamação sistêmica em aves como uma resposta regulada (anapirexia). Essa resposta ocorreu por uma inibição de termogênese (redução da taxa metabólica) não relacionada a impedimento da função mitocondrial ou aporte de oxigênio, além de ser apoiada por mecanismos de perda de calor, como ofego e vasodilatação. Em sequência, mostramos que a resposta anapirética à endotoxina parece ser independente da mediação por ciclo-oxigenases (COX), assim o perfil de prostaglandinas (PG) observado neste momento parece não ter função térmica. Também descrevemos que a febre em aves depende da sinalização específica pela COX-2, enzima que quando inibida bloqueia febre via inibição de mecanismos de perda de calor como vasoconstrição e comportamento de agrupamento. Ainda, a febre parece ser majoritariamente dependente da sinalização por PGE₂, mas também tem participação das PGD₂ e PGF₂. No presente trabalho apontamos ainda que a competição com uma demanda energética aumentada por frio, e frio combinado à jejum favorece anapirexia e elimina a resposta de febre nos pintinhos. Finalmente mostramos que a exposição de pintinhos ao poluente dioxina durante o desenvolvimento embrionário resultou em aumento de taxa metabólica (demanda energética). Assim, quando foi induzida a inflamação, os pintinhos apresentaram uma resposta hipometabólica persistente acompanhada da eliminação das respostas hematológicas e osmóticas normais à endotoxina. Concluímos que pintinhos podem responder a um desafio imune tanto com anapirexia como com febre e que a resposta anapirética é favorecida em caso de demandas metabólicas aumentadas. Ainda, a anapirexia não é mediada pela via das COX-PG enquanto a febre é mediada especificamente pela COX-2 e principalmente por PGE₂.

Palavras chaves: anapirexia, ciclo-oxigenase, desafios metabólicos, febre, pintinhos, prostaglandinas

ANAPYREXIA AND FEVER IN RESPONSE TO ENDOTOXIN IN BIRDS: METABOLIC TRADE-OFFS AND BIOCHEMICAL MEDIATORS

ABSTRACT – Although thermal responses to pathogen infections are decisive for birds' survival, the mechanisms of fever are largely unknown and no study has addressed the decrease in body temperature during systemic inflammation for birds. Here we challenged *Gallus gallus* chicks with high doses of endotoxin to study the physiological and biochemical mechanisms of birds' thermoregulation during systemic inflammation. Firstly, we described the decrease in body temperature during systemic inflammation in birds as a regulated response (anapyrexia). This response was supported by a thermogenesis inhibition (reduced metabolic rate) unrelated to impairment of mitochondrial function or oxygen supply, and also by heat loss mechanisms, such as tachypnea and vasodilation. In sequence, we presented that anapirexia in response to endotoxin was independent of cyclooxygenases mediation (COX), thus the prostaglandin (PG) profile observed during this response did not reflect a thermal function. Moreover, the fever response depended specifically on COX-2 signaling in our chicks, and when it was blocked fever was eliminated by inhibition of heat loss mechanisms such as vasoconstriction and huddling behavior. Yet, fever seems to be mostly dependent on PGE₂ signaling, but PGD₂ and PGF₂ had also a minor increase in expression during fever. Our data also pointed out that competing energetic demands caused by cold, and cold combined with fasting favors anapyrexia and eliminates the fever response in chicks. Finally, we show that the exposure of chicks to the pollutant dioxin during embryonic development resulted in increased in metabolic rate. Thus, when inflammation was induced, these chicks showed a persistent hypometabolic response accompanied by the elimination of normal hematological and osmotic responses to endotoxin. We conclude that chicks can respond to an immune challenge with both anapyrexia and fever, and the anapyretic response is favored in case of increased metabolic demands. Furthermore, anapyrexia is not mediated by the COX-PG pathway, whereas fever is mediated specifically by COX-2 and mainly by PGE₂.

Keywords: anapyrexia, cyclooxygenases, metabolic challenges, fever, chicks, prostaglandins

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1- INTRODUÇÃO

Na contramão da produção e bem estar de qualquer ave, estão as doenças associadas à exposição a patógenos que podem causar grande prejuízo ao animal. Neste sentido, tão importante quanto o conhecimento dos microrganismos, é o conhecimento morfofisiológico das aves assim como os eventos fisiológicos desencadeados em resposta a um desafio imune.

Poucas horas depois da infecção por patógenos, aves, assim como todos os vertebrados, apresentam uma resposta de fase aguda que é iniciada pelo sistema imune inato (Figura 1). Brevemente, sabe-se que em aves essa resposta é iniciada pelo reconhecimento do agente patogênico na periferia por células imune. Estas são ativadas e além de destruírem patógenos liberam citocinas pró inflamatórias (interleucinas 1 e 6, IL-1 e IL-6) para sinalização do encéfalo e fígado, órgãos que também são sinalizados por estímulos endócrinos e nervosos. O fígado então libera proteínas de fase aguda com funções como opsonizar bactérias aumentando fagocitose, e sequestrar minerais da corrente sanguínea, como ferro, cobre e zinco, que são limitantes para o crescimento bacteriano. No encéfalo o estímulo inflamatório age principalmente a) ativando eixo hipotálamo-pituitária-adrenal para produção de corticosterona (ver Mediadores químicos para febre em aves, abaixo), além de inibir o eixo hipotálamo-pituitária-gônadas e eixos somatotrópicos e tireotrópicos; b) promovendo respostas metabólicas e termofetoras para respostas térmicas; c) ativando componentes comportamentais como letargia, anorexia e adipsia além de hiperalgesia, (Ashley e Wingfield, 2011; Baumann e Gauldie, 1994; Cray et al., 2009; Hart, 1988; Janig, 2014; Owen-Ashley e Wingfield, 2007).

Dentre as respostas promovidas pelo organismo para lidar com a infecção, a alteração da temperatura corporal (Tc) apresenta-se como uma via de defesa decisiva para a sobrevivência do animal (Blatteis, 2003; Garami et al., 2018; Liu et al., 2012). Hoje, além do reconhecimento da febre como importante ferramenta para resistir a infecção de patógenos sabe-se que pelo menos em mamíferos a queda de Tc também pode ser apresentada como resposta em casos de inflamação sistêmica severa (Garami et al., 2018; Romanovsky et al., 2005). Esta última teria então seria utilizada

como mecanismo para conservar energia durante a resposta inflamatória defendendo sistemas vitais e assim tolerando patógenos durante o período de reestabelecimento (Ganeshan et al., 2019; Steiner e Romanovsky, 2019). Em aves, alguns estudos foram focados na resposta de febre frente a inflamação, mas ainda não se sabia sobre a queda de Tc até o presente estudo. Neste primeiro capítulo serão revisados os aspectos conhecidos sobre febre e queda de temperatura durante a inflamação com o enfoque em aves.

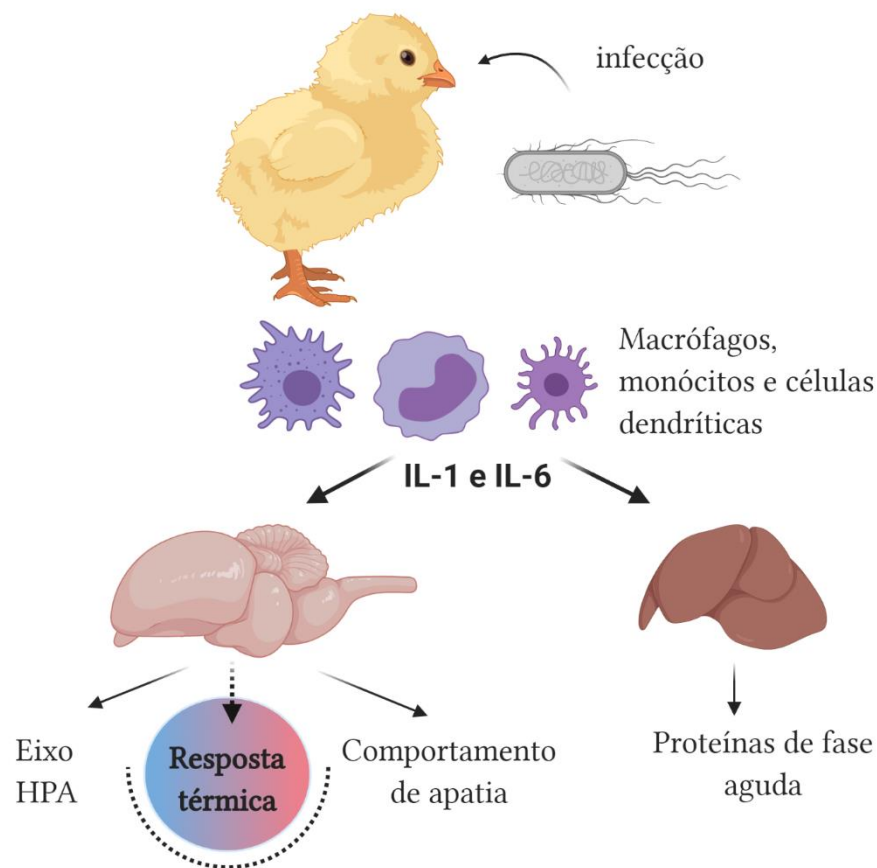


Figura 1- Esquema simplificado do sistema neuroendócrino-imune ativado após a infecção para a obtenção da resposta térmica. No esquema um pintinho é infectado por *E. coli* e o reconhecimento da infecção desencadeia a liberação de citocinas. As citocinas levadas ao sistema nervoso central ativam o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) para produção de hormônios glicocorticoides, respostas térmicas e comportamento de apatia. As citocinas levadas ao fígado ativam produção de proteínas de fase aguda.

Conclusion and Translational value

In summary, our results indicate that TCDD during embryonic development increases the energetic cost for chick's maintenance after hatching and disrupts the metabolic and blood responses to an immune challenge. Our study suggests further effects of aryl hydrocarbon active compounds for birds' species beyond direct mortality. A possible increase in the maintenance cost by dioxin responses would especially threaten free-ranging birds. Such birds already have a high energy expenditure for daily activities in the adversity of a natural environment as hunting/ foraging, protection, locomotion, and body temperature maintenance, among other costs. Additionally, a disrupted response to an immune challenge could increase dioxin-exposed birds' vulnerability to a pathogen, likely resulting in higher mortality. Thus, the sublethal effects of TCDD evaluated in this study may also be considered for conservation purposes since they indirectly threaten birds' survival and welfare.

Supplemental Data: The supplemental data are available on the Wiley Online Library at DOI: at <https://doi.org/10.1002/etc.4832>.

Acknowledgment: We acknowledge the prompt help from G.F. Verbeck, R. Koerber, and M. Rojas Antich for analytical verification of the TCDD concentrations on the solution used in our protocols. We also thank G. dos Santos Ferreira da Silva for the valuable input to the manuscript. L. do Amaral-Silva received a FAPESP fellowship (2017/21581-2).

Disclaimer: The authors declare no competing or financial interests. This article represents the views of the authors and not necessarily the position of the affiliated universities.

Author contribution statement: L.A.S., K.C.B. and W.W.B. conceived the study, L.A.S designed the experiments, W.W.B. provided resources for the study. L.A.S and H.T. performed the experiments and analysed the data, L.A.S., H.T. K.C.B. and W.W.B., interpreted the data and wrote the manuscript.

Data availability statement: Data, associated metadata, and calculation tools are available from the corresponding author (lara.amaral-silva@unesp.br). Data pertaining to this manuscript are deposited in figshare at DOI: 10.6084/m9.figshare.12654620

REFERENCES

- Bonta AM, Gosford R, Eussen D, Ferguson N, Loveless E, Witwer M. 2017. Intentional Fire-Spreading by “ Firehawk ” raptors in northern Australia. *J Ethnobiol.* 37(4):700–718.
- Bruggeman V, Onagbesan O, Dumez L, De Ketelaere B, Decuypere E. 2005. Effects of early prenatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on postnatal reproduction in the laying hen (*Gallus gallus*). *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol.* 141(4):349–355. doi:10.1016/j.cbpc.2005.07.011.
- Canga L, Paroli L, Blanck TJ, Silver RB, Rifkind AB. 1993. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin Increases Cardiac Myocyte Intracellular Calcium and Progressively Impairs Ventricular Contractile Responses To Isoproterenol and To Calcium in Chick Embryo Hearts. *Mol Pharmacol.* 44(6):1142–1151.
- Cornelius EA, Vézina F, Regimbald L, Hallot F, Petit M, Love OP, Karasov WH. 2017. Chickadees faced with unpredictable food increase fat reserves but certain components of their immune function decline. *Physiol Biochem Zool.* 90(2):190–200. doi:10.1086/689913.
- Corrigan JJ, Fonseca MT, Flatow E a, Lewis K, Steiner A a. 2014. Hypometabolism and hypothermia in the rat model of endotoxic shock: independence of circulatory hypoxia. *J Physiol.* 592(Pt 17):3901–16. doi:10.1113/jphysiol.2014.277277. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24951620>.
- Dantonio V, Batalhão ME, Fernandes MHMR, Komegae EN, Buqui GA, Lopes NP, Gargaglioni LH, Carnio ÉC, Steiner AA, Bícigo KC. 2016. Nitric oxide and fever: immune-to-brain signaling vs. thermogenesis in chicks. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.*

310(10):R896–R905. doi:10.1152/ajpregu.00453.2015.

<http://ajpregu.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpregu.00453.2015>.

Drorbaugh JE, Fenn W. 1955. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics*. 16:81–87.

Effenberger-Neidnicht K, Hartmann M. 2018. Mechanisms of Hemolysis During Sepsis. *Inflammation*. 41(5):1569–1581. doi:10.1007/s10753-018-0810-y.

El-Sabeawy F, Enan E, Lasley B. 2001. Biochemical and toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in immature male and female chickens. *Comp Biochem Physiol Part C*. 129:317–327.

Elliott JE, Butler RW, Norstrom RJ, Whitehead PE. 1989. Environmental contaminants and reproductive success of great blue herons *Ardea herodias* in British Columbia, 1986-1987. *Environ Pollut*. 59(2):91–114. doi:10.1016/0269-7491(89)90099-7.

Flores-Santin J, Rojas Antich M, Tazawa H, Burggren WW. 2018. Hematology from embryo to adult in the bobwhite quail (*Colinus virginianus*): Differential effects in the adult of clutch, sex and hypoxic incubation. *Comp Biochem Physiol -Part A Mol Integr Physiol*. 218:24–34. doi:10.1016/j.cbpa.2018.01.005. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.01.005>.

Fujisawa N, Nakayama SMM, Ikenaka Y, Ishizuka M. 2014. TCDD-induced chick cardiotoxicity is abolished by a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor NS398. *Arch Toxicol*. 88(9):1739–1748. doi:10.1007/s00204-014-1225-7.

Garami A, Steiner AA, Romanovsky AA. 2018. Fever and hypothermia in systemic inflammation. In: Michael J. Aminoff, François Boller DFS, editor. *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 157. Amsterdam, NH, Netherlands: Elsevier. p. 565–597.

Gilbertson M, Kubiak T, Ludwig J, Fox G. 1991. Great Lakes embryo mortality, edema, and deformities syndrome (GLEMEDS) in colonial fish-eating birds: similarity to chick-edema disease. *J Toxicol Environ Health*. 33:455–520. doi:10.1080/15287399109531538.

Gilday D, Gannon M, Yutzey K, Bader D, Rifkind AB. 1996. Molecular Cloning and Expression of Two Novel Avian Cytochrome. *J Biol Chem*. 271(51):33054–33059. doi:10.1074/jbc.271.51.33054.

Gordon CJ, Gray LE, Monteiro-Riviere NA, Miller DB. 1995. Temperature regulation and metabolism in rats exposed perinatally to dioxin: Permanent change in regulated body temperature? *Toxicol Appl Pharmacol*. 133:172–176.

Gray DA, Marais M, Maloney SK. 2013. A review of the physiology of fever in birds. *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol*. 183(3):297–312. doi:10.1007/s00360-012-0718-z.

- Hart LE, Cheng KM, Whitehead PE, Shah RM, Lewis RJ, Ruschkowski SR, Blair RW, Bennett DC, Bandiera SM, Norstrom RJ, et al. 1991. Dioxin contamination and growth and development in great blue heron embryos. *J Toxicol Env Heal.* 32(3):331–344.
doi:10.1080/15287399109531486.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2002515.
- Head JA, Hahn ME, Kennedy SW. 2008. Key amino acids in the aryl hydrocarbon receptor predict dioxin sensitivity in avian species. *Environ Sci Technol.* 42(19):7535–7541.
doi:10.1021/es801082a.
- Henshel DS. 1998. Developmental neurotoxic effects of dioxin and dioxin-like compounds on domestic and wild avian species. *Environ Toxicol Chem.* 17(1):88–98. doi:10.1897/1551-5028(1998)017<0088:DNEODA>2.3.CO;2. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620170111>.
- Henshel DS, Hehn B, Wagey R, Vo M, Steeves JD. 1997. The relative sensitivity of chicken embryos to yolk- or air-cell-injected 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Environ Toxicol Chem.* 16(4):725–732.
- Hilscherova K, Blankenship AL, Nie M, Coady KK, Upham BL, Trosko JE, Giesy JP. 2003. Oxidative stress in liver and brain of the hatchling chicken (*Gallus domesticus*) following in ovo injection with TCDD. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol.* 136(1):29–45.
doi:10.1016/S1532-0456(03)00167-4.
- Jägers J, Brauckmann S, Kirsch M, Effenberger-Neidnicht K. 2018. Moderate glucose supply reduces hemolysis during systemic inflammation. *J Inflamm Res.* 11:87–94.
doi:10.2147/JIR.S155614.
- Kanan S, Samara F. 2018. Dioxins and furans: A review from chemical and environmental perspectives. *Trends Environ Anal Chem.* 17(September 2017):1–13.
doi:10.1016/j.teac.2017.12.001.
- Katarzyńska D, Hrabia A, Kowalik K, Sechman A. 2015. Comparison of the in vitro effects of TCDD, PCB 126 and PCB 153 on thyroid-restricted gene expression and thyroid hormone secretion by the chicken thyroid gland. *Environ Toxicol Pharmacol.* 39(2):496–503.
doi:10.1016/j.etap.2015.01.016.
- Komarek E V. 1969. Fire and Animal Behavior. In: Station TTR, editor. *Proceedings: 9th Tall Timbers Fire Ecology Conference.* Vol. 9. Tallahassee, Fl. p. 161–207.
- Krall CM, Yao X, Hass MA, Feleder C, Steiner AA. 2010. Food deprivation alters thermoregulatory responses to lipopolysaccharide by enhancing cryogenic inflammatory signaling via prostaglandin D2. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 298(6):1–14.
doi:10.1152/ajpregu.00158.2010.

- Kudryavtseva AD, Shelepchikov AA, Brodsky ES. 2020. Free-range chicken eggs as a bioindicator of dioxin contamination in Vietnam, including long-term Agent Orange impact. *Emerg Contam.* 6:114–123. doi:10.1016/j.emcon.2020.02.003.
- Marais M, Maloney SK, Gray DA. 2011. The metabolic cost of fever in Pekin ducks. *J Therm Biol.* 36(2):116–120. doi:10.1016/j.jtherbio.2010.12.004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2010.12.004>.
- Matsumura F. 2009. The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin activated Ah receptor to cause toxic effects. *Biochem Pharmacol.* 77:608–626.
- Moran Jr. E. 2007. Nutrition of developing embryo and hatching. *Poult Sci.* 86:1043–1049.
- Nau H, BaB R, Neubert D. 1986. Transfer of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) via placenta and milk, and postnatal toxicity in the mouse. *Arch Toxicol.* 59:36–40.
- Nault R, Abdul-Fattah H, Mironov GG, Berezovski M V., Moon TW. 2013. Assessment of energetic costs of AhR activation by β -naphthoflavone in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes using metabolic flux analysis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 271(1):86–94. doi:10.1016/j.taap.2013.04.017.
- Nikolaidis E, Brunstrom B, Denckerl L. 1988. Effects of TCDD and its Congeners 3,3',4,4'3 Tetrachloroazoxybenzene and 3,3',4,4' - Tetrachlorobiphenyl on Lymphoid Development in the Thymus of Avian Embryo. *Pharmacol Toxicol.* 63:333–336.
- Nosek JA, Craven SR, Sullivan JR, Olson JR, Peterson RE. 1992. Metabolism and disposition of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in ring-necked pheasant hens, chicks, and eggs. *J Toxicol Environ Health.* 35(3):153–164. doi:10.1080/15287399209531605.
- Olesen ETB, De Seigneux S, Wang G, Lütken SC, Frøkiær J, Kwon TH, Nielsen S. 2009. Rapid and segmental specific dysregulation of AQP2, S256-pAQP2 and renal sodium transporters in rats with LPS-induced endotoxaemia. *Nephrol Dial Transplant.* 24(8):2338–2349. doi:10.1093/ndt/gfp011.
- Olson JR, McGarrigle BP, Gigliotti PJ, Kumar S, McReynolds JH. 1994. Hepatic uptake and metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran. *Fundam Appl Toxicol.* 22:631–640.
- Pajurek M, Pietron W, Maszewski S, Mikołajczyk S, Piskorska-Pliszczynska J. 2019. Poultry eggs as a source of PCDD/Fs, PCBs, PBDEs and PBDD/Fs. *Chemosphere.* 223:651–658. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.02.023. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.023>.
- Peden-Adams M, Alonso K, Godard C, Skipper S, Mashburn W, Hoover J, Charbonneau C, Henshe D, Dickerson R. 1998. Effects of environmentally relevant concentrations of 2,3,7,8-

TCDD on domestic chicken immune function and CYP450 activity: F1 generation and egg injection studies. *Chemosphere*. 37:1923–1939.

Powell DC, Aulerich RJ, Meadows JC, Tillitt DE, Giesy JE, Stromborg KL, Bursian SJ. 1996. Effects of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) injected into the yolks of chicken (*Gallus domesticus*) eggs prior to incubation. *Arch Environ Contam Toxicol*. 31:404–409.

Shertzer HG, Genter MB, Shen D, Nebert DW, Chen Y, Dalton TP. 2006. TCDD decreases ATP levels and increases reactive oxygen production through changes in mitochondrial FOF1-ATP synthase and ubiquinone. *Toxicol Appl Pharmacol*. 217(3):363–374. doi:10.1016/j.taap.2006.09.014.

Sköld-Chiriac S, Nord A, Tobler M, Nilsson JÅ, Hasselquist D. 2015. Body temperature changes during simulated bacterial infection in a songbird: Fever at night and hypothermia during the day. *J Exp Biol*. 218(18):2961–2969. doi:10.1242/jeb.122150.

Stanton B, DeWitt J, Henshel D, Watkins S, Lasley B. 2003. Fatty acid metabolism in neonatal chickens (*Gallus domesticus*) treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) or 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB-126) in ovo. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol*. 136(1):73–84. doi:10.1016/j.cca.2003.08.002.

Stephens RD, Petreas MX, Hayward DG. 1995. Biotransfer and bioaccumulation of dioxins and furans from soil: chickens as a model for foraging animals. *Sci Total Environ*. 175(3):253–273. doi:10.1016/0048-9697(95)04925-8.

Vogel CFA, Khan EM, Leung PSC, Gershwin ME, Chang WLW, Wu D, Haarmann-Stemmann T, Hoffmann A, Denison MS. 2014. Cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response: A role for nuclear factor-kB. *J Biol Chem*. 289(3):1866–1875. doi:10.1074/jbc.M113.505578.

Walker MK, Heid SE, Smith SM, Swanson HI. 2000. Molecular characterization and developmental expression of the aryl hydrocarbon receptor from the chick embryo. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 126(3):305–19. doi:10.1016/S0742-8413(00)00119-5.

Walker NE. 1967. Distribution of chemicals injected into fertile eggs and its effect upon apparent toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 10(2):290–299. doi:10.1016/0041-008X(67)90111-1.

Watanabe MX, Iwata H, Watanabe M, Tanabe S, Subramanian KY, Hasihimoto T. 2005. Bioaccumulation of organochlorines in crows from an Indian open waste dumping site: Evidence for direct transfer of dioxin-like congeners from the contaminated soil. *Environ Sci Technol*. 39:4421–4430.

Weber LWD, Haart TW, Rozman K. 1987. Effect of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on thermogenesis in brown adipose tissue of rats. *Toxicol Lett* 39:241–248.

Xie H, Rath NC, Huff GR, Huff WE, Balog JM. 2000. Effects of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide on broiler chickens. *Poult Sci*. 79(1):33–40. doi:10.1093/ps/79.1.33.

CAPÍTULO 6 – Considerações finais

A resposta inflamatória frente a um patógeno implica alto custo energético tanto para sua ativação per se quanto para posterior reparo em decorrência de seus efeitos lesivos aos tecidos. A febre é um importante componente da resposta de fase aguda que estimula o sistema imune facilitando a eliminação de patógenos, contudo, o custo do aumento de temperatura corporal é adicionado nessa resposta de resistência. Quando os custos energéticos da febre competem com a energia de manutenção ameaçando funções vitais, como no caso de inflamação sistêmica severa, o animal muda a direção da resposta térmica e desenvolve anapirexia. A anapirexia neste caso, é então considerada como uma fase de tolerância ao patógeno com função de preservar energia para recuperação do organismo.

Neste estudo nós primeiramente demonstramos que aves, assim como mamíferos também podem apresentar anapirexia quando acometidas de inflamação sistêmica severa. A queda de T_c nestes animais foi apoiada por supressão da termogênese (redução da taxa metabólica) e ativação de termólise por vasodilatação periférica e aumento de frequência respiratória (perda de calor evaporativo). Ainda, mostramos que a redução da taxa metabólica nessas aves foi uma resposta regulada e não mero resultado de um impedimento mitocondrial nos tecidos termogênicos (músculo esquelético) ou limitação na entrega de oxigênio.

Quando os pintinhos são injetados com altas doses de LPS, uma resposta térmica bifásica é gerada, na primeira hora ocorre anapirexia e após cerca de 4 horas, febre. Assim, estudamos o papel específico das COX-1 e COX-2 além da expressão de PGs como mediadores de ambas respostas térmicas durante a inflamação sistêmica. Nossos resultados indicam que diferentemente de ratos, a anapirexia não é mediada pela COX-1 nos pintinhos. A inibição da COX-2 também não teve nenhum efeito na resposta anapirética ao LPS, assim o perfil de PG encontrado durante esta resposta deve ter outras funções que não a regulação térmica. A febre, por outro lado foi claramente dependente da sinalização específica pela COX-2. Quando a COX-2 foi bloqueada nos pintinhos injetados com LPS, também foram inibidos termoeletores autonômicos como a vasoconstrição periférica e comportamentais (agrupamento) para extermínio da febre. A principal prostaglandina envolvida na produção de febre

parece ser a PGE₂, porém as PGD₂ e PGF₂ também tiveram um aumento em menor escala durante essa resposta.

Por meios dos resultados apresentados nesta tese também confirmamos como verdadeira a hipótese que a competição com uma demanda energética aumentada por condições ambientes adversas favorece anapirexia e elimina febre nos pintinhos. Pintinhos alimentados em temperatura termoneutra apresentarem uma resposta bifásica ao LPS. Por outro lado, pintinhos expostos ao frio e frio combinado a jejum favoreceram a anapirexia apresentando todos os termofatores necessários para tal resposta, porém não apresentaram febre subsequente.

Ainda a respeito das competições metabólicas, pintinhos expostos ao poluente ambiental 2,3,7,8-tetraclorodibenzodioxina durante o desenvolvimento embrionário tiveram um aumento na demanda energética de manutenção e menor massa corporal. Então quando esses pintinhos receberam um desafio imune por LPS ocorreu uma resposta hipometabólica persistente e eliminação das respostas hematológicas e osmóticas normais ao LPS.

Assim, concluímos que pintinhos podem responder a um desafio imune tanto com anapirexia como com febre, que a resposta anapirética é favorecida em caso de demandas metabólicas aumentadas e não é mediada pela via das COX-PG. A febre, no entanto, é abolida em casos de desafios metabólicos e é mediada especificamente pela via da COX-2 e principalmente por PGE₂. Acreditamos que nossos resultados fornecem entendimento básico sobre a fisiologia de inflamação das aves que contribuirá em subseqüentes estudos de diferentes áreas além da produção de aves, como medicina evolutiva, ecologia, medicina veterinária, fisiologia comparada e toxicologia.