

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
UNESP - CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – FMVZ

**AÇÃO DA SEROTONINA ASSOCIADA À *Lactobacillus* spp. NA
RESPOSTA IMUNE E MORFOMETRIA INTESTINAL DE FRANGOS
DE CORTE (*Gallus gallus domesticus* – LINNAEUS 1758) DESAFIADOS
COM *Salmonella* ENTERITIDIS.**

TAÍS CREMASCO DONATO

Botucatu - SP
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ
CAMPUS DE BOTUCATU

**AÇÃO DA SEROTONINA ASSOCIADA À *Lactobacillus* spp. NA
RESPOSTA IMUNE E MORFOMETRIA INTESTINAL DE FRANGOS
DE CORTE (*Gallus gallus domesticus* – LINNAEUS 1758) DESAFIADOS
COM *Salmonella* ENTERITIDIS.**

TAÍS CREMASCO DONATO

Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Sakai Okamoto

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Donato, Taís Cremasco.

Ação da serotonina associada à *Lactobacillus* spp. na resposta imune e morfometria intestinal de frangos de corte (*Gallus gallus domesticus* - Linnaeus 1758) desafiados com *Salmonella enteritidis* / Taís Cremasco Donato. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Raphael Lucio Andreatti Filho

Coorientador: Adriano Sakai Okamoto

Capes: 50503014

1. Ave doméstica - Criação. 2. *Salmonella enteritidis*. 3. Resposta imune. 4. *Lactobacilo*.

Palavras-chave: Frangos de corte; IgA e IgG; *Lactobacillus* spp.; *Salmonella enteritidis*; Serotonina.

TAÍS CREMASCO DONATO

**AÇÃO DA SEROTONINA ASSOCIADA À *Lactobacillus* spp. NA RESPOSTA IMUNE
E MORFOMETRIA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE (*Gallus gallus
domesticus* – LINNAEUS 1758) DESAFIADOS COM *Salmonella* ENTERITIDIS.**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu-SP

Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Membro

Departamento de Patologia Veterinária

FCAV – UNESP – Jaboticabal – SP

Prof. Dr. Ivens Gomes Guimarães

Membro

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

UEL – Londrina - PR

Data da Defesa: 15/07/2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmão, que mesmo diante das
adversidades da vida sempre seguiram em frente com
alegria e confiança de que tudo daria certo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho, pela confiança na realização deste projeto, consideração e conhecimento transmitido durante estes anos de convivência, permitindo não somente minha evolução acadêmica, mas pessoal também.

Aos meus amados pais, Fernando e Maristela, que sempre foram minha fonte de referência e por estarem tão presentes na minha vida, acreditando em mim e me incentivando nos momentos mais difíceis. Com vocês aprendi o significado de "família".

Ao meu irmão Giovanni, que mesmo quando o mundo parecia desabar me fazia rir e analisar o lado positivo e que só de olhar para mim já sabia o que eu estava sentindo.

A minha tia Marilda, minha segunda mãe, pelo incentivo aos estudos e por todos os cuidados que somente uma tia pode ter. As minhas avós, Diná e Neusa, pela confiança em mim, palavras de conforto e por incansáveis orações.

Ao José Lizandro, pela paciência e amor, sabendo exatamente o que falar em determinados momentos e muitas vezes simplesmente não falar, apenas compreender.

A toda a minha família, que sempre me apoiou e fez parte da minha história. A minha segunda família de Barra Bonita, que me aceitou e confortou nos momentos difíceis.

À minha amiga Ana Angelita, fonte de inspiração e força para mim. Pelas muitas horas de trabalho, risadas, choros, alegrias e pela enorme colaboração não somente intelectual, mas pessoal também. E aos amigos Ticiane, Anita, Roberta, Isabelle, Livia, Erika, Marcela, Mariana, Keila, Larissa, Isadora, Guilherme, Ana Paula, Milena, Bruna, Maurício e Carlos Eduardo que sempre me apoiaram e tornaram os dias mais alegres.

Ao Prof. Dr Adriano Sakai Okamoto pela co-orientação e por sempre estar disposto a colaborar. Ao Prof. Dr Julio Lopes Sequeira e Prof^a. Dr^a Noeme S. Rocha pela colaboração nos experimentos, sugestões e disponibilidade de uso de equipamentos.

Aos colegas e funcionários do Prédio da Patologia e do Laboratório de Ornitopatologia, pela convivência e colaboração durante estes anos.

A FAPESP e ao CNPq pela concessão de bolsa e auxílio financeiro, permitindo a realização deste estudo.

E a todos que de algum modo colaboraram para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a Deus que me permitiu seguir meu caminho com uma família, professores e amigos maravilhosos, sempre me amparando, confortando e dando forças. Obrigada por me proteger, guiar e abençoar apesar dos meus erros e fraquezas.

**"De nada vale o brilho da inteligência,
se o coração permanece às escuras"**

Bezerra de Menezes

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
Introdução.....	1
Revisão de Literatura	2
<i>Salmonella</i>	2
<i>Lactobacillus</i>	4
Microbiota e imunidade intestinal.....	5
Serotonina.....	7
Objetivos	10
 CAPÍTULO 2 – EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE SEROTONINA, 5-HIDROXITRIPTOFANO E M-HIDROXIBENZILHIDRAZINE NO COMPORTAMENTO E INGESTÃO DE RAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE (<i>Gallus gallus domesticus</i> – LINNAEUS 1758).....	11
Resumo.....	12
Abstract	12
Resumen	13
Introdução.....	14
Material e métodos	15
Avaliação do peso médio corporal	15
Análise estatística	16
Resultados	16
Discussão.....	16
Conclusão	18
Agradecimentos.....	19
Comitê de ética e biossegurança	19

Referências Bibliográficas	19
----------------------------------	----

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE 5-HIDROXITRIPTOFANO E M-HIDROXIBENZILHIDRAZINE ASSOCIADOS À <i>Lactobacillus</i> spp. NA RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE (<i>Gallus gallus domesticus</i> – LINNAEUS 1758) DESAFIADOS COM <i>Salmonella</i> ENTERITIDIS	22
---	----

Resumo.....	23
-------------	----

Abstract	24
----------------	----

Introdução.....	25
-----------------	----

Material e métodos	26
--------------------------	----

Cultivo e administração do inóculo de <i>Lactobacillus</i> spp.....	26
---	----

Cultivo e administração do inóculo de <i>Salmonella</i> Enteritidis	26
---	----

5-hidroxitriptofano (5HTP) e m-hidroxibenzilhidrazine (NSD1015).....	27
--	----

Delineamento experimental.....	27
--------------------------------	----

Experimento 1	27
---------------------	----

Experimento 2	28
---------------------	----

Monitoria sorológica	29
----------------------------	----

Coleta de fluido intestinal	29
-----------------------------------	----

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).....	29
---	----

Quantificação de <i>Salmonella</i> Enteritidis em conteúdo cecal	30
--	----

Análise estatística	31
---------------------------	----

Resultados e Discussão	31
------------------------------	----

Agradecimentos.....	34
---------------------	----

Referências Bibliográficas	34
----------------------------------	----

CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE 5-HIDROXITRIPTOFANO E M-HIDROXIBENZILHIDRAZINE ASSOCIADOS À <i>Lactobacillus</i> spp. NA MORFOMETRIA INTESTINAL E IMUNOEXPRESSÃO DE SEROTONINA EM FRANGOS DE CORTE (<i>Gallus gallus domesticus</i> – LINNAEUS 1758) DESAFIADOS COM <i>Salmonella</i> ENTERITIDIS	41
--	----

Resumo.....	42
-------------	----

Abstract	43
----------------	----

Introdução.....	44
-----------------	----

Material e métodos	45
Cultivo e administração do inóculo de <i>Lactobacillus</i> spp.....	45
Cultivo e administração do inóculo de <i>Salmonella</i> Enteritidis	46
5-hidroxitriptofano (5HTP) e m-hidroxibenzilhidrazina (NSD1015).....	46
Delineamento experimental.....	46
Experimento 1	46
Experimento 2	47
Avaliação do peso médio corporal	48
Coleta de duodeno para avaliação das vilosidades intestinais e ensaios de imunoistoquímica	48
Mensuração da altura e densidade das vilosidades	49
Imunoistoquímica.....	49
Análise estatística.....	50
Resultados	51
Peso médio corporal das aves.....	51
Mensuração da densidade das vilosidades no duodeno	51
Mensuração da altura das densidades no duodeno.....	52
Imunomarcção de serotonina no duodeno	52
Discussão.....	53
Conclusão	56
Agradecimentos.....	56
Referências Bibliográficas	56
 CAPÍTULO 5	 64
Discussão geral.....	64
Conclusão geral	67
Referências Bibliográficas	68

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE 5-HIDROXITRIPTOFANO E M-HIDROXIBENZILHIDRAZINE ASSOCIADOS À <i>Lactobacillus</i> spp. NA RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE (<i>Gallus gallus domesticus</i> – LINNAEUS 1758) DESAFIADOS COM <i>Salmonella</i> ENTERITIDIS	22
---	----

Tabela 1. Concentração de IgA ($\mu\text{g/mL}$) em fluído intestinal de frangos de corte, do experimento 2, tratados com 5-hidroxitriptofano, m-hidroxi-benzilhidrazine, <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiados com <i>Salmonella</i> Enteritidis	38
--	----

Tabela 2. Concentração de IgG ($\mu\text{g/mL}$) sérica de frangos de corte, do experimento 2, tratados com 5-hidroxitriptofano, m-hidroxi-benzilhidrazine, <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiados com <i>Salmonella</i> Enteritidis	39
--	----

Tabela 3. Quantificação de <i>Salmonella</i> Enteritidis ($\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$) no conteúdo cecal de frangos de corte tratados com 5-hidroxitriptofano, m-hidroxi-benzilhidrazine, <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiados com <i>Salmonella</i> Enteritidis	40
---	----

CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE 5-HIDROXITRIPTOFANO E M-HIDROXIBENZILHIDRAZINE ASSOCIADOS À <i>Lactobacillus</i> spp. NA MORFOMETRIA INTESTINAL E IMUNOEXPRESSÃO DE SEROTONINA EM FRANGOS DE CORTE (<i>Gallus gallus domesticus</i> – LINNAEUS 1758) DESAFIADOS COM <i>Salmonella</i> ENTERITIDIS	41
--	----

Tabela 1. Valores médios de densidade dos vilos (numero vilos/campo) no duodeno de frangos de corte, no experimento 1, tratados com 5-hidroxitriptofano, m-hidroxi-benzilhidrazine e <i>Lactobacillus</i> spp.....	61
--	----

Tabela 2. Valores médios de densidade dos vilos (numero vilos/campo) no duodeno de frangos de corte, no experimento 2, tratados com 5-hidroxitriptofano, m-hidroxi-benzilhidrazine, <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiados com <i>Salmonella</i> Enteritidis	61
--	----

Tabela 3. Valores médios da altura de vilos (μm) no duodeno de frangos de corte, no experimento 1, tratados com 5-hidroxitriptofano, m-hidroxi-benzilhidrazine e <i>Lactobacillus</i> spp	62
--	----

Tabela 4. Valores médios da altura de vilos (μm) no duodeno de frangos de corte tratados com 5-hidroxitriptofano, m-hidroxi-benzilhidrazine, <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiados com <i>Salmonella</i> Enteritidis(g).....	62
--	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 – EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE SEROTONINA, 5-HIDROXITRIPTOFANO E M-HIDROXIBENZILHIDRAZINE NO COMPORTAMENTO E INGESTÃO DE RAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE (*Gallus gallus domesticus* – LINNAEUS 1758)..... **11**

Figura 1. Peso médio corporal das aves tratadas, via intraperitoneal, com 5-hidroxitriptofano (T1, T2, T3) e os dois controles negativos (T10 e T11). **(B)** Peso médio corporal das aves tratadas com serotonina (T4, T5, T6) e os dois controles negativos (T10 e T11). **(C)** Peso médio corporal das aves tratadas com m-hidroxibezilhidrazine (T7, T8, T9) e os dois controles negativos (T10 e T11). Todas as doses foram calculadas em mg/Kg de peso vivo . **21**

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE 5-HIDROXITRIPTOFANO E M-HIDROXIBENZILHIDRAZINE ASSOCIADOS À *Lactobacillus* spp. NA RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE (*Gallus gallus domesticus* – LINNAEUS 1758) DESAFIADOS COM *Salmonella* ENTERITIDIS **22**

Figura 1. Concentração de IgA (µg/mL) em fluido intestinal de frangos de corte, do experimento 1, nos tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano); T2 (NSD1015); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*); T6 (controle negativo)..... **37**

Figura 2. Concentração de IgG (µg/mL) sérico de frangos de corte, do experimento 1, nos tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano); T2 (NSD1015); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*); T6 (controle negativo) **37**

Figura 3. Quantificação de *Salmonella* Enteritidis (Log₁₀UFC/mL) no conteúdo cecal de frangos de corte nos tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano + *S. Enteritidis*); T2 (NSD1015+ *S. Enteritidis*); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T6 (*S. Enteritidis*); T7 (controle negativo)..... **40**

CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE 5-HIDROXITRIPTOFANO E M-HIDROXIBENZILHIDRAZINE ASSOCIADOS À *Lactobacillus* spp. NA MORFOMETRIA INTESTINAL E IMUNOEXPRESSÃO DE SEROTONINA EM FRANGOS DE CORTE (*Gallus gallus domesticus* – LINNAEUS 1758) DESAFIADOS COM *Salmonella* ENTERITIDIS **41**

Figura 1. Peso médio corporal de frangos de corte do experimento 1 nos tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano); T2 (NSD1015); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*); T6 (controle negativo). **60**

Figura 2. Peso médio corporal de frangos de corte do experimento 2 nos tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano + *S. Enteritidis*); T2 (NSD1015+ *S. Enteritidis*); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T6 (*S. Enteritidis*); T7 (controle negativo) **60**

Figura 3. Imunomarcção de serotonina em células enterocromafins de duodeno de frangos de corte aos 14 dias de vida. Barra:50µm **63**

Figura 4. Número de células imunomarcadas para serotonina (numero cels/campo) em duodeno de frangos de corte, no experimento 1, nos tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano); T2 (NSD1015); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*); T6 (controle negativo)..... **63**

Figura 5. Número de células imunomarcadas para serotonina (numero cels/campo) em duodeno de frangos de corte, no experimento 2, nos tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano + *S. Enteritidis*); T2 (NSD1015+ *S. Enteritidis*); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T6 (*S. Enteritidis*); T7 (controle negativo)..... **63**

RESUMO – DONATO, T.C. Ação da serotonina associada à *Lactobacillus* spp. na resposta imune e morfometria intestinal de frangos de corte (*Gallus gallus domesticus* – Linnaeus 1758) desafiados com *Salmonella* Enteritidis. Botucatu, 2013.74p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Tendo em vista a variedade de funções da serotonina e poucos estudos em aves sobre o tema, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da serotonina, através do seu precursor (5-hidroxitriptofano) e seu inibidor (m-hidroxibenzilhidrazine), associados à *Lactobacillus* spp. na resposta imune e na morfometria intestinal de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis. A partir da avaliação do comportamento e peso corporal das aves, estabeleceu-se a dose do precursor (5HTP), da serotonina, e do inibidor (NSD1015). Com a dose definida, o estudo foi dividido em dois experimentos, aves sem desafio com *S. Enteritidis* e aves com desafio. Avaliou-se a resposta imune humoral das aves através das concentrações de IgA no fluido intestinal e IgG no soro sanguíneo e recuperação de *S. Enteritidis* no conteúdo cecal. A morfometria intestinal foi determinada por meio da avaliação do peso corporal, número e altura das vilosidades no duodeno, e, a disponibilidade de serotonina no duodeno foi observada por ensaios imunoistoquímicos. Serotonina ocasionou alterações caracterizadas por sonolência e diminuiu o ganho de peso das aves. Seu precursor (5HTP) também ocasionou sonolência nas aves, porém em intensidade menor e o ganho de peso foi mantido. As aves em que o inibidor (NSD1015) foi administrado não apresentaram alterações no comportamento e ganho de peso. O precursor, inibidor e *Lactobacillus* spp. não influenciaram nas concentrações de IgA e IgG, mas o precursor e *Lactobacillus* spp. reduziram a quantidade de *S. Enteritidis* no conteúdo cecal. Com relação à morfometria intestinal, as aves tratadas com 5HTP apresentaram aumento no peso corporal, no número e altura das vilosidades no duodeno. *Lactobacillus* spp. e *S. Enteritidis* determinaram a elevação de células que imunoexpressaram serotonina no duodeno. Os resultados obtidos nos mostram uma possível interação do precursor e *Lactobacillus*, atuando na resposta imune e desenvolvimento das vilosidades intestinais.

Palavras-chave: serotonina, *Lactobacillus* spp., *Salmonella* Enteritidis, frangos de corte.

ABSTRACT – DONATO, T.C. Evaluation of serotonin associated with *Lactobacillus* spp. in the immune response and intestinal morphometric of broiler chickens (*Gallus gallus domesticus* – Linnaeus 1758) challengec with *Salmonella* Enteritidis. Botucatu, 2013. 73p. Dissertation (MSc) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, Paulista State University “Júlio de Mesquita Filho”.

Given the variety of functions of serotonin and few studies in birds on the topic, this study aimed to evaluate the effects of serotonin, through its precursor (5-hydroxytryptophan) and its inhibitor (m-hidroxibenzilhidrazine) in association with *Lactobacillus* spp. in the immune response and the intestinal morphometric of broiler chickens challenged with *Salmonella* Enteritidis. From the evaluation of the behavior and body weight of the birds, established the dose of the precursor (5HTP), serotonin, and inhibitor (NSD1015). With a defined dose, the study was divided into two experiments, birds without challenge with *S. Enteritidis* and birds challenge. We evaluated the humoral immune response of the birds by the concentrations of IgA in intestinal fluid and the blood serum IgG recovery and *S. Enteritidis* in cecal contents. The intestinal morphology was determined by evaluating the weight, number of villi and duodenal villus height, and the availability of serotonin in the duodenum was observed by immunohistochemical assays. Serotonin induced changes characterized by drowsiness and decreased weight gain of birds. Its precursor (5HTP) also caused drowsiness in birds, but at a lower intensity and weight gain was maintained. And the birds in the inhibitor (NSD1015) was administered showed no changes in behavior and weight gain. The precursor, inhibitor and *Lactobacillus* spp. did not affect the concentrations of IgA and IgG, but the precursor and *Lactobacillus* spp. reduced the number of *S. Enteritidis* in cecal contents. With regard to intestinal morphology, 5HTP-treated birds showed an increase in body weight, the number of villi and duodenal villus height. *Lactobacillus* spp. and *S. Enteritidis* determined the elevation of cells imunoexpressaram serotonin in the duodenum. The results suggested a possible interaction of the precursor and *Lactobacillus*, acting on the immune response and development of villi inestinais.

Key-words: serotonin, *Lactobacillus* spp., *Salmonella* Enteritidis, broiler chickens.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Infecções alimentares em humanos provenientes da ingestão de produtos avícolas estão presentes em diversos países. Apesar de grandes avanços no tratamento destas infecções, os micro-organismos causadores das mesmas continuam sendo um dos principais problemas de saúde pública.

Neste contexto a salmonelose merece uma posição de destaque. Ocasionalmente por *Salmonella* spp, é uma das mais importantes zoonoses veiculadas por alimentos, sendo que *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* representam os principais sorotipos associados à infecção em humanos (CALENGE et al., 2010). Cerca de 95% dos casos de salmonelose humana ocorrem com a ingestão de alimentos contaminados, sendo a maioria produtos de origem animal, principalmente carne de aves e ovos (JACKSON et al., 1991; REVOLLEDO et al., 2006).

Portanto é de fundamental importância a realização de medidas preventivas que valorizem os cuidados com biossegurança, manejo e meio ambiente na criação das aves. Dentre estas medidas destacam-se o uso de prebióticos, probióticos, bacteriófagos e vacinas (CHAMBERS e GONG, 2011).

Os probióticos são culturas puras ou compostas de micro-organismos vivos que beneficiam o hospedeiro pelo estímulo das propriedades existentes na microbiota natural (FAO/WHO, 2002). Sua utilização no controle de patógenos veiculados por alimentos vem ganhando destaque, principalmente por promoverem benefícios ao hospedeiro.

Um dos componentes dos probióticos com resultados satisfatórios em frangos de corte são os *Lactobacillus* spp., que entre outras funções, atuam na comunidade benéfica da mucosa intestinal, regulam a motilidade intestinal, promovem redução das reações inflamatórias e melhoram a imunidade das aves (OGRA et al., 2001).

A serotonina é uma amina biogênica, derivada do triptofano e presente em células enterocromafins da mucosa intestinal. Apresenta sete subfamílias de receptores, que interagem com a mesma, atuando em processos fisiológicos e patológicos. Participa de diversas funções do trato gastrointestinal, desempenhando um papel de destaque na interação entre os sistemas imune, endócrino e nervoso (HASLER, 2009).

Em humanos e animais experimentais há variados estudos relacionados com as funções da serotonina no trato gastrointestinal, sua interação com o sistema imunológico, regulação do crescimento celular, secreção e sensação, desenvolvimento de vilosidades intestinais e ativação de macrófagos, mas em aves estudos sobre o tema abordado são escassos.

Neste sentido, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da serotonina em associação a *Lactobacillus* spp. na resposta imune e no desenvolvimento das vilosidades intestinais de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

A primeira etapa consistiu em avaliar qual a dose dos fármacos (precursor, serotonina, inibidor) que seria utilizada, e se estas promoveriam algum efeito comportamental e alimentar nas aves.

Com os resultados obtidos, optou-se por administrar o precursor (5-hidroxitriptofano – 5HTP) e o inibidor (m-hidroxibenzilhidrazina – NSD1015) da serotonina associados à *Lactobacillus* spp., cujo objetivo foi avaliar os efeitos na resposta imune de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

Posteriormente, observaram-se os efeitos de 5HTP e NSD1015 sobre o peso corporal das aves, desenvolvimento das vilosidades intestinais, e imunomarcacão de serotonina no duodeno de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Salmonella*

Micro-organismos patogênicos veiculados por alimentos são uma importante ameaça para a saúde mundial, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em diversos países (SHINOHARA et al., 2008). Dentre estes patógenos, destacam-se as bactérias do gênero *Salmonella*.

Salmonella são enterobactérias, Gram-negativas, anaeróbios, não fermentadoras de lactose e pertencentes à família *Enterobacteriaceae* capazes de infectar uma grande variedade de animais, principalmente aves e suínos, causando sintomas que variam de uma gastroenterite fraca até a morte em alguns casos (MASTROENI et al., 2000; CALENGE et al., 2010).

Salmonelose é o termo que designa um grande número de doenças causadas por um ou mais membros do gênero *Salmonella* (GAST, 1997). Cerca de 95% dos casos de salmonelose

humana ocorrem com a ingestão de alimentos contaminados, sendo a maioria produtos de origem animal (JACKSON et al., 1991; REVOLLEDO et al., 2006).

As bactérias deste gênero podem causar nas aves três tipos de infecções, a pulorose, o tifo aviário e o paratifo aviário. A pulorose e o tifo aviário são causados por *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*, respectivamente (HOFER et al., 1997).

Outros sorotipos de *Salmonella*, como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, principais agentes do paratifo aviário, ocasionam, com frequência, enterite nas aves e queda de produção. Entretanto, o grande problema desta zoonose reside na infecção assintomática ou inaparente, que apresenta pouca ou nenhuma manifestação clínica, tornando as aves infectadas disseminadoras para outras espécies animais (ANDREATTI FILHO, 2007).

Salmonella pode ser introduzida nas granjas por meio de rações contaminadas, por via transovariana ou contaminação da casca do ovo, pela água, contato direto com aves ou portadores contaminados e por vetores como: insetos, roedores, pessoas e equipamentos (GAST, 2003).

Sua patogenicidade está relacionada com a presença de diversos fatores de virulência, como antígenos de superfície, enterotoxinas, citotoxinas, entre outros (ANDREATTI FILHO, 2009). A presença de flagelos, enzimas e fatores bioativos facilitam sua adesão ao intestino, invasão, proliferação e sobrevivência sistêmica (ALEXAN et al., 2009).

Uma vez ingerida *Salmonella* spp. resiste ao pH ácido do estômago, alcança o lúmen intestinal, invade a mucosa e replica-se na sub-mucosa. Após ultrapassar a barreira hemato-encefálica, propaga-se, via sistema linfático, para os órgãos estabelecendo as infecções sistêmicas (LÓPEZ et al., 2012).

Com isso, todas as fontes de infecção para *Salmonella* são importantes à sua disseminação (ANDREATTI FILHO, 2007). Diversas ações para prevenção e controle de salmonelose tem sido adotadas, dentre elas destacam-se implementação de medidas de biosseguridade, utilização de prebióticos, probióticos, bacteriófagos e vacinas (CHAMBERS e GONG, 2011).

2.2. *Lactobacillus*

A microbiota intestinal é composta por bactérias probióticas que apresentam grande importância na proteção do hospedeiro, formando um sistema complexo e dinâmico, responsável por influenciar decisivamente em fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos (DEBONNET et al., 2009; SILVA e ANDREATTI, 2000).

Lactobacillus são bactérias Gram-positivas, imóveis, não formadoras de esporos, catalase negativa, anaeróbios facultativos e ácidos tolerantes que predominam no trato gastrointestinal dos animais (GONG et al., 2002; BRISBIN et al., 2010).

Na avicultura, a utilização de *Lactobacillus* spp. como probiótico tem se mostrado eficiente em relação ao ganho de peso, conversão alimentar e queda na mortalidade das aves (HUANG et al., 2004). Algumas cepas de *Lactobacillus* melhoram a eficiência alimentar e crescimento de frangos de corte (RAJA et al., 2009).

As principais espécies que colonizam as aves são *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. reuteri*. São comumente encontradas no ingluvío e possivelmente no intestino desses animais. Outras bactérias, fungos, protozoários, vírus e bacteriófagos também podem ser encontrados no mesmo habitat (LU et al., 2003; MIYAMOTO et al., 2000).

O tratamento de aves com *Lactobacillus* spp. apresenta um efeito imunoestimulante na mucosa intestinal, atraindo linfócitos à lâmina própria e estimulando a síntese intestinal de Imunoglobulina A (IgA) pelo sistema imune, permitindo assim, uma maior resistência a doenças (OKAMOTO et al., 2007).

Estudos já demonstraram que *Lactobacillus* spp. consegue inibir e prevenir a colonização intestinal por enteropatógenos. Em testes *in vitro* verificou-se a inibição de *Campylobacter jejuni* por *Lactobacillus plantarum* (SANTINI et al., 2010). *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus plantarum* reduziram as infecções ocasionadas por *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Typhimurium (MURRY et al., 2004). Uma redução significativa da colonização de *Salmonella* Enteritidis após a administração de bactérias ácido-láticas 24 horas após o desafio foi vista por Higgins et al. (2010).

Em frangos de corte há uma grande proximidade de *Lactobacillus* e células do tecido linfóide, sugerindo que estes micro-organismos podem influenciar na resposta imunológica (BRISBIN et al., 2010). Haghighi et al. (2005) observaram que após a administração de *Lactobacillus* spp. para frangos de corte houve um aumento da secreção de citocinas e alterações das células linfóides do intestino. Ogra et al. (2001) demonstraram que a secreção

de imunoglobulina A (IgA) na superfície intestinal foi induzida por cepas de *Lactobacillus* spp., garantindo proteção contra infecções.

Diante disto, nos últimos anos a contribuição do uso de probióticos para a saúde do hospedeiro tornou-se cada vez mais evidente. Cepas de *Lactobacillus* passaram a ser usadas em humanos e animais como alternativas de controle e até mesmo tratamento de infecções ocasionadas por micro-organismos patogênicos, como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, entre outros (DEBONNET et al., 2009).

2.3. Microbiota e imunidade intestinal

Aves recém-nascidas têm seu sistema gastrointestinal imaturo, e sofrem alterações fisiológicas e morfológicas, ao longo da vida, buscando uma melhora na eficiência da digestão e absorção de alimentos (MURAROLLI, 2008).

Segundo Furlan et al. (2004) os processos de digestão e absorção são totalmente dependentes de mecanismos que ocorrem na mucosa intestinal, portanto a integridade das células que a compõem é de fundamental importância.

A microbiota do trato gastrointestinal das aves é composta por inúmeras espécies bacterianas, formando um sistema complexo e dinâmico, responsável por influenciar decisivamente fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos do hospedeiro (SILVA e ANDREATTI FILHO, 2000). Atua como reservatório de bactérias benéficas e patogênicas (CORR et al., 2009).

As bactérias benéficas auxiliam na digestão e absorção de nutrientes, e diminuem, por exclusão competitiva, a proliferação de agentes patogênicos. As bactérias patogênicas podem ocasionar infecções na mucosa intestinal, produção de metabólitos tóxicos e aparecimento de enfermidades (SILVA e NÖRNBERG, 2003).

Uma vez estabilizada no intestino, a microbiota torna-se resistente às condições do meio, como baixa tensão de oxigênio, presença de sais biliares, enzimas, pH e tipo de nutrientes disponíveis (ANDREATTI e SILVA, 2005). Porém em condições estressantes, as populações benéficas diminuem e as patogênicas se proliferam refletindo negativamente sobre a saúde e desempenho do animal (MATHEW, 1993).

A importância da microbiota intestinal na proteção do hospedeiro tem sido intensamente estudada em modelos animais. Têm-se observado que a colonização por *Lactobacillus* no trato gastrointestinal de ratos axênicos exerce influência negativa na

colonização de micro-organismos enteropatogênicos. Além disso, estudos em modelos animais sugerem que as propriedades imunomoduladoras dos probióticos podem ser importantes para a proteção contra infecções (CASTRO, 2005).

O sistema imune pode ser dividido em duas partes sob o ponto de vista funcional: o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo (IWASAKI e MEDZHITOV, 2010).

O sistema imune inato compreende a primeira linha de defesa do hospedeiro, onde a maioria de seus mecanismos é ativada logo após o nascimento. E, desencadeia a segunda linha de defesa (sistema imune adaptativo). É responsável por uma série de ações que ocorrem logo após o reconhecimento do patógeno, sendo, portanto, caracterizado por apresentar uma resposta rápida; baixa especificidade e memória; e curta duração (MONTASSIER, 2009; CHAMBERS e GONG, 2011).

A primeira linha é iniciada com linfócitos T, estimulando a proliferação de células caliciformes, secreção de muco e amplificação clonal de linfócitos B sensibilizados para plasmócitos secretores de IgA e exclusão imune não inflamatória. Previne a aderência e penetração de agentes infecciosos e tóxicos através da neutralização dos mesmos (ITO et al., 2009).

Já o sistema imune adaptativo é mais específico, requer mais tempo para ser ativado e possui uma resposta mais duradoura. Se expressa por meio de respostas imune humoral, sendo os anticorpos (IgG, IgA e IgM) secretados por plasmócitos derivados de linfócitos B estimulados após contato e reconhecimento de antígenos, e resposta celular, apresentando os linfócitos T como principais mediadores (CHAMBERS e GONG, 2011).

A segunda linha de defesa ocorre por meio da ativação de macrófagos e linfócitos T em cooperação com os linfócitos B que secretam anticorpos e, concomitantemente ocorre a degranulação dos mastócitos, que liberam aminas vasoativas e fatores quimiotáticos estimulando a migração de mais células inflamatórias e, por conseguinte, a implantação de resposta inflamatória e imunoregulação (STERNS et al., 2005).

Portanto, os dois sistemas se inter-relacionam, de modo que o sistema imune inato é responsável por fornecer sinais biológicos que instruem o sistema imune adquirido a produzir respostas (GALDEANO e PERDIGÓN, 2006).

2.4. Serotonina

A serotonina (5-hidroxitriptamina) é uma amina biogênica derivada da hidroxilação e posterior descarboxilação do aminoácido essencial L-triptofano, amplamente distribuído em animais, fungos, plantas, frutas e vegetais (O'CONNEL et al., 2006).

Sua síntese foi descoberta por Espamer, Page e Rapport em 1951, e desde então, tem sido tema de muitos estudos, pois está relacionada com várias funções fisiológicas e patológicas do sistema nervoso central, órgãos periféricos e sistema imunológico (LESURTEL et al., 2008).

Cerca de 90% da serotonina, é encontrada nas células enterocromafins do tubo digestivo, os outros 10% estão divididos em 8% nas plaquetas e 2% no sistema nervoso central. As plaquetas apenas captam serotonina, já os neurônios e as células enterocromafins captam e sintetizam (SHARKEY e MAWE, 2002).

Em aves as células enterocromafins contendo serotonina estão distribuídas no trato gastrointestinal assim como em mamíferos, porém em quantidades menores, (KITAZAWA et al., 2006). Sabe-se que sua distribuição é rara em proventrículo e estômago; presente na parte superior do íleo e reto; e abundante em duodeno, principalmente nas criptas e vilosidades (WATANABE et al., 1987; RAWDON e ANDREW, 1999).

Sob ação das enzimas triptofano hidroxilase (TpH1 e TpH2), encontradas respectivamente nas células enterocromafins e neurônios, o triptofano obtido a partir da dieta é hidroxilado, originando o precursor da serotonina (5-hidroxitriptofano, 5HTP). Este por sua vez, é descarboxilado sob ação da enzima L-5 hidroxitriptofano descarboxilase, formando a serotonina (5-hidroxitriptamina, 5HT), que é rapidamente metabolizada em tecidos. E, em fígado e rins degradada pela monoamina oxidase A em ácido 5-hidroxiindolacético (HIAA), excretado na urina (GERSHON e TACK, 2007; DELUCIA et al., 2007; DE PONTI, 2004).

Sabe-se que há uma grande interação da serotonina com seus receptores específicos. Atualmente há sete subfamílias de receptores, cuja relevância clínica não está bem esclarecida. Muitos receptores serotoninérgicos estão associados com células imunes como linfócitos T e B, monócitos, macrófagos e células dendríticas (CLOEZ-TAYARANI e CHANGEUX, 2007). Receptores 5HT_{1A}, 5HT_{1B/1D}, 5HT₃ e 5HT₄ são mais investigados em processos patogênicos e farmacológicos nas doenças intestinais. 5HT_{1A} e 5HT_{2B} são proeminentes no estômago, e, 5HT₃, 5HT₄ são predominantes no intestino (HASLER, 2009).

As células enterocromafins liberam serotonina para o sangue, tecidos circundantes e lúmen intestinal a partir da distensão intraluminal, estimulação vagal e presença de soluções ácidas no duodeno. Após sua liberação para o lúmen ou lâmina própria a serotonina atua sobre enterócitos ou células entéricas do sistema nervoso e inicia atividades secretórias (KHAN e GHIA, 2010; FUJIMIYA et al., 1997; FUKUMOTO et al., 2003).

A liberação de serotonina pode ser inibida ou estimulada dependendo da quantidade de nutrientes e aminoácidos existentes, do pH intestinal, do estado imunológico do hospedeiro e da microbiota intraluminal (KIDD et al., 2008). Uribe et al. (1994) observaram que em ratos axênicos o volume total de células imunomarcadas para serotonina na mucosa aumentou em todo o trato gastrointestinal quando comparado a ratos convencionais.

As complexas interações entre microbiota, dieta e células intestinais influenciam na síntese, liberação e degradação de 5HT (WANG et al., 2007). Acredita-se que a disponibilidade de serotonina é dependente da atuação de seu transportador específico (SERT), localizado nos enterócitos ou células vasculares endoteliais (TONINI, 2005).

Colites em humanos e animais experimentais estão associadas com mudanças na quantidade de células enteroendócrinas e na recaptação de serotonina pelo seu transportador (SERT), alterando a disponibilidade de 5HT na mucosa intestinal (O'HARA et al, 2006).

Em condições patológicas agudas estudos sugerem um papel generalizado da serotonina na tentativa de eliminar enterotoxinas produzidas por bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (HANSEN e WITTE, 2008). Porém estes mecanismos não estão totalmente esclarecidos (KHAN e GHIA, 2010).

Sabe-se que tanto a serotonina como as células imunes estão presentes na mucosa intestinal, porém pouco se sabe sobre a relação anatômica entre as mesmas (ANLAUF et al., 2003). Sugere-se que a proximidade de células imunes, células enterocromafins e disponibilidade de 5HT possam regular as funções imunes e endócrinas (MANOCHA e KHAN, 2012).

Yang e Lackner (2003) demonstraram a presença anatômica muito próxima de células enterocromafins imunomarcadas para 5HT e linfócitos T CD3⁺ e linfócitos B CD20⁺ na mucosa intestinal de macaco-rhesus (*Macaca mulatta*), possibilitando uma interação entre os mesmos.

Estudos realizados por Wang et al. (2007) em camundongos imunodeficientes infectados com *Trichuris muris* demonstraram que os linfócitos T CD4⁺ podem modular o número de células EC e a disponibilidade de 5HT.

De acordo com os resultados obtidos por Nakamura et al. (2008) a serotonina atua na ativação da fagocitose em macrófagos, e seu precursor (5-hidroxitriptofano) induz o desenvolvimento das microvilosidades intestinais em roedores.

No sistema nervoso entérico, a serotonina participa do controle da atividade motora normal do trato gastrointestinal; regula a ingestão de comida; crescimento celular; secreção e sensação (HASLER, 2009).

Também tem demonstrado exercer um efeito no comportamento das aves. Em experimentos realizados com codornas por Polo et al. (2007) doses diferentes de serotonina produziram uma série de eventos relacionados a um estado semelhante ao sono.

A atuação do sistema serotoninérgico no comportamento das aves, regulação da resposta imune inata e adaptativa, patogênese de doenças gastrintestinais e crescimento celular tem sido analisado através do uso de precursores, liberadores, agonistas, antagonistas e inibidores da recaptação de serotonina (SHEA et al., 1990).

O esclarecimento das ações de precursores, receptores e a própria serotonina, promoverá o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que poderão atuar no controle ou prevenção de desordens gastrintestinais. Portanto torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que possam confirmar ou descobrir novas ações dos mesmos no trato gastrintestinal das aves.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da serotonina, através da administração do seu precursor (5-hidroxitriptofano) ou da inibição de sua síntese com NSD1015, na resposta imune e morfometria intestinal de frangos de corte.

3.2. Objetivos específicos

Definir a dose dos fármacos utilizados;

Observar a ocorrência de alterações comportamentais, alimentares e peso médio corporal das aves que receberam o precursor, serotonina e inibidor;

Verificar as influências do precursor e inibidor associados à *Lactobacillus* spp. sobre a resposta imune humoral de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis. Esta avaliação foi feita a partir da quantificação das concentrações de IgA no fluído intestinal e IgG sérico;

Avaliar a eficácia do precursor, inibidor, *Lactobacillus* spp. e suas associações em frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis por meio da quantificação da bactéria no conteúdo cecal;

Observar se o precursor, inibidor, *Lactobacillus* spp. e suas associações promoveram alterações na densidade e altura das vilosidades na porção proximal do duodeno;

Verificar se a presença de *Lactobacillus* spp. e *Salmonella* Enteritidis influenciaram a imunoexpressão de serotonina no duodeno.

**CAPÍTULO 2 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE SEROTONINA, 5-
HIDROXITRIPTOFANO E M-HIDROXIBENZILHIDRAZINE NO
COMPORTAMENTO E INGESTÃO DE RAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE
(*Gallus gallus domesticus* – LINNAEUS 1758).**

Taís Cremasco Donato, Ana Angelita Sampaio Baptista, Guilherme Augusto Marietto
Gonçalves, Milena P. Coppola, Raphael Lucio Andreatti Filho.

Manuscrito a ser enviado para revista *Veterinária e Zootecnia*.

Resumo

A serotonina é uma amina biogênica derivada do triptofano que apresenta diversas funções, como regulação do humor, sono, apetite, atividade motora gastrointestinal, entre outras. Em mamíferos e no homem suas funções são bastante estudadas, porém há poucos relatos em aves. O presente estudo investigou os efeitos de diferentes doses de serotonina, seu precursor 5-hidroxitriptofano (5HTP), e inibidor m-hidroxibenzilhidrazina (NSD1015), administrados via intraperitoneal por cinco dias consecutivos, no comportamento e peso corporal de frangos de corte. A administração de serotonina ocasionou alterações caracterizadas por sonolência e reduziu o ganho de peso das aves. Seu precursor (5HTP) também ocasionou sonolência nas aves, porém em intensidade menor e o ganho de peso foi mantido. E as aves em que o inibidor (NSD1015) foi administrado não apresentaram alterações no comportamento e no ganho de peso. Estes resultados sugerem o envolvimento de vias serotoninérgicas no comportamento das aves e na ingestão de ração, e dependendo da dose administrada pode influenciar no peso médio corporal das aves.

Palavras chave: Serotonina, 5-hidroxitriptofano, NSD1015, comportamento alimentar, frangos de corte.

Abstract

Serotonin is a biogenic amine tryptophan derivative that has various functions such as the regulation of mood, sleep, appetite, gastrointestinal motor activity, among others. In mammals and men the function of serotonin is well studied, but there are few reports in birds. The present study investigated the effects of different doses of serotonin, its precursor, 5-hydroxytryptophan (5HTP), and its inhibitor, m-hidroxibenzilhidrazina (NSD1015), administered intraperitoneally for five consecutive days, in the behavior and body weight of broiler. Administration of serotonin induced changes characterized by sleepiness and reduced the weight gain of the birds. Its precursor (5HTP) also caused drowsiness in birds, but at a lower intensity and weight gain was maintained. And the birds in the inhibitor (NSD1015) were administered showed no changes in behavior and weight gain. These results suggest the involvement of serotonergic pathways in the behavior of the birds and feed intake and, depending on the dose it can influence the mean body weight of the birds.

Key-words: Serotonin, 5-hydroxytryptophan, NSD1015, feeding behavior, chicken.

Resumen

La serotonina es un biogénico amina triptófano derivado que tiene varias funciones, como la regulación del estado de ánimo, el sueño, el apetito, la actividad motora gastrointestinal, entre otros. En los mamíferos y en el hombre sus funciones son ampliamente estudiadas, pero existen pocos reportes en aves. El presente estudio investigó los efectos de diferentes dosis de la serotonina, su precursor 5-hidroxitriptófano (5HTP), y los inhibidores de m-hidroxibenzilhidrazine (NSD1015), administrada por vía intraperitoneal durante cinco días consecutivos, en el comportamiento y el peso corporal de los pollos de engorde. Administración de la serotonina induce cambios caracterizados por la somnolencia y la reducción de la ganancia de peso de las aves. Su precursor (5HTP) también causó somnolencia en las aves, pero con una intensidad y menor peso se mantuvo ganancia. Y los pájaros en el inhibidor (NSD1015) se administró no mostraron cambios en el comportamiento y el aumento de peso. Estos resultados sugieren la implicación de las vías serotoninérgicas en el comportamiento de las aves y la ingesta de pienso y, dependiendo de la dosis puede influir en el peso corporal medio de los pájaros.

Palabras clave: serotonina, 5-hidroxitriptófano, NSD1015, comportamiento la alimentación, pollos.

1.Introdução

A serotonina é uma amina biogênica com, aproximadamente, sete subfamílias de receptores, cuja relevância clínica não está bem esclarecida (1).

É formada a partir do triptofano da dieta que sofre ação das enzimas triptofano hidroxilase (TpH1 e TpH2) originando o precursor da serotonina (5-hidroxitriptofano, 5HTP). Este por sua vez, é descarboxilado sob ação da enzima L-5 hidroxitriptofano descarboxilase, formando a serotonina (5-hidroxitriptamina, 5HT), que é rapidamente metabolizada em tecidos. E, em fígado e rins degradada pela monoamina oxidase A em ácido 5-hidroxiindolacético (HIAA), excretado na urina (2); (3); (4); (5).

Sabe-se que a serotonina pode atuar no comportamento das aves e ingestão de ração (6); (7). Uma mistura comercial de 20 aminoácidos contendo triptofano administrado via intraperitoneal em frangos de corte, com idade entre 2 a 27 dias de vida, diminuiu a ingestão de ração por até 12 horas. Entretanto, este fenômeno ocorreu em aves a partir de cinco dias de vida, em aves com três dias a ingestão de ração diminuiu somente na primeira hora após a administração dos aminoácidos e aves com menos de três dias não apresentaram resposta, sugerindo que alguns componentes do sistema serotoninérgico ainda estejam em fase de maturação logo após o nascimento (8).

Doses mais altas de serotonina promoveram alterações comportamentais nas aves, que se mostraram apáticas, agachadas e empoleiradas com penas arrepiadas. Durante os 30 minutos após a administração, as aves jovens raramente bicaram a ração (9).

Polo et al. (10) ao administrarem diferentes doses de serotonina em codornas observaram uma série de eventos relacionados a um estado semelhante ao sono, que começaram com o eriçamento das penas, bocejos, piscadelas, agachamento e fechamento dos olhos.

Reis et al. (11) revelaram que, entre as ações da serotonina, o eriçamento das penas, movimentos orais rápidos e o comportamento semelhante ao bocejo foram originados pela ativação de receptores 5-HT₂, já o piscar e fechamento dos olhos possivelmente ocorreram devido a outros subtipos de receptores.

Diante disso, este estudo teve como objetivo observar o peso corporal e a ocorrência de alterações comportamentais e alimentares em aves que receberam, por cinco dias consecutivos, via intraperitoneal, doses diferentes do precursor 5-hidroxitriptofano (5HTP), da serotonina (5HT) e do inibidor m-hidroxibenzilhidrazine (NSD1015).

2. Material e métodos

Foram alojados 297 machos matrizes de corte (*Gallus gallus domesticus*), com um dia de vida, em gaiolas experimentais no Infectório do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista-UNESP/Botucatu-SP. Receberam água e ração não medicada *ad libitum* e aquecimento necessário conforme idade. Foram divididos em onze tratamentos compostos por 27 aves cada, assim constituídos:

Tratamento 1 (T1): aves tratadas com 5-hidroxitriptofano (12,5 mg/kg de peso vivo);

Tratamento 2 (T2): aves tratadas com 5-hidroxitriptofano (25 mg/kg de peso vivo);

Tratamento 3 (T3): aves tratadas com 5-hidroxitriptofano (50 mg/kg de peso vivo);

Tratamento 4 (T4): aves tratadas com serotonina (1,25 mg/kg de peso vivo);

Tratamento 5 (T5): aves tratadas com serotonina (2,5 mg/kg de peso vivo);

Tratamento 6 (T6): aves tratadas com serotonina (5,0 mg/kg de peso vivo);

Tratamento 7 (T7): aves tratadas com NSD1015 (100 mg/kg de peso vivo);

Tratamento 8 (T8): aves tratadas com NSD1015 (150 mg/kg de peso vivo);

Tratamento 9 (T9): aves tratadas com NSD1015 (300 mg/kg de peso vivo);

Tratamento 10 (T10): aves não tratadas.

Tratamento 11 (T11): aves tratadas com 0,1 mL de NaCl a 0,9% (solução salina).

As doses utilizadas tiveram como referências estudos realizados por Polo et al. (10); Reis et al. (11) e Nakamura et al. (12). Foram administradas uma vez ao dia, via intraperitoneal por cinco dias consecutivos (do 6º ao 10º dia de idade), na quantidade de 0,1mL/ave com seringa de 1mL e agulha de 0,45 x 13mm. As inoculações foram feitas em um ângulo de 45º no quadrante médio da parede pélvica, conforme descrito por Cedraz-Mercez et al. (13).

2.1. Avaliação do peso médio corporal

Para esta avaliação todas as aves de cada tratamento foram pesadas com o uso de uma balança digital nos dias cinco, seis, sete, oito, nove, 10 e 11.

2.2. Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se esquema fatorial de grupos independentes. Análise de variância, seguida de teste de Tukey a 5% de significância foi usada para comparar o peso médio corporal entre os tratamentos (14).

3. Resultados

As aves de todos os tratamentos apresentaram um ganho de peso ao longo dos dias e os resultados foram estatisticamente iguais ($p>0,05$) até 9 dias de idade. Conforme demonstrado na Figura 1.

Aos 10 dias, os tratamentos T5 (serotonina–2,5mg/Kg) e T6 (serotonina– 5,0mg/Kg) determinaram valores menores, com média de peso corporal de 216,5g, e diferiram significativamente de T1 (245,3g); T7 (238,8g); T8 (245,2g) e dos controles negativos T10 (241,2g) e T11(249,3g).

Com 11 dias o tratamento T8 (NSD1015–150mg/Kg) apresentou o maior peso corporal (267,7g), sendo estatisticamente diferente de T5 (238,2g) e T6 (231,1g), mas sem diferenças significantes em relação aos demais tratamentos.

Ao avaliar a média geral dos tratamentos. Observa-se que a serotonina (T4, T5, T6) determinou os menores valores de peso médio corporal, diferindo do controle negativo. Em todos os tratamentos não houve diferença significativa entre a maior e menor dose dos fármacos administrados, apenas diferenças comportamentais.

4. Discussão

As funções da serotonina vêm sendo amplamente estudadas, principalmente em mamíferos, e tem-se explorado diferentes formas de interação da mesma com o sistema imunológico, regulação do crescimento celular, secreção e sensação, desenvolvimento de vilosidades intestinais, ativação de macrófagos e comportamento alimentar (1).

As manipulações de precursores, serotonina e inibidores podem resultar em mudanças comportamentais, incluindo a agressão ou sedação, e mudanças na ingestão de ração, influenciando diretamente o peso corporal das aves (15).

Os tratamentos com serotonina (T1, T2, T3) determinaram um peso médio corporal menor, diferindo significativamente dos controles negativos. Provavelmente, esta queda no peso se deve a mudanças no comportamento das aves em que a serotonina foi administrada. A

administração intraperitoneal promoveu mudanças comportamentais em todas as aves, ocasionando uma sequência de eventos caracterizados por sonolência, sendo mais intenso e duradouro nos tratamentos com doses maiores (T5 e T6).

As aves começaram a bocejar, eriçar e agitar as asas, em seguida fecharam os olhos e repousaram. Durante este período de sonolência não houve ingestão de ração. Nos tratamentos T5 e T6 as aves permaneceram em repouso por aproximadamente 10 minutos.

No tratamento T4 (dose menor) as aves se alimentaram primeiro que as aves dos tratamentos T5 e T6. Nestes a alimentação retornou aos padrões normais somente 1 hora após a administração.

Estes resultados corroboram com Polo et al. (10), que ao analisarem codornas de 3 meses que receberam serotonina, via parenteral, nas doses de 0,125, 1,25 e 2,5 mg/Kg, observaram comportamentos semelhantes ao sono começando com o eriçamento das penas, bocejos, piscadelas, agachamento e fechamento dos olhos.

Os valores de peso corporal foram inversamente proporcionais as doses de serotonina administrada, ou seja, quanto maior a dose menor o peso médio corporal, concordando com as observações comportamentais, já que nas doses maiores os efeitos de sonolência e ausência de alimentação foram mais intensos.

Nos tratamentos com 5-hidroxitriptofano (T1, T2, T3) as aves apresentaram os mesmos sinais de sonolência dos tratamentos com serotonina (T4, T5, T6), porém, estes sinais foram observados em aproximadamente 70% das aves e os efeitos menos intensos. A ingestão de ração foi inibida por períodos inferiores a 10 minutos.

O mesmo foi observado por Reis et al. (11), no qual a administração de 5-hidroxitriptofano, via intraperitoneal em codornas, um e 60 minutos antes da presença de ração, nas doses de 12,5, 25,0 e 50,0 mg/Kg causou uma redução significativa na ingestão alimentar. Em codornas com jejum alimentar de 6 horas, a inibição da ingestão de ração ocorreu somente quando a ração foi dada um minuto após o fármaco, nos grupos com ração administrada 60 minutos após o precursor, não houve inibição da ingestão. Neste caso, possivelmente, o estresse das aves gerado pelo jejum aumentou a captação neuronal do precursor da serotonina, antecipando o pico de produção da mesma (16).

O peso corporal das aves tratadas com 5-hidroxitriptofano não diferiu dos controles (T10 e T11). Apesar das aves apresentarem declínio da atividade de alerta, este foi menos intenso e não acometeu todas as aves dos tratamentos, portanto a ingestão de ração diminuiu

logo após a administração do fármaco, mas esta diminuição não foi significativa a ponto de promover uma queda no peso médio corporal.

Nas aves em que o inibidor NSD1015 (T7, T8, T9) foi administrado, não houve alteração comportamental e a ingestão de ração manteve-se inalterada. Isto pode ser justificado pelo fato que NSD1015, de acordo com Nakamura et al. (12), promove uma inibição da recaptação de serotonina, portanto os sinais de sonolência e sensação de saciedade provocada pela mesma não apareceram e as aves comportaram-se da mesma forma que as aves dos tratamentos controles, ingerindo ração normalmente.

Os controles (T10 e T11) apresentaram valores de peso corporal maiores quando comparados aos demais tratamentos. Estes valores já eram esperados visto que, os tratamentos controle não apresentaram alterações comportamentais e a ingestão de ração manteve-se normal.

Os comportamentos dos tratamentos com serotonina (T1, T2, T3) e 5-hidroxitriptofano (T4 T5, T6) se repetiram ao longo dos dias de administração, porém em intensidade menor, com períodos de sonolência menores, sugerindo um efeito dose dependente, conforme descrito por Leibowitz and Shor-Posner (17).

Com relação às doses dos fármacos, em todos os tratamentos não houve diferença significativa entre a maior e a menor dose, apenas diferenças comportamentais.

Os resultados obtidos demonstram um possível efeito da resposta hipnagênica na ingestão alimentar e ganho de peso das aves, porém como este mecanismo ocorre ainda não está bem esclarecido e mais estudos são necessários.

5. Conclusão

Os tratamentos com serotonina, via intraperitoneal por cinco dias consecutivos, determinaram alterações caracterizadas por sonolência e diminuíram o peso corporal das aves devido a não ingestão de ração após a administração da monoamina. O 5-hidroxitriptofano também promoveu efeitos semelhantes ao sono, diminuindo a atividade de alerta das aves, porém a intensidade foi menor e não influenciou significativamente o peso corporal. Nas aves em que o inibidor (NSD1015) foi administrado, o comportamento e o peso médio corporal mantiveram-se inalterados.

6. Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - processo 472571/2011-7) pelo financiamento do projeto e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo 2011/15338-1) pela concessão da bolsa de estudo.

7. Comitê de ética e biossegurança

Todos os procedimentos realizados encontram-se de acordo com as normas e princípios éticos de experimentação animal, estabelecidos pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ/UNESP, sendo o experimento aprovado pela mesma (Protocolo nº 191/2011-CEUA) em 02 de setembro de 2011.

8. Referências Bibliográficas

- (1) Hasler WL. Serotonin and the GI tract. *Curr gastroenterol rep.* 2009; 11:383-391.
- (2) Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology.* 2007; 132:397-414.
- (3) De Ponti F. Pharmacology of serotonin: what a clinician should know. *Gut.* 2004; 53:1520-1535.
- (4) Delucia R, Oliveira-Filho RM, Planeta CS, Gallaci M, Avellar MCW. *Farmacologia Integrada.* 3 Ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. p.184-189.
- (5) Lesurtel M, Soll C, Graf R, Clavien PA. Role of serotonin in the hepato-gastrointestinal tract: an old molecule for new perspectives. *Cel mol lif sci.* 2008; 65:940-950.
- (6) Denbow DM, Van-Krey HP, Cherry JA. Feeding and drinking response of young chicks to injection of serotonin into the lateral ventricle of the brain. *Poult Sci.* 1982; 61:159-155.
- (7) Denbow DM. Body temperature and food intake of turkeys following ICV injections of serotonin. *J. nutr behave.* 1984; 1:301-308.
- (8) Baranyiova EA. Effect of intraperitoneal administration of amino acids on the food intake of chickens in the first month after hatching. *Acta Vet Brno.* 1987; 56:417-426.
- (9) Baranyiova EA. Effect of serotonin on the food intake in chickens in the post-hatching period. *Acta Vet Brno.* 1990; 59:23-33.

- (10) Polo PA, Reis RO, Cedraz-Mercez PL, Cavalcante-Lima HR, Olivares EL, Medeiros MA, Cortes WR, Reis LC. Behavioral and neuropharmacological evidence that serotonin crosses the blood-brain barrier in *Coturnix japonica* (Galliformes; Aves). *Braz j biol.* 2007; 67:167-171.
- (11) Reis LC, Almeida AC, Cedraz-Mercez PL, Olivares EL, Marinho JrA, Thomaz CM. Evidence indicating participation of the serotonergic system in controlling feeding behavior in *Coturnix japonica* (Galliformes: Aves). *Braz j biol.* 2005; 65:353-361.
- (12) Nakamura K, Sato T, Ohashi A, Tsurui H, Hasegawa H. Role of a Serotonin Precursor in Development of Gut Microvilli. *Am j Pathol.* 2008; 172(2):333-344.
- (13) Cedraz-Mercez PL, Almeida AC, Thomaz CM, Costa e Sousa, RH, Olivares EL, Cortes WS, Medeiros MA, Reis LC. Effect of L-5 Hydroxytryptophan on drinking behavior in *Coturnix japonica* (Temminck and Schlegel, 1849) (Galliformes:Aves): Involvement of rennin-angiotensin system. *Braz j biol.* 2007; 67(4):771-776.
- (14) SAS Institute. SAS/STAT User`s Guide. Version 9.2. SAS Institute Inc, Cary, NC. 2009.
- (15) Leathwood PD. Tryptophan availability and serotonin synthesis. *Proc. Nutr.* 1987; 46:143-156.
- (16) Carsia RV, Harvey S. Adrenals. In: Sturkies`s Avian Physiology, 5º Ed. San Diego: Academic Press, 2000. p.489-537.
- (17) Leibowitz SF, Shor-Posner G. Brain serotonin and eating behavior. *Appetite.* 1986; 7:1-14.

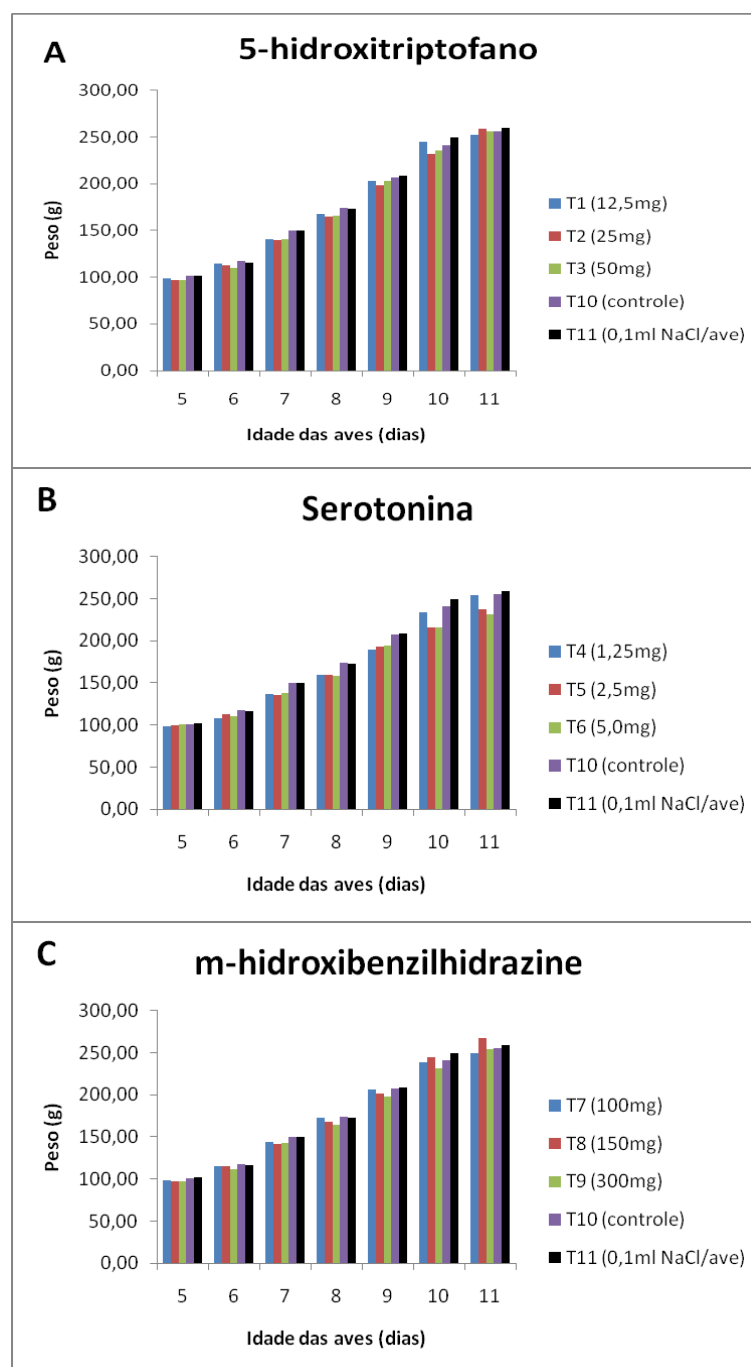


Figura 1. (A) Peso médio corporal das aves tratadas, via intraperitoneal, com 5-hidroxitriptofano (T1, T2, T3) e os dois controles negativos (T10 e T11). (B) Peso médio corporal das aves tratadas com serotonina (T4, T5, T6) e os dois controles negativos (T10 e T11). (C) Peso médio corporal das aves tratadas com m-hidroxi benzilhidrazine (T7, T8, T9) e os dois controles negativos (T10 e T11). Todas as doses foram calculadas em mg/Kg de peso vivo.

**CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE 5-HIDROXITRIPTOFANO E
M-HIDROXIBENZILHIDRAZINE ASSOCIADOS À *Lactobacillus* spp. NA
RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE (*Gallus gallus domesticus* –
LINNAEUS 1758) DESAFIADOS COM *Salmonella* ENTERITIDIS.**

Taís Cremasco Donato, Ana Angelita Sampaio Baptista, Bruna Domeneghetti
Smaniotto, Keila C. O. Dutka Garcia, João Carlos Zamae Rodrigues, Adriano Sakai
Okamoto, Raphael Lucio Andreatti Filho.

Manuscrito a ser enviado para a revista *Poultry Science*.

Resumo

Este estudo objetivou avaliar a resposta imune humoral e a quantificação de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte que receberam o precursor da serotonina (5-hidroxitriptofano), o inibidor (m-hidroxibenzilhidrazine) e *pool* de *Lactobacillus*. Para isso, as aves foram divididas em dois experimentos, sem desafio (experimento 1) e com desafio (experimento 2) por *S. Enteritidis*. Dosagens de IgA intestinal e IgG sérico foram verificadas pelo método de ELISA, e a quantificação de *S. Enteritidis* avaliada por meio da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). No experimento 1, as concentrações de IgA intestinal e IgG sérica não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$). No experimento 2, no qual as aves foram desafiadas com *S. Enteritidis*, o inibidor da serotonina associado a *Lactobacillus* determinou maiores concentrações de IgA, promovendo maior estímulo no sistema imune quando comparado com o precursor. As concentrações de IgG foram similares, sem diferenças estatísticas ($p>0,05$). Com relação à quantificação de *Salmonella* Enteritidis no conteúdo cecal das aves do experimento 2, observa-se que o precursor associado à *Lactobacillus* determinou menores quantificações bacterianas diferindo do controle positivo. Pode-se concluir que houve pouca influência do precursor e inibidor da serotonina na indução de resposta imune humoral mediada por IgA e IgG, inferindo que a disponibilidade ou inibição da síntese de serotonina possa influenciar o sistema imune de outra maneira. Apesar do precursor não apresentar altos níveis de IgA e IgG, observou-se uma redução de *Salmonella* Enteritidis, o que demonstra a interação de 5-hidroxitriptofano e *Lactobacillus* spp. com o sistema imunológico das aves por meio de mecanismos que precisam ser mais elucidados em estudos posteriores.

Palavras-chave: Serotonina, *Salmonella* Enteritidis, *Lactobacillus* spp., resposta imune de aves.

Abstract

This study aimed to evaluate the humoral immune response and quantification of *Salmonella* Enteritidis in broilers receiving the precursor of serotonin (5-hydroxytryptophan), the inhibitor (m-hidroxibenzilhidrazine) and *Lactobacillus* pool. For this, the birds were divided into two experiments with challenge and without challenge by *S. Enteritidis*. Measurement of intestinal IgA and serum IgG were checked by ELISA, and to quantify *S. Enteritidis* assessed by counting colony forming units (CFU/mL). In experiment 1, the concentrations of intestinal IgA and serum IgG showed no significant differences ($p>0,05$). In experiment 2, in which the birds were challenged with *S. Enteritidis* inhibitor of serotonin determined *Lactobacillus* associated with higher concentrations of IgA, promoting greater stimulation of the immune system when compared to the precursor. The IgG concentrations were similar, with no statistical differences ($p>0,05$). Regarding the quantification of *Salmonella* Enteritidis in cecal contents of birds in experiment 2, it is observed that the precursor associated with *Lactobacillus* determined under differing bacterial quantifications of the positive control. It can be concluded that there was little influence of the precursor and inhibitor of serotonin in the induction of humoral immune response mediated by IgA and IgG, implying that the availability or inhibition of serotonin may influence the immune system otherwise. Although the precursor does not show high levels of IgA and IgG was observed a reduction of *Salmonella* Enteritidis, showing the interaction of 5-hydroxytryptophan and *Lactobacillus* spp. with the immune system of birds through mechanisms that need to be elucidated in further studies.

Key-words: Serotonin, *Salmonella* Enteritidis, *Lactobacillus* spp., avian immune response.

1.Introdução

Micro-organismos patogênicos veiculados por alimentos, como por exemplo, *Salmonella* spp., são de grande importância para a saúde pública, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em muitos países (Shinohara et al., 2008).

A salmonelose em humanos ocorre a partir da ingestão de água e alimentos contaminados, sendo a maioria produtos de origem animal, como carne de aves e ovos (Jackson et al., 1991; Revollo et al., 2006). Diante disto, é fundamental evitar a entrada deste micro-organismo na cadeia alimentar através de medidas de prevenção e controle de salmonelose em aves (Berndt et al., 2007).

A utilização de probióticos, como *Lactobacillus* spp., no controle de patógenos veiculados por alimentos vem ganhando destaque nos últimos anos, devido aos benefícios promovidos ao hospedeiro (Brisbin et al., 2010; Andreatti Filho, 2007). São capazes de formar um sistema complexo e dinâmico, responsável por influenciar decisivamente em fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos (Debonnet et al., 2009).

A integridade das células que compõem a mucosa intestinal é de fundamental importância, pois é na mucosa que ocorre o estabelecimento de contato entre enteropatógenos e hospedeiro, ou seja, a primeira linha de defesa contra infecções virais e bacterianas (Muir et al., 2000; Liu et al., 2010).

Na mucosa intestinal as células enteroendócrinas produzem substâncias como gastrina, secretina, colecistoquinina e serotonina, entre outras, que participam dos processos de digestão, absorção, proliferação epitelial e modulação do sistema imune (Uribe et al., 1994).

Há evidências que a serotonina modula a resposta imune inata e adaptativa através de seus receptores podendo muitas vezes atuar como mediador em doenças inflamatórias intestinais (Garabal et al., 2003). Porém estes mecanismos não estão totalmente esclarecidos (Khan e Ghia, 2010).

Em condições patológicas agudas estudos sugerem um papel generalizado da serotonina na tentativa de eliminar enterotoxinas produzidas por bactérias como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (Hansen e Witte, 2008). Vários receptores serotoninérgicos estão sendo caracterizados em linfócitos, monócitos, macrófagos e células dendríticas (Cloezy-Tayarani e Changeux, 2007). Reforçando a suspeita de que a

serotonina desempenha um importante papel na patogênese de doenças intestinais (Manocha e Khan, 2012).

Com base no exposto acima, este estudo verificou as influências do precursor (5-hidroxitriptofano) e inibidor (m-hidroxibenzilhidrazine) da serotonina associados à *Lactobacillus* spp. sobre a resposta imune de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis, e a recuperação de *S. Enteritidis* no conteúdo cecal.

2. Material e métodos

2.1. Cultivo e administração do inóculo de *Lactobacillus* spp.

As cepas de *Lactobacillus* spp. utilizadas neste estudo (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brueckii* e *Lactobacillus* spp.) foram isoladas de aves e selecionadas de acordo com a capacidade de adesão e efeito imunomodulatório descrito por Rocha et al. (2012).

O cultivo das cepas foi realizado separadamente em 15mL de meio líquido Man Rogosa Sharp (MRS), em condições de anaerobiose a 37°C por 48 horas. Um *pool* das espécies cultivadas foi formado com 1mL de cada cultivo, seguindo a proporção de 1:1. Após a formação do *pool*, foi realizada a quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) através de diluições decimais seriadas em solução tampão de salina fosfatada (PBS) com pH 7,2 e posterior plaqueamento em ágar MRS.

As aves receberam inóculos de 500µl do *pool* de *Lactobacillus* com $1,0 \times 10^9$ UFC/mL administrados via oral, diretamente no esôfago/inglúvio de cada ave, com o auxílio de agulha de gavagem estéril.

2.2. Cultivo e administração do inóculo de *Salmonella* Enteritidis.

O desafio foi feito com cultura de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis fagotipo 4, mutante resistente ao ácido nalidíxico (Nal) e rifampicina (Rif), desenvolvida por meio de cultivos sucessivos em ágar verde brilhante (AVB) contendo ácido nalidíxico (100g/mL de meio) e rifampicina (100g/mL de meio), conforme Andreatti Filho et al (1997).

A amostra de *S. Enteritidis* resistente ao ácido nalidíxico e rifampicina foi cultivada em 20mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI) incubada a 40°C por 18-24 horas. A quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) do inóculo foi

realizada através de diluições decimais seriadas em solução tampão de salina fosfatada (PBS) com pH 7,2 e posterior plaqueamento, em duplicata, em ágar verde brilhante (AVB) contendo ácido nalidíxico (100g/mL de meio) e rifampicina (100g/mL de meio).

As aves receberam inóculos de 1mL com $2,0 \times 10^6$ UFC/mL de *S. Enteritidis* administrados via oral, diretamente no esôfago/inglúvio de cada ave, com o auxílio de agulha de gavagem estéril.

2.3. 5-hidroxitriptofano (5HTP) e m-hidroxibenzilhidrazine (NSD1015).

Estudos prévios (Capítulo 2) foram realizados no Infectório do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Botucatu-SP com o objetivo de determinar as doses de 5-hidroxitriptofano (5HTP) e m-hidroxibenzilhidrazine (NSD1015). Optou-se administrar 5HTP (25mg/kgPV) e NSD1015 (150mg/kgPV).

Os fármacos foram administrados via intraperitoneal na quantidade de 0,1ml/ave com seringa de 1mL e agulha 0,45 x 13mm. As inoculações foram feitas em um ângulo de 45° no quadrante médio da parede pélvica, conforme descrito por Cedraz-Mercez et al. (2007).

2.4. Delineamento experimental.

2.4.1. Experimento 1

Foram alojados 288 machos matrizes de corte (*Gallus gallus domesticus*), de um dia de vida, em gaiolas experimentais no Infectório do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Botucatu-SP. Os animais receberam água e ração não medicada *ad libitum* e aquecimento necessário conforme idade.

As aves foram distribuídas em um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos de 36 aves cada, oito períodos de avaliação e seis repetições por período:

Tratamento 1 (T1): aves tratadas com 5HTP;

Tratamento 2 (T2): aves tratadas com NSD1015;

Tratamento 3 (T3): aves tratadas com 5HTP e *pool* de *Lactobacillus*;

Tratamento 4 (T4): aves tratadas com NSD1015 e *pool* de *Lactobacillus*;

Tratamento 5 (T5): aves tratadas com *pool* de *Lactobacillus*;

Tratamento 6 (T6): aves tratadas com 0,1mL de NaCl a 0,9%.

5-hidroxitriptofano (5HTP), m-hidroxibenzilhidrazine (NSD1015) e NaCl foram administradas uma vez ao dia, via intraperitoneal, por cinco dias consecutivos (do 4º ao 8º dia de idade), na quantidade de 0,1mL/ave com seringa de 1mL e agulha de 0,45 x 13mm.

O *pool* de *Lactobacillus* com $1,0 \times 10^9$ UFC/mL foi administrado uma vez ao dia, via oral, por cinco dias consecutivos (do 4º ao 8º dia de idade), na quantidade de 500µl/ave com o auxílio de uma agulha de gavagem estéril.

2.4.2. Experimento 02

Foram alojados 366 machos matrizes de corte (*Gallus gallus domesticus*), de um dia de vida, em gaiolas experimentais do Infectório do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Botucatu-SP. Os animais receberam água e ração não medicada *ad libitum* e aquecimento necessário conforme idade.

As aves foram distribuídas em um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por sete tratamentos de 36 aves cada, oito períodos de avaliação e seis repetições por período:

Tratamento 1 (T1): aves tratadas com 5HTP e desafiadas com *S. Enteritidis*;;

Tratamento 2 (T2): aves tratadas com NSD1015 e desafiadas com *S. Enteritidis*;;

Tratamento 3 (T3): aves tratadas com 5HTP, *pool* de *Lactobacillus* e desafiadas com *S. Enteritidis*;

Tratamento 4 (T4): aves tratadas com NSD1015, *pool* de *Lactobacillus* e desafiadas com *S. Enteritidis*;

Tratamento 5 (T5): aves tratadas com *pool* de *Lactobacillus* e desafiadas com *S. Enteritidis*;

Tratamento 6 (T6): aves desafiadas com *S. Enteritidis*;

Tratamento 7 (T7): aves tratadas com 0,1mL de NaCl a 0,9%.

5-hidroxitriptofano (5HTP), m-hidroxibenzilhidrazine (NSD1015) e NaCl foram administradas uma vez ao dia, via intraperitoneal, por cinco dias consecutivos (do 4º ao

8º dia de idade), na quantidade de 0,1mL/ave com seringa de 1mL e agulha de 0,45 x 13mm.

O pool de *Lactobacillus* com $1,0 \times 10^9$ UFC/mL foi administrado uma vez ao dia, via oral, por cinco dias consecutivos (do 4º ao 8º dia de idade), na quantidade de 500µl/ave com o auxílio de uma agulha de gavagem estéril. E, o desafio com *S. Enteritidis* ($2,0 \times 10^6$ UFC/mL) foi realizado no oitavo dia de idade, via oral na quantidade de 1mL/ave com o auxílio de agulha de gavagem estéril.

2.5. Monitoria sorológica

Nos experimentos 1 e 2, seis aves de cada tratamento foram selecionadas aleatoriamente nos dias quatro, oito, 10, 12, 14, 21, 28, 35 de idade e coletas de sangue foram realizadas através da punção da veia braquial (veia da asa) ou jugular utilizando seringa de 1mL e agulha 0,45 x 13mm estéreis. As amostras de sangue foram centrifugadas a 8000xg por 5 minutos, e o soro obtido foi mantido a – 20°C até análise para determinação de Imunoglobulina G (IgG).

2.6. Coleta de fluído intestinal

Após a coleta de sangue, seis aves de cada tratamento, nos dois experimentos, foram eutanasiadas por deslocamento cervical (conforme aprovação do comitê de ética em experimentação animal da FMVZ/UNESP – protocolo nº 191/2011-CEUA). Os intestinos foram coletados e, com o auxílio de uma seringa descartável estéril, 2mL de solução de lavagem (PBS pH 7,0, 0,01% de timerosal, 1% de BSA, 1mM de fenilmetil sulfonil fluoredo, 5mM de EDTA) foram injetados na porção proximal do duodeno, de modo que todo o comprimento intestinal fosse lavado. O fluído coletado foi centrifugado a 1200xg durante 7 minutos, permitindo a separação do sobrenadante, o qual foi armazenado a -20°C para posterior quantificação de Imunoglobulina A (IgA secretória).

2.7. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Para a dosagem dos anticorpos em fluído intestinal e soro utilizou-se a técnica de Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) com os kits Chicken IgA ELISA quantification e Chicken IgG ELISA quantification, respectivamente (Bethyl

Laboratories, Montgomery, TX, USA). Seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante e utilizado por Rocha et al. (2012).

Microplacas de poliestireno, com 96 cavidades de fundo chato (NUNC Maxisorp, Canada) serviram como base sólida para a fixação do antígeno. A sensibilização das placas foi feita com uma solução de anticorpo de captura diluído, na proporção de 1:100, em solução tampão carbonato bicarbonato 0,005M (pH 9,6). Com uma hora de incubação a 25°C, os poços foram lavados três vezes com solução de lavagem (50mM TRIS, 0,14M NaCl, 0,05% tween 20, pH 8,0), bloqueados com tampão bloqueador (50mM TRIS, 0,14M NaCl, 1% BSA, pH 8,0), incubados por 30 minutos a 25°C e lavados por mais três vezes. Adicionou-se 100µL/poço das amostras testadas de soro e fluído intestinal, na diluição 1:6400 e 1:3200, respectivamente, e as placas foram incubadas por 60 minutos a 25°C. Em seguida, foram lavadas cinco vezes e adicionado 100µL de conjugado 1:50.000 em cada orifício da placa, incubadas a 25°C por 60 min e lavadas cinco vezes novamente. Em cada orifício, 100µL da solução substrato TMB (KLP, Gaithersburg, EUA) foi aplicado e as placas foram incubadas a 25°C por 15 min. Na sequência a reação foi bloqueada com 100µL /poço de H₂SO₄ (2M).

Os resultados obtidos foram lidos por um espectrofotômetro de microplacas Thermo Plate TP Reader, com filtro de 450nm.

2.8. Quantificação de *Salmonella* Enteritidis em conteúdo cecal

A quantificação de *Salmonella* Enteritidis foi realizada somente no experimento 2, no qual as aves sofreram desafio. Para as determinações bacterianas do conteúdo cecal, seguiu-se o protocolo utilizado por Okamoto et al. (2007). Os cecos de cada ave foram coletados e acondicionados individualmente em sacos plásticos coletores estéreis. Em seguida foram macerados e diluídos em solução tampão de salina fosfatada (PBS) com pH 7,2 seguindo a proporção de 1:10. Posteriormente foram realizadas diluições decimais seriadas, as quais foram plaqueadas em duplicata, em ágar verde brilhante (AVB) contendo ácido nalidíxico (100g/mL de meio) e rifampicina (100g/mL de meio). Após o plaqueamento as amostras foram incubadas por 18-24 horas à temperatura de 40°C e a leitura das placas foi realizada.

2.9. Análise estatística.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se esquema fatorial de grupos independentes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, seguido de teste de Tukey a 5% de significância.

3. Resultados e Discussão

No experimento 1, as concentrações de IgA intestinal ($\mu\text{g/mL}$) e IgG sérica ($\mu\text{g/mL}$) estão expressas nas Figuras 1 e 2. Os tratamentos apresentaram concentrações similares, sem diferenças estatísticas ($p>0,05$) tanto nas concentrações de IgA como nas de IgG.

Os níveis de IgA iniciais foram de aproximadamente $5,70\mu\text{g/mL}$ e apresentaram aumento significativo ($p<0,05$) até 28 dias de idade em todos os tratamentos, demonstrando que as concentrações de IgA se elevam naturalmente ao longo dos dias.

Estes resultados corroboram com Mast e Goddeeris (1999), Bar-Shira et al. (2003) e Bar-Shira e Friedman (2006) que relataram que o número de células secretoras de IgA e o nível deste anticorpo no intestino aumentam lentamente com o tempo, demonstrando que o sistema imune das mucosas não está completamente desenvolvido em aves recém nascidas e que este requer um período para amadurecimento.

As concentrações de IgA intestinal ($\mu\text{g/mL}$) e IgG sérica ($\mu\text{g/mL}$) do experimento 2 estão apresentadas na Tabela 1 e 2.

Os níveis iniciais de IgA no fluído intestinal apresentaram valores de aproximadamente $11,45\mu\text{g/mL}$ e conforme as aves foram tratadas e desafiadas houve uma variação nas concentrações que chegaram a $10,77\mu\text{g/mL}$ aos 14 dias de idade (144 horas após o desafio com *S. Enteritidis*).

A partir dos 21 dias os valores de IgA de todos os tratamentos voltaram a aumentar significativamente, corroborando com Marcq et al. (2011) que demonstraram um aumento nos títulos de IgA secretória em aves após o desafio por *Salmonella Typhimurium*.

Aos 28 dias, o tratamento T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*) determinou a maior concentração de IgA intestinal ($17,78\mu\text{g/mL}$) e diferiu estatisticamente de T1 (5HTP) que apresentou a menor concentração ($14,69\mu\text{g/mL}$). O mesmo foi observado

aos 35 dias, porém com 35 dias T4 além de diferir de T1, também diferiu do controle negativo (T7).

Ao avaliar as médias dos tratamentos, observa-se que T4 e T5 (*pool* de *Lactobacillus*) obtiveram as maiores concentrações de IgA, 13,08µg/mL e 13,25µg/mL, respectivamente, apresentando diferenças significantes em relação ao T1 (12,07µg/mL).

Neste caso podemos inferir que o inibidor da serotonina (NSD1015) associado à *Lactobacillus* spp. promoveu maior estímulo no sistema imune quando comparado com o precursor (5HTP). Já que os valores de IgA do tratamento de 5HTP associado à *Lactobacillus* spp. (T3) foram bem próximos do controle negativo (T7).

Estudos avaliam a presença de células enterocromafins imunomarcadas para serotonina e receptores serotoninérgicos em células imunes como linfócitos, monócitos, macrófagos e células dendríticas (Cloeze-Tayarani e Changeux, 2007). E grande quantidade de células enterocromafins contendo serotonina no trato gastrointestinal (Kitazawa et al., 2006). Porém pouco se sabe sobre sua ação na resposta imune humoral e produção de IgA secretória.

Em condições patológicas agudas estudos sugerem um papel generalizado da serotonina na tentativa de eliminar enterotoxinas produzidas por bactérias como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (Hansen e Witte, 2008). Mas a forma como a mesma e seu precursor atuam ainda permanece desconhecida.

Com relação às concentrações de IgG sérica nos experimento 1 (Figura 2) e experimento 2 (Tabela 2). Observa-se que os tratamentos não apresentaram diferenças significantes ($p>0,05$).

Nos dois experimentos os níveis médios de IgG no soro sanguíneo variaram entre aumento e queda ao longo dos dias de idade, atingindo sua maior concentração aos 35 dias.

Haghighi et al. (2005) descreveram aumento de IgG sérico em aves que receberam ração suplementada com diferentes amostras de *Lactobacillus*. Os tratamentos com *Lactobacillus* spp. (T3, T4, T5) mesmo apresentando concentrações maiores de IgG não diferiram significativamente do controle negativo em ambos os experimentos.

Os tratamentos, dos dois experimentos, sem *Lactobacillus* spp. (T1 e T2) obtiveram concentrações de IgG sérica semelhante ao controle negativo, não apresentando diferença significativa.

Pouco se sabe sobre a atuação do precursor (5-hidroxitriptofano) e do inibidor (NSD1015) da serotonina sobre a resposta imune humoral de frangos de corte, mas pelos resultados obtidos neste estudo, sugere-se que esta atuação talvez envolva outros componentes do sistema imunológico, além de IgA e IgG.

Ao quantificar *S. Enteritidis* no conteúdo cecal, conforme demonstrado na Tabela 3 e Figura 3, observa-se uma redução de *Salmonella* Enteritidis após o desafio. O tratamento T3 (5HTP + pool de *Lactobacillus*) apresentou a maior capacidade de redução de *S. Enteritidis*, com diferença significativa ($p < 0,05$) de T6 (controle positivo) e T2 (NSD1015).

Sugerindo a redução da quantificação de *S. Enteritidis* no conteúdo cecal tanto pelo uso do precursor da serotonina (5HTP), quanto pelo uso de *Lactobacillus* spp.

O tratamento T2 (NSD1015) apresentou médias de recuperação iguais ao T6, sendo pouco efetivo na redução do agente patogênico.

Estes resultados corroboram com Hansen e Witte, 2008, que sugeriram um papel generalizado da serotonina na tentativa de eliminar enterotoxinas produzidas por bactérias como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em condições patológicas agudas. Porém há uma necessidade de maiores estudos para avaliar como esta atuação ocorre, já que houve pouco estímulo de resposta imune humoral.

Portanto podemos concluir que houve pouca influência dos tratamentos com o precursor (5-hidroxitriptofano) e inibidor (NSD1015) da serotonina na indução de resposta imune humoral mediada por IgA e IgG, inferindo que a disponibilidade ou inibição da síntese de serotonina possa influenciar o sistema imune de outra maneira, com imunoglobulinas não avaliadas neste estudo ou por resposta imune celular.

Apesar dos tratamentos com 5-hidroxitriptofano (T1 e T3) não apresentarem altos níveis de IgA em fluido intestinal e IgG sérico, observou-se uma redução de *Salmonella* Enteritidis, principalmente no T3, o que demonstra a interação de 5-hidroxitriptofano e *Lactobacillus* spp. com o sistema imunológico das aves por meio de mecanismos que precisam ser mais elucidados em estudos posteriores.

5. Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - processo 472571/2011-7) pelo financiamento do projeto e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo 2011/15338-1) pela concessão da bolsa de estudo.

6. Referencias Bibliográficas

Andreatti Filho, R. L., E. N. Silva and P. R. Cupi. 1997. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbia no controle da infecção experimental de frangos pó *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. Arq. Bras. Med. Zootec. 49:661-672.

Andreatti Filho, R. L. 2007. Salmonelose Aviária. Pages 84-87 in Saúde aviária e doenças. R. L. Andreatti Filho. São Paulo: ROCCA.

Bar-Shira, E., D. Sklan, and A. Friedman. 2003. Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. Dev. Comp. Immunol. 27:147–157.

Bar-Shira, E., and A. Friedman. 2006. Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chicks. Dev. Comp. Immunol. 30:930–941.

Berndt, A., A. Wilhelm, C. Jugert, J. Pieper, K. Sachse, and U. Methner. 2007. Chicken Cecum Immune Response to *Salmonella enterica* Serovars of Different Levels of Invasiveness. Infect Immun. 75: 5993–6007.

Brisbin, J. T., J. Gong, P. Parvizi and S. Sharif. 2010. Effects of *Lactobacilli* on Cytokine Expression by Chicken Spleen and Cecal Tonsil Cells. Clin Vaccine Immuno. 17:1337–1343.

Cedraz-Mercez, P. L., A. C. Almeida, C. M. Thomaz, R. H. Costa e Sousa, E. L. Olivares, W. S. Cortes, M. A. Medeiros and L. C. Reis. 2007. Effect of L-5 Hydroxytryptophan on drinking behavior in *Coturnix japonica* (Temminck and Schlegel, 1849) (Galliformes:Aves): Involvement of rennin-angiotensin system. Braz. J. Biol. 67(4):771-776.

Cloez-Tayarani, I. and J. P. Changeux. 2007. Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective. J. Leukoc. Biol. 81:599-606.

Debonnet, L., L. Garret, G. Clarke, J. Bienenstock and T. G. Dinan. 2009. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potencial antidepressant properties in the rat. J. Psychiatr Res. 43:164-174.

- Garabal, M. F., M. J. Nunez, J. Balboa, P. L. Delgado, R. Gallego, T. G. Caballero, M. D. F. Roel, J. Brenlla and M. R. Mendez. 2003. Serotonin upregulates the activity of phagocytosis through 5-HT_{1A} receptors. *Br J Pharmacol.* 139:457-463.
- Haghighi, H. R., J. Gong, C. L. Gyles, M. A. Hayes, B. Sanei, P. Parvizi, H. Gisavi, J. R. Chambers and S. Sharif. 2005. Modulation of Antibody-Mediated Immune Response by Probiotics in Chickens. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12:1387-1392.
- Haghighi, H. R., J. Gong, C. L. Gyles, M. A. Hayes, H. Zhou, B. Sanei, J. R. Chambers and S. Sharif. 2006. Probiotics Stimulate Production of Natural Antibodies in Chickens. *Clin Vaccine Immunol.* 13:975–980.
- Hansen, M. B. and A. B. Witte. 2008. Review: the role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion. *Acta Physiol.* 193:311-323.
- Hasler, W. L. 2009. Serotonin and the GI tract. *Curr Gastroenterol Rep.* 11:383-391.
- Jackson, G. J., C. F. Langford and D. L. Archier. 1991. Control of salmonellosis and similar foodborne infections. *Food Cont.* 2:26-34.
- Khan, W. I. and J. E. Ghia. 2010. Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. *Clin Exp Immunol.* 161:19-27.
- Kitazawa, T.; Ukai, H.; Komori, S. and Taneike, T. 2006. Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine induced contraction in the chicken gastrointestinal tract. *Autonomic & Autacoid Pharmacology.* 26:157-168.
- Liu, F., J. Yang, Y. Zhang, D. Zhou, Y. Chen, W. Gai, W. Shi, Q. Li, P. Tien and H. Yan. 2010. Recombinant flagellins with partial deletions of the hypervariable domain lose antigenicity but not mucosal adjuvancy. *Biochem Biophys Res Commun.* 392:582–587.
- Manocha, M. and W. I. Khan. 2012. Serotonin and GI Disorders: An Update on Clinical and Experimental Studies. *Clin Transl Gastroenterol.* 3:01-06.
- Marcq, C., E. Cox, I. M. Szalo, A. Théwis, and Y. Beckers. 2011. *Salmonella* Typhimurium oral challenge model in mature broilers: Bacteriological, immunological, and growth performance aspects. *Poult Sci.* 90:59–67.
- Mast, J., and B. M. Goddeeris. 1999. Development of immunocompetence of broiler chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 70:245–256.
- Mestecky, J., M. W. Russel, and C. O. Elson. 1999. Intestinal IgA: Novel views on its function in the defense of the largest mucosal surface. *Gut.* 44:2–5.
- Muir, W. I., W. L. Bryden and A. J. Husband. 2000. Immunity, vaccination and the avian intestinal tract. *Dev Comp Immunol.* 24:325-342.

Ogra, P. L., H. Faden and R. C. Welliver. 2001. Vaccination Strategies for Mucosal Immune Responses. Clin Microbiol Rev. 14:430–445.

Okamoto, A. S., R. L. Andreatti Filho, E. T. Lima, R. E. P. Pereira, A. Menconi, T. S. Rocha and G. A. Marietto-Gonçalves. 2007. Immunological evaluation of the intestinal mucosa of broiler chicks treated with *Lactobacillus* spp. and challenged with *Salmonella* Enteritidis. Rev. Bras. Cienc. Avic. 9:(4):259-262.

Revolledo, L., A. J. P. Ferreira and G. C. Mead. 2006. Prospects in *Salmonella* control: competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. J. Appl. Poult. Res. 15:341-351.

Revolledo, L., C. S. A. Ferreira, and A. J. P. Ferreira. 2009. Prevention of *Salmonella* Typhimurium colonization and organ invasion by combination treatment in broiler chicks. Poul. Sci. 88:734–743.

Rocha, T. S., A. A. S. Baptista, T. C. Donato, E. L. Milbradt, A. S. Okamoto, J. C. Z. Rodrigues, M. P. Coppola and R. L. Andreatti Filho. 2012. Evaluation of in vitro and in vivo adhesion and immunomodulatory effect of *Lactobacillus* species strains isolated from chickens. Poult. Scien. 91:362–369.

Shinohara, N. K. S., V. B. B. Barros, S. M. C. Jimenez, E. C. L. Machado, R. A. F. Dutra and J. L. Filho. 2008. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. Cien Saude Colet. 13(5):1675-1683.

Uribe, A., M. Alam, O. Johansson, T. Midtvedt and E. Theodorsson. 1994. Microflora Modulates Endocrine Cells in the Gastrointestinal Mucosa of the Rat. Gastroenterol. 107:1259-1269.

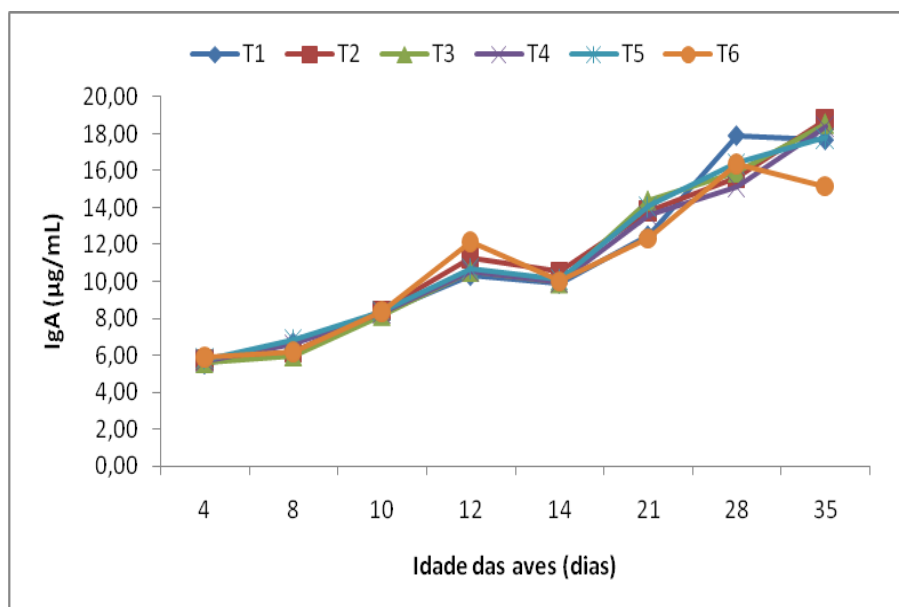


Figura 1. Concentração de IgA ($\mu\text{g/mL}$) em fluído intestinal de frangos de corte, do experimento 1, nos tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano); T2 (NSD1015); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*); T6 (controle negativo).

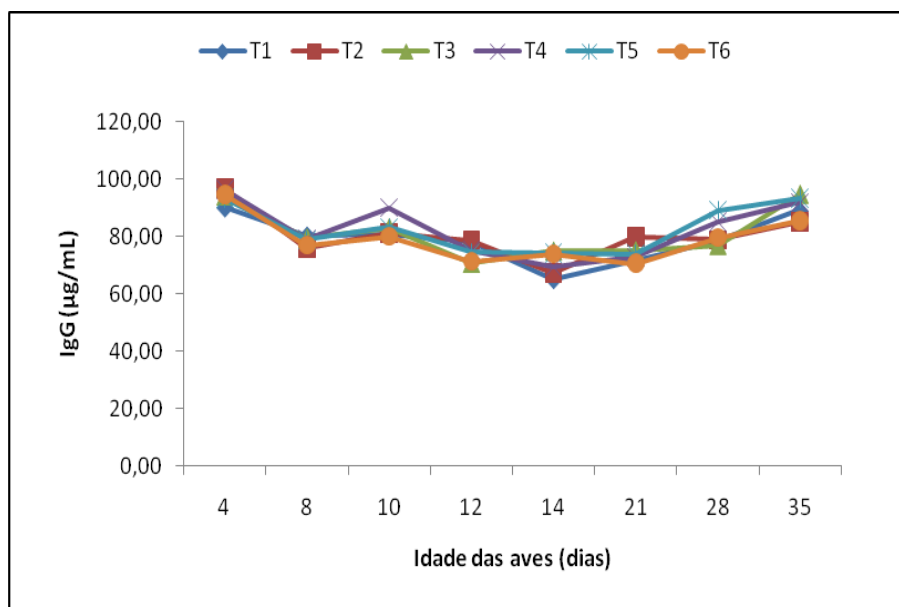


Figura 2. Concentração de IgG ($\mu\text{g/mL}$) sérico de frangos de corte, do experimento 1, nos tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano); T2 (NSD1015); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*); T6 (controle negativo).

Tabela 1. Concentração de IgA ($\mu\text{g/mL}$) em fluído intestinal de frangos de corte, do experimento 2, tratados com 5-hidroxitriptofano, m-hidroxibenzilhidrazine, *Lactobacillus* spp. e desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

Tratamentos*	Idade (Dias)**								Médias
	4	8	10	12	14	21	28	35	
T1	11,37 ^{A, a ***}	10,36 ^{A, a}	11,51 ^{A, a}	10,71 ^{A, a}	10,68 ^{A, a}	12,33 ^{AB, a}	14,69 ^{B, a}	14,90 ^{B, a}	12,07 ^a
T2	11,39 ^{A, a}	10,18 ^{A, a}	10,86 ^{A, a}	10,27 ^{A, a}	10,93 ^{A, a}	12,23 ^{A, a}	15,37 ^{B, ab}	16,89 ^{B, abc}	12,27 ^{ab}
T3	11,37 ^{AB, a}	10,31 ^{A, a}	10,87 ^{A, a}	10,59 ^{A, a}	10,63 ^{A, a}	13,84 ^{BC, a}	16,80 ^{CD, ab}	16,31 ^{D, abc}	12,59 ^{ab}
T4	11,49 ^{AB, a}	10,26 ^{A, a}	11,02 ^{A, a}	10,44 ^{A, a}	10,75 ^{A, a}	14,25 ^{B, a}	17,78 ^{C, b}	18,67 ^{C, c}	13,08 ^b
T5	11,48 ^{A, a}	10,35 ^{A, a}	11,62 ^{A, a}	12,43 ^{AB, a}	10,61 ^{A, a}	14,80 ^{BC, a}	17,09 ^{C, ab}	17,65 ^{C, abc}	13,25 ^b
T6	11,55 ^{A, a}	10,36 ^{A, a}	11,06 ^{A, a}	11,91 ^{A, a}	11,15 ^{A, a}	12,30 ^{A, a}	16,16 ^{B, ab}	17,79 ^{B, bc}	12,79 ^{ab}
T7	11,51 ^{A, a}	10,25 ^{A, a}	11,67 ^{A, a}	11,52 ^{A, a}	10,62 ^{A, a}	12,32 ^{A, a}	16,95 ^{B, ab}	15,69 ^{B, ab}	12,57 ^{ab}
Médias	11,45 ^B	10,30 ^A	11,23 ^{AB}	11,12 ^{AB}	10,77 ^{AB}	13,15 ^C	16,40 ^D	16,84 ^D	

* Tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano + *S. Enteritidis*); T2 (NSD1015+ *S. Enteritidis*); T3 (5-hidroxitriptofano + pool de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T4 (NSD1015 + pool de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T5 (pool de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T6 (*S. Enteritidis*); T7 (controle negativo).

** Média aritmética de seis repetições por tratamento.

*** Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2. Concentração de IgG ($\mu\text{g/mL}$) sérica de frangos de corte, do experimento 2, tratados com 5-hidroxitriptofano, m-hidroxibenzilhidrazine, *Lactobacillus* spp. e desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

Tratamentos*	Idade (Dias)**								Médias
	4	8	10	12	14	21	28	35	
T1	66,30 ^{A, a ***}	90,79 ^{AB, a}	82,54 ^{AB, a}	90,97 ^{BC, b}	82,51 ^{AB, a}	73,09 ^{AB, a}	86,73 ^{ABC, a}	107,98 ^{C, a}	85,11 ^a
T2	71,42 ^{A, a}	93,13 ^{AB, a}	84,47 ^{AB, a}	92,54 ^{AB, b}	80,03 ^{A, a}	72,02 ^{A, a}	91,33 ^{AB, a}	105,98 ^{B, a}	86,37 ^a
T3	78,02 ^{A, a}	94,10 ^{AB, a}	85,59 ^{A, a}	75,32 ^{A, a}	80,46 ^{A, a}	85,27 ^{A, a}	81,80 ^{A, a}	112,19 ^{B, a}	86,59 ^a
T4	63,84 ^{A, a}	92,52 ^{BC, a}	83,70 ^{AB, a}	91,50 ^{BC, b}	78,96 ^{AB, a}	83,51 ^{AB, a}	90,32 ^{BC, a}	113,57 ^{C, a}	87,24 ^a
T5	73,80 ^{AB, a}	93,71 ^{AB, a}	73,32 ^{AB, a}	101,40 ^{BC, b}	72,24 ^{A, a}	89,14 ^{AB, a}	93,08 ^{AB, a}	118,56 ^{C, a}	89,41 ^a
T6	64,61 ^{A, a}	88,93 ^{BC, a}	77,31 ^{AB, a}	97,76 ^{CD, b}	78,53 ^{ABC, a}	80,64 ^{ABC, a}	93,19 ^{BC, a}	101,40 ^{D, a}	85,30 ^a
T7	75,14 ^{A, a}	93,17 ^{AB, a}	86,41 ^{A, a}	89,26 ^{A, b}	75,83 ^{A, a}	84,82 ^{A, a}	90,02 ^{A, a}	101,25 ^{B, a}	86,55 ^a
Médias	70,45 ^A	92,34 ^D	81,90 ^{BC}	91,25 ^D	78,37 ^{AB}	81,21 ^{BC}	89,50 ^{CD}	108,70 ^E	

* Tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano + *S. Enteritidis*); T2 (NSD1015+ *S. Enteritidis*); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T6 (*S. Enteritidis*); T7 (controle negativo).

** Média aritmética de seis repetições por tratamento.

*** Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 3. Quantificação de *Salmonella* Enteritidis (Log₁₀UFC/mL) no conteúdo cecal de frangos de corte tratados com 5-hidroxitriptofano, m-hidroxibenzilhidrazine, *Lactobacillus* spp. e desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

Tratamentos*	Contagem bacteriana log ₁₀ (UFC/mL)						Médias
	Idade (Dias)**						
	10	12	14	21	28	35	
T1	4,7 ^{B, b***}	4,8 ^{B, b}	4,1 ^{B, b}	1,7 ^{A, ab}	1,6 ^{A, ab}	0,6 ^{A, ab}	2,9 ^{bc}
T2	4,9 ^{D, b}	4,4 ^{CD, b}	4,4 ^{CD, b}	2,7 ^{BC, b}	2,3 ^{B, b}	1,2 ^{A, ab}	3,3 ^c
T3	5,1 ^{B, b}	4,4 ^{B, b}	3,9 ^{B, b}	1,4 ^{A, ab}	0,8 ^{A, ab}	0,5 ^{A, ab}	2,7 ^b
T4	5,5 ^{B, b}	4,5 ^{B, b}	4,0 ^{B, b}	2,2 ^{A, b}	1,4 ^{A, ab}	1,2 ^{A, ab}	3,1 ^{bc}
T5	5,2 ^{B, b}	4,0 ^{B, b}	4,2 ^{B, b}	1,2 ^{A, ab}	1,6 ^{A, ab}	0,8 ^{A, ab}	2,8 ^{bc}
T6	5,1 ^{B, b}	5,0 ^{B, b}	4,6 ^{B, b}	2,3 ^{A, b}	1,7 ^{A, ab}	1,9 ^{A, b}	3,4 ^c
T7	0,0 ^{A, a}	0,0 ^{A, a}	0,0 ^{A, a}	0,0 ^{A, a}	0,0 ^{A, a}	0,0 ^{A, a}	0,0 ^a
Médias	4,4 ^D	3,9 ^{CD}	3,6 ^C	1,6 ^B	1,3 ^{AB}	0,7 ^A	

* Tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano + *S. Enteritidis*); T2 (NSD1015+ *S. Enteritidis*); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T6 (*S. Enteritidis*); T7 (controle negativo).

** Média aritmética de seis repetições por tratamento.

*** Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (p<0,05).

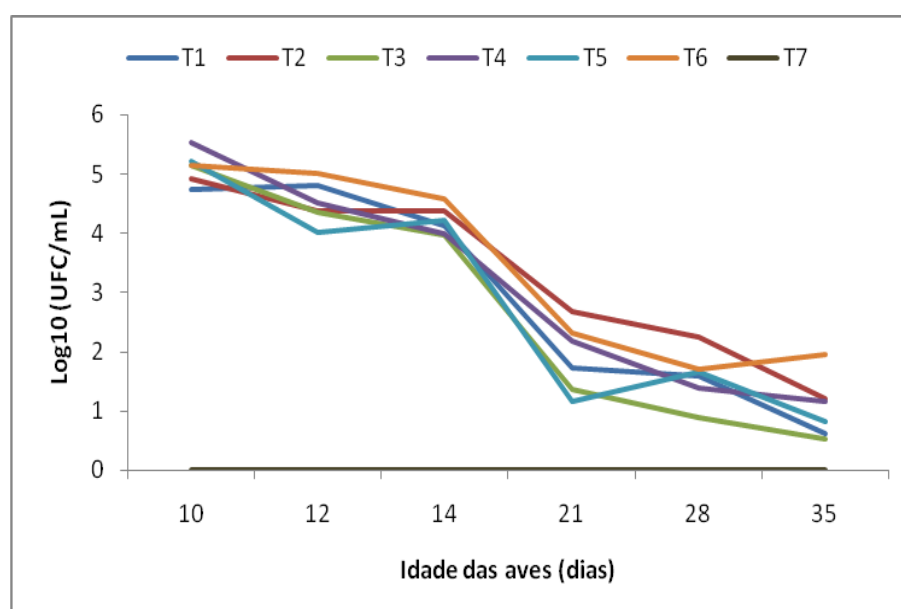


Figura 3. Quantificação de *Salmonella* Enteritidis (Log₁₀UFC/mL) no conteúdo cecal de frangos de corte nos tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano + *S. Enteritidis*); T2 (NSD1015+ *S. Enteritidis*); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T6 (*S. Enteritidis*); T7 (controle negativo).

**CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE 5-HIDROXITRIPTOFANO E
M-HIDROXIBENZILHIDRAZINE ASSOCIADOS À *Lactobacillus* spp. NA
MORFOMETRIA INTESTINAL E IMUNOMARCAÇÃO DE SEROTONINA
EM FRANGOS DE CORTE (*Gallus gallus domesticus* – LINNAEUS 1758)
DESAFIADOS COM *Salmonella* ENTERITIDIS.**

Taís Cremasco Donato, Ana Angelita Sampaio Baptista, Bruna Domeneghetti
Smaniotto, Adriano Sakai Okamoto, Julio Lopes Sequeira, Raphael Lucio Andreatti
Filho.

Manuscrito a ser enviado para a revista *Brazilian Journal of Poultry Science*.

Resumo

Um dos componentes da mucosa intestinal são as células enterocromafins, que liberam serotonina para o lúmen, promovendo atividades secretórias e crescimento celular de vários tecidos, incluindo vilosidades intestinais. Este estudo avaliou as influências do 5-hidroxitriptofano (5HTP) e do m-hidroxibenzilhidrazine (NSD1015) associados à *Lactobacillus* spp. sobre o peso corporal das aves e o desenvolvimento das vilosidades intestinais na porção proximal do duodeno de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis, e verificou se a presença de *Lactobacillus* spp. e *S. Enteritidis* influenciaram a imunomarcagem de serotonina no duodeno. Para isso, o estudo foi dividido em dois experimentos, com e sem desafio por *S. Enteritidis*. O peso corporal, densidade, altura das vilosidades duodenais e imunomarcagem positiva para serotonina foi avaliada. No experimento 1, aves sem desafio, os pesos corporais não diferiram significativamente ($p>0,05$) e, no experimento 2, aves com desafio, os tratamentos com o precursor isolado e associado à *Lactobacillus* spp. determinaram maior peso corporal das aves. Nos dois experimentos, as aves tratadas com 5HTP apresentaram aumento na densidade e altura das vilosidades no duodeno, sugerindo a atuação de 5HTP como um agente trófico. A administração de *Lactobacillus* spp. também determinou alturas maiores de vilosidades duodenais. Quanto a imunomarcagem de serotonina, as aves tratadas com *Lactobacillus* spp., no experimento 1, e as aves tratadas com *Lactobacillus* spp. e *S. Enteritidis*, no experimento 2, apresentaram valores superiores aos demais tratamentos, sugerindo que a presença destas bactérias promovem maior liberação de serotonina para o duodeno, porém o mecanismo exato de como este processo ocorre precisa ser mais elucidado.

Palavras-chave: serotonina, *Salmonella* Enteritidis, *Lactobacillus* spp., morfometria intestinal, frangos de corte.

Abstract

One component of the intestinal mucosa is the enterochromaffin cells that release serotonin into the lumen, promoting cell growth and secretory activity of various tissues, including intestinal villi. This study aimed to evaluate the effects of 5-hydroxytryptophan (5HTP) and m-hidroxibenzilhidrazine (NSD1015) associated with *Lactobacillus* spp. on the mean body weight of the birds and the development of the intestinal villi in the proximal duodenum of broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis. And whether the presence of *Lactobacillus* spp. and *S. Enteritidis* influenced the positive immunostaining for serotonin in the duodenum. For this, the study was divided into two experiments, with and without challenge by *S. Enteritidis*. Body weight, density, and duodenal villus height positive immunostaining for serotonin was evaluated. In experiment 1, birds without challenge, body weights did not differ significantly ($p>0,05$), and in experiment 2, birds with challenge, treatment with the precursor isolated and associated with *Lactobacillus* spp. determined higher body weight of the birds. In both experiments, the birds treated with 5HTP showed an increase in the density and height of villi in the duodenum, suggesting the presence of 5HTP as a trophic agent. The administration of *Lactobacillus* spp. also determined greater heights of duodenal villi. As for immunostaining serotonin, birds treated with *Lactobacillus* spp., in experiment 1, and the birds treated with *Lactobacillus* spp. and *S. Enteritidis* in experiment 2 showed higher values than the other treatments, suggesting that the presence of these bacteria promote greater release of serotonin into the duodenum, but the exact mechanism of how this process occurs needs to be further elucidated.

Keywords: serotonin, *Salmonella* Enteritidis, *Lactobacillus* spp., intestinal morphometric, broilers.

1.Introdução

Aves recém nascidas possuem um sistema digestivo anatomicamente completo, mas funcionalmente incompleto o que leva o trato gastrointestinal a sofrer alterações morfológicas e fisiológicas buscando uma maior eficiência na digestão e absorção de nutrientes (Murarolli, 2008).

As taxas de digestão e absorção intestinal estão diretamente relacionadas com a proliferação e diferenciação celular. À medida que as células indiferenciadas presentes na cripta sofrem mitoses, as células resultantes são deslocadas para a região basal dos vilos, originando as células caliciformes, enterócitos, e células enteroendócrinas, estas são deslocadas para a região apical, onde se desprendem e caem no interior da luz intestinal, promovendo uma contínua migração de células (Cunningham, 2004).

O equilíbrio entre estes dois processos (perda e proliferação celular) assegura a manutenção do número de células e a capacidade funcional do epitélio. Se ocorrer um aumento na taxa de proliferação com ausência, diminuição ou manutenção da perda haverá um aumento no número de células, e, conseqüentemente, um aumento na altura e densidade dos vilos, resultando em uma maior taxa de digestão e absorção (Maiorka, 2001; Furlan et al., 2004).

O epitélio intestinal atua como uma barreira natural que protege o organismo de bactérias patogênicas e substâncias tóxicas presentes na luz intestinal. Distúrbios na microbiota intestinal causados por patógenos, como por exemplo, *Salmonella* spp., podem modificar a permeabilidade intestinal e facilitar a invasão destes micro-organismos, alterando o metabolismo, capacidade de digestão e absorção de nutrientes (Deitch et al., 1995; Alverdy et al., 1996; Pelicano et al., 2003).

As bactérias probióticas, como *Lactobacillus* spp., aumentam a barreira natural do epitélio intestinal contra bactérias patogênicas ou substâncias tóxicas a que o hospedeiro possa ser exposto, promovem a redução de reações inflamatórias e regulam a motilidade intestinal, favorecendo a absorção de nutrientes (Schultz et al., 2004; Ferreira et al., 1998).

A serotonina, uma monoamina biogênica derivada do triptofano, é outro componente importante da mucosa intestinal (Manocha & Khan, 2012). Sua liberação para o lúmen ou lâmina própria faz com que atue sobre células entéricas do sistema nervoso e inicie atividades secretórias e crescimento celular de vários tecidos, incluindo

vilosidades e criptas intestinais (Khan & Ghia, 2010; Fukumoto et al., 2003; Hasler, 2009).

Segundo Nakamura et al. (2008) o precursor da serotonina, 5-hidroxitriptofano (5HTP) induz o desenvolvimento das vilosidades intestinais e aumenta a densidade das mesmas em intestino de camundongos.

A liberação, síntese e degradação de serotonina são influenciadas pela interação entre a microbiota, dieta e células intestinais (Wang et al., 2007). Em casos de doenças inflamatórias intestinais relata-se um aumento do número de células enterocromafins imunomarcadas para serotonina (O'Hara et al., 2006; Linden et al., 2003).

Diante disso, este estudo avaliou os efeitos do 5-hidroxitriptofano (5HTP) e do m-hidroxibenzilhidrazina (NSD1015) associados à *Lactobacillus* spp. sobre o peso corporal das aves e o desenvolvimento das vilosidades intestinais na porção proximal do duodeno de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis. Observou a influência de *Lactobacillus* spp. e *S. Enteritidis* na imunomarcagem de serotonina no duodeno.

2. Material e métodos

2.1. Cultivo e administração do inóculo de *Lactobacillus* spp.

As cepas de *Lactobacillus* spp. utilizadas neste estudo (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brueckii* e *Lactobacillus* spp.) foram isoladas de aves e selecionadas de acordo com a capacidade de adesão e efeito imunomodulatório descrito por Rocha et al. (2012).

O cultivo das cepas foi realizado separadamente em 15mL de meio líquido Man Rogosa Sharp (MRS), em condições de anaerobiose a 37°C por 48 horas. Um *pool* das espécies cultivadas foi formado com 1mL de cada cultivo, seguindo a proporção de 1:1. Após a formação do *pool*, foi realizada a quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) através de diluições decimais seriadas em solução tampão de salina fosfatada (PBS) com pH 7,2 e posterior plaqueamento em ágar MRS.

As aves receberam inóculos de 500µl do *pool* de *Lactobacillus* com $1,0 \times 10^9$ UFC/mL administrados via oral, diretamente no esôfago/inglúvio de cada ave, com o auxílio de agulha de gavagem estéril.

2.2. Cultivo e administração do inóculo de *Salmonella* Enteritidis.

O desafio foi feito com cultura de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis fagotipo 4, mutante resistente ao ácido nalidíxico (Nal) e rifampicina (Rif), desenvolvida por meio de cultivos sucessivos em ágar verde brilhante (AVB) contendo ácido nalidíxico (100g/mL de meio) e rifampicina (100g/mL de meio), conforme Andreatti Filho et al (1997).

A amostra de *S. Enteritidis* resistente ao ácido nalidixico e rifampicina foi cultivada em 20mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI) incubada a 40°C por 18-24 horas. A quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) do inóculo foi realizada através de diluições decimais seriadas em solução tampão de salina fosfatada (PBS) com pH 7,2 e posterior plaqueamento, em duplicata, em ágar verde brilhante (AVB) contendo ácido nalidíxico (100g/mL de meio) e rifampicina (100g/mL de meio).

As aves receberam inóculos de 1mL com $2,0 \times 10^6$ UFC/mL de *S. Enteritidis* administrados via oral, diretamente no esôfago/inglúvio de cada ave, com o auxílio de agulha de gavagem estéril.

2.3. 5-hidroxitriptofano (5HTP) e m-hidroxibenzilhidrazine (NSD1015).

Estudos prévios (Capítulo 2) foram realizados no Infectório do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Botucatu-SP com o objetivo de determinar as doses de 5-hidroxitriptofano (5HTP) e m-hidroxibenzilhidrazine (NSD1015). Optou-se administrar 5HTP (25mg/kgPV) e NSD1015 (150mg/kgPV).

Os fármacos foram administrados via intraperitoneal na quantidade de 0,1ml/ave com seringa de 1mL e agulha 0,45 x 13mm. As inoculações foram feitas em um ângulo de 45° no quadrante médio da parede pélvica, conforme descrito por Cedraz-Mercez et al. (2007).

2.4. Delineamento experimental.

2.4.1. Experimento 1

Foram alojados 288 machos matrizes de corte (*Gallus gallus domesticus*), de um dia de vida, em gaiolas experimentais no Infectório do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Botucatu-SP. Os animais

receberam água e ração não medicada *ad libitum* e aquecimento necessário conforme idade.

As aves foram distribuídas em um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos de 36 aves cada, oito períodos de avaliação e seis repetições por período:

Tratamento 1 (T1): aves tratadas com 5HTP;

Tratamento 2 (T2): aves tratadas com NSD1015;

Tratamento 3 (T3): aves tratadas com 5HTP e *pool* de *Lactobacillus*;

Tratamento 4 (T4): aves tratadas com NSD1015 e *pool* de *Lactobacillus*;

Tratamento 5 (T5): aves tratadas com *pool* de *Lactobacillus*;

Tratamento 6 (T6): aves tratadas com 0,1mL de NaCl a 0,9%.

5-hidroxitriptofano (5HTP), m-hidroxibenzilhidrazine (NSD1015) e NaCl foram administradas uma vez ao dia, via intraperitoneal, por cinco dias consecutivos (do 4º ao 8º dia de idade), na quantidade de 0,1mL/ave com seringa de 1mL e agulha de 0,45 x 13mm.

O *pool* de *Lactobacillus* com $1,0 \times 10^9$ UFC/mL foi administrado uma vez ao dia, via oral, por cinco dias consecutivos (do 4º ao 8º dia de idade), na quantidade de 500µl/ave com o auxílio de uma agulha de gavagem estéril.

2.4.2. Experimento 02

Foram alojados 366 machos matrizes de corte (*Gallus gallus domesticus*), de um dia de vida, em gaiolas experimentais do Infectório do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Botucatu-SP. Os animais receberam água e ração não medicada *ad libitum* e aquecimento necessário conforme idade.

As aves foram distribuídas em um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por sete tratamentos de 36 aves cada, oito períodos de avaliação e seis repetições por período:

Tratamento 1 (T1): aves tratadas com 5HTP e desafiadas com *S. Enteritidis*;;

Tratamento 2 (T2): aves tratadas com NSD1015 e desafiadas com *S. Enteritidis*;;

Tratamento 3 (T3): aves tratadas com 5HTP, *pool* de *Lactobacillus* e desafiadas com *S. Enteritidis*;

Tratamento 4 (T4): aves tratadas com NSD1015, *pool* de *Lactobacillus* e desafiadas com *S. Enteritidis*;

Tratamento 5 (T5): aves tratadas com *pool* de *Lactobacillus* e desafiadas com *S. Enteritidis*;

Tratamento 6 (T6): aves desafiadas com *S. Enteritidis*;

Tratamento 7 (T7): aves tratadas com 0,1mL de NaCl a 0,9%.

5-hidroxitriptofano (5HTP), m-hidroxibenzilhidrazine (NSD1015) e NaCl foram administradas uma vez ao dia, via intraperitoneal, por cinco dias consecutivos (do 4º ao 8º dia de idade), na quantidade de 0,1mL/ave com seringa de 1mL e agulha de 0,45 x 13mm.

O *pool* de *Lactobacillus* com $1,0 \times 10^9$ UFC/mL foi administrado uma vez ao dia, via oral, por cinco dias consecutivos (do 4º ao 8º dia de idade), na quantidade de 500µl/ave com o auxílio de uma agulha de gavagem estéril. E, o desafio com *S. Enteritidis* ($2,0 \times 10^6$ UFC/mL) foi realizado no oitavo dia de idade, via oral na quantidade de 1mL/ave com o auxílio de agulha de gavagem estéril.

2.5. Avaliação do peso médio corporal

Para esta avaliação seis aves de cada tratamento foram pesadas com o uso de uma balança digital nos dias quatro, oito, 10, 12, 14, 21, 28 e 35 de idade das aves.

2.6. Coleta de duodeno para avaliação das vilosidades intestinais e ensaios de imunoistoquímica

Quatro aves de cada tratamento foram eutanasiadas por deslocamento cervical (conforme aprovação do comitê de ética em experimentação animal da FMVZ/UNESP – protocolo nº 191/2011-CEUA) e amostras individuais de, aproximadamente, um centímetro de comprimento da porção proximal do duodeno foram coletadas, abertas pela borda mesentérica, estendidas pela túnica serosa, lavadas com solução tampão de salina fosfatada (PBS) com pH 7,2 (para retirar o excesso de fezes), e fixadas em formalina a 10% por 24 horas. Posteriormente, o material foi lavado em água destilada e acondicionado em etanol 70% até a preparação histológica.

2.7. Mensuração da altura e densidade das vilosidades.

Após acondicionamento das amostras em álcool etílico 70%, estas foram desidratadas em série crescentes de álcool etílico, recortadas, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Em cada lâmina histológica foram colocados seis cortes semi-seriados com 5µm de espessura, e os mesmos foram corados segundo a técnica hematoxilina-eosina – HE (Behmer et al. 2003). O estudo morfométrico da altura das vilosidades duodenais (µm) foi realizado utilizando o sistema analisador de imagem Axio Vision Software Rel. Versão 4.6.1 (Zeiss Vision) acoplado ao microscópio óptico modelo Axio Imager A1, Zeiss.

Foram efetuadas trinta medidas da altura das vilosidades para cada segmento de duodeno coletado, totalizando a leitura de 120 vilos por tratamento. As medidas de altura das vilosidades foram tomadas a partir da região basal, que coincide com a porção superior das criptas até o ápice.

Para a mensuração do número de vilos, as amostras foram fotografadas em cinco campos distintos, com objetiva 5X, totalizando 20 fotos por tratamento. Os vilos foram contados de acordo com o campo de captura (Schwarz et al., 2011).

2.8. Imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica baseou-se no protocolo utilizado por Masseno (2012) e estabelecido pelo Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Botucatu-SP.

As lâminas foram confeccionadas com segmentos de duodeno de 3µm de espessura e incubadas a 56°C por 24 horas permitindo uma boa adesão do tecido a lâmina.

Os cortes histológicos foram desparafinizados com xilol e re-hidratados em álcool etílico em concentrações decrescentes e água deionizada. A recuperação antigênica foi realizada com tampão Citrato (10mM, pH 6,0), em panela de pressão (Pascal®/Dako) durante 30 segundos a 125°C. Em seguida, as lâminas foram resfriadas por 15 minutos a temperatura ambiente e lavadas em água deionizada. Decorrido o tempo, as lâminas foram incubadas por 30 minutos em peróxido de hidrogênio 3% (diluído em Metanol) para o bloqueio da peroxidase endógena e então lavadas em água deionizada e incubadas em tampão TRIS pH 7,4 por 10 minutos. Os cortes foram

submetidos ao bloqueio de proteínas inespecíficas com soro albumina bovina a 5% durante 1 hora a 27°C, o excesso de solução foi retirado e incubou-se cada lâmina com o anticorpo primário anti-serotonin antibody (S5545; Sigma-Aldrich, USA) na diluição de 1:1200 durante 18 horas (*overnight*) em câmara úmida à 4°C.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em três banhos com tampão TRIS pH 7,4 por 5 minutos cada. Aplicou-se 100µL do reagente Post Primary Block do sistema de visualização, Novolink™ Max Polymer Detection, RE7150-CE e as lâminas foram incubadas a 27°C por 30 minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com TRIS pH 7,4 três vezes por 5 minutos cada, aplicou-se 100µL do reagente Max Polymer e as mesmas foram incubadas novamente por 30 minutos a 27°C. Em seguida foram lavadas com TRIS pH 7,4 três vezes por 5 minutos cada.

Para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com DAB Chromogen, do sistema de visualização, Novolink™ Max Polymer Detection, RE7150-CE, por 3 minutos. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris e desidratados em concentrações crescentes de álcool e xilol. Em seguida, as lâminas foram montadas com resina e lamínula.

Para a mensuração da imunomarcação de serotonina, as lâminas foram fotografadas em vinte campos distintos, com objetiva 40X, totalizando 80 fotos por tratamento. A visualização foi feita utilizando o sistema analisador de imagem Axio Vision Software Rel. Versão 4.6.1 (Zeiss Vision) acoplado ao microscópio óptico modelo Axio Imager A1, Zeiss.

2.9. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se esquema fatorial de grupos independentes. E os resultados foram submetidos à análise de variância seguida de teste de Tukey a 5% de significância pelo procedimento PROC MIXED (SAS Institute, 2009).

3. Resultados

3.1. Peso médio corporal das aves

O peso médio corporal das aves do experimento 1, em gramas, está expresso na Figura 1. Os tratamentos apresentaram concentrações similares, sem diferenças significativas ($p>0,05$) até os 28 dias de idade.

A média inicial do peso das aves foi de aproximadamente 55,67g e apresentou aumento significativo ($p<0,05$) até 35 dias, com valores de 1906,33g. Aos 35 dias, o tratamento T1 determinou o maior peso corporal (2105,17g) e diferiu significativamente dos demais tratamentos. Os tratamentos T2 e T4 apresentaram peso corporal de 1890,33g e 1939,83g, respectivamente, com diferença significativa em relação ao controle negativo (T6), 1748,17g.

No experimento 2, o peso médio corporal das aves, em gramas, está descrito na Figura 2. Os tratamentos apresentaram concentrações similares, sem diferenças significativas ($p>0,05$) até os 14 dias de idade.

Aos 21 dias, o T1 com maior peso corporal (817,83g) apresentou diferença estatística significativa em relação ao T5, menor peso (682,50g). Aos 28 e 35 dias os tratamentos T1 e T3 diferiram do controle negativo (T7).

3.2. Mensuração da densidade das vilosidades no duodeno.

A densidade das vilosidades no duodeno, no experimento 1, está expressa na Tabela 1.

Aos 14 dias, os tratamentos T1, T2 e T5 determinaram as maiores densidades, com valores de 11,20, 10,50 e 10,45, respectivamente, diferindo significativamente dos demais tratamentos.

Com 21 e 28 dias, os valores médios da densidade dos vilos nos tratamentos T2 e T4 foram estatisticamente iguais controle negativo (T6). O tratamento T1 apresentou a maior densidade com 14, 21 e 28 dias.

Ao avaliar a média geral dos tratamentos, observa-se que os melhores resultados foram determinados pelos tratamentos T1, T3 e T5.

No experimento 2, os valores das densidades estão expressos na Tabela 2.

Aos 14 dias o T1 apresentou o maior número de vilosidades, sendo estatisticamente igual a T3 e diferente dos demais tratamentos. Aos 21 e 28 dias o T1 e

T3 determinaram as maiores densidades e diferiram significativamente dos controles positivo (T6) e negativo (T7).

Ao avaliar as médias gerais dos tratamentos, observa-se que os tratamentos T1 e T3 apresentaram as maiores densidades de vilosidades em duodeno, não diferindo entre si, mas diferindo significativamente dos demais tratamentos.

3.3. Mensuração da altura das vilosidades no duodeno.

A altura das vilosidades (μm), no experimento 1, está expressa na Tabela 3.

Aos 14 dias de idade, T1 e T3 diferiram significativamente do controle negativo (T6). Aos 21 dias, T1 (1608,58 μm) diferiu de T6 (1391,23 μm). E aos 28 dias, T1 apresentou diferença significativa de T6 e T4.

Observa-se nas médias gerais dos tratamentos, que T1 (1526,15 μm) e T3 (1452,68 μm) apresentaram os melhores resultados e diferiram significativamente de T6 (1304,64 μm).

No experimento 2, a altura é descrita na Tabela 4.

Aos 14 dias de vida, o tratamento T4 apresentou a menor altura de vilosidade duodenal (1177,46 μm), diferindo estatisticamente dos tratamentos T1 (1407,04 μm), T3 (1381,21 μm) e T5 (1380,21 μm), que determinaram os maiores valores.

Com 21 e 28 dias, T1 obteve a maior altura, sendo estatisticamente igual a T3 e T5, mas com diferença significativa em relação aos demais tratamentos.

Ao avaliar a média geral, os tratamentos T1, T3 e T5 foram estatisticamente iguais, com valores de altura das vilosidades duodenais mais altos.

3.4. Imunomarcção de serotonina no duodeno.

As células enterocromafins que imunomarcaram serotonina foram observadas no duodeno de frangos de corte conforme Figura 3.

No experimento 1, as células imunomarcadas estão expressas na Figura 4.

Aos 14 e 21 dias o T3 apresentou a maior quantidade de células imunomarcadas, 10,21 e 8,63, respectivamente, diferindo significativamente de todos os tratamentos. E, os tratamentos T4 e T5 determinaram diferenças significantes em relação ao controle negativo (T6).

Com 28 dias de idade, os tratamentos T1, T3, T4 e T5 foram iguais entre si e diferentes do controle negativo (T6).

Ao comparar as médias dos tratamentos, observa-se que todos apresentaram diferenças significantes em relação ao controle negativo (T6), sendo que T3 apresentou o melhor resultado (8,30).

O número de células imunomarcadas para serotonina, no experimento 2, encontra-se na Figura 5.

Aos 14 e 21 dias de vida, os tratamentos T3, T4, T5 e T6 apresentaram maior número de células com imunomarcção positiva para serotonina, sendo estatisticamente iguais ($p>0,05$) e com diferença significativa em relação aos demais tratamentos ($p<0,05$). Com 28 dias os tratamentos T3, T4, T5 e T6 também determinaram contagens de células imunomarcadas maiores, sendo estatisticamente iguais entre si, mas diferentes do controle negativo (T7).

Com relação às médias gerais dos tratamentos, todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo (T7), menos o T2.

4. Discussão

O crescimento e a manutenção do trato gastrointestinal das aves são fatores que proporcionam uma melhora na eficiência dos processos digestivos, uma vez que o epitélio intestinal atua como uma barreira natural protegendo o organismo de bactérias patogênicas e substâncias tóxicas presentes na luz intestinal (Marchini et al., 2009; Pelicano et al., 2003).

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do 5-hidroxitriptofano (5HTP) e do m-hidroxibenzilhidrazina (NSD1015) associados à *Lactobacillus* spp. sobre o peso corporal das aves e o desenvolvimento das vilosidades intestinais na porção proximal do duodeno de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis. E observar a influência de *Lactobacillus* spp. e *S. Enteritidis* na imunomarcção de serotonina no duodeno.

Ao analisar os resultados obtidos, nota-se que no experimento 1 não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos com relação ao peso médio corporal. Já no experimento 2, os tratamentos com o precursor (T1) e o precursor

associado à *Lactobacillus* spp. (T3) determinaram maior peso médio corporal das aves, diferindo significativamente do controle negativo (T7).

Os resultados do experimento 1 corroboram com os resultados obtidos em estudos anteriores, em que serotonina, seu precursor e inibidor foram administrados para frangos de corte, via intraperitoneal por cinco dias consecutivos, e não foram observadas alterações no ganho de peso das aves tratadas com o precursor e inibidor.

No experimento 2, as aves que receberam o precursor tiveram um leve aumento no peso médio corporal, o que se justifica pelos resultados observados na altura e densidade das vilosidades no duodeno. Quanto maior a superfície de contato maior sua capacidade de digestão e absorção de nutrientes.

Ao comparar a média geral, as aves que receberam somente o *pool* de *Lactobacillus* (T5) não diferiram significativamente do controle negativo (T7), corroborando com os dados obtidos por Corneli (2004) e Alvarez et al. (1994), que ao adicionarem probióticos na ração de frangos de corte não encontraram melhoras significativas no ganho de peso das aves.

Nos dois experimentos, com e sem desafio por *S. Enteritidis*, as aves tratadas com 5HTP apresentaram aumento na densidade e altura das vilosidades no duodeno.

O tratamento T1 (5HTP) apresentou o maior número de vilos e altura por campo, seguido pelos tratamentos T3 (5HTP + *pool* de *Lactobacillus*) e T5 (*pool* de *Lactobacillus*). Estes achados corroboram com os resultados obtidos por Nakamura et al. (2008) que ao administrarem sistemicamente 5HTP e NSD1015, observaram que 5HTP proporcionou um aumento na densidade das vilosidades intestinais em testes *in vivo*, realizado em camundongos, e *in vitro* com cultura de linhagens celulares (Caco-2).

No experimento 2, os tratamentos T1 (5HTP), T3 (5HTP + *pool* de *Lactobacillus*) e T5 (*pool* de *Lactobacillus*) apresentaram novamente as maiores densidades e alturas de vilos por campo, diferindo significativamente do inibidor (T2), inibidor associado à *Lactobacillus* (T4), controle positivo (T6) e controle negativo (T7).

Estes resultados sugerem a atuação de 5-hidroxitriptofano como um agente trófico, que segundo Macari & Maiorka (2000) é definido como uma substância que atua no desenvolvimento intestinal, estimulando o processo mitótico na região cripta:vilo, levando a um aumento no número de células e altura dos vilos.

A administração de *Lactobacillus* spp. determinou alturas maiores de vilosidades duodenais, corroborando com os resultados obtidos por Pelicano et al. (2003), que ao adicionarem uma mistura de *Lactobacillus* spp. na água de bebida, proporcionou uma maior altura de vilos em duodeno, e por Dobrogosz et al. (1991), que administraram *Lactobacillus reuteri* na ração de frangos de corte aos 42 dias de vida.

De acordo com Ramos et al. (2011), a maior densidade e altura das vilosidades está relacionada aos resultados de desempenho, em que as aves apresentam maior peso corporal, devido ao aumento da capacidade de digestão e absorção de nutrientes.

Nas três avaliações, dos dois experimentos, o tratamento T1 (5HTP) apresentou os melhores resultados quanto a densidade de vilos por campo avaliado, altura de vilosidades em duodeno e peso médio corporal das aves, demonstrando a atuação do precursor nos processos de digestão e absorção de nutrientes, e confirmando a relação da densidade, altura das vilosidades e desempenho de frangos de corte citada anteriormente.

Quanto a imunomarcção de serotonina, as aves tratadas com *Lactobacillus* spp., no experimento 1, e as aves tratadas com *Lactobacillus* spp. e *S. Enteritidis*, no experimento 2, apresentaram valores superiores aos demais tratamentos. Provavelmente a presença de *Lactobacillus* spp. e sua ação na mucosa intestinal promoveu uma maior liberação de serotonina. Porém os mecanismos exatos desta interação entre serotonina e *Lactobacillus* spp. precisam ser elucidados.

Linden et al. (2003) e O'Hara et al. (2004) observaram um aumento de células imunomarcadas para serotonina em suínos com colite e ilite experimental induzida pelo ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Sugerindo que processos inflamatórios levam a um aumento da liberação de serotonina pelas células enterocromafins.

As alterações na imunomarcção positiva de serotonina nem sempre são observadas durante os processos inflamatórios, acredita-se que este dependa da espécie animal avaliada e do tipo e grau de inflamação (O'Hara et al., 2006). Sabe-se que determinados processos inflamatórios ocasionam aumento no número de células imunomarcadas para serotonina, mas as causas e os mecanismos deste aumento ainda são desconhecidos.

De acordo com Linden et al. (2003) é possível que o aumento de células imunomarcadas para serotonina ocorra devido a uma diminuição da sua recaptação pelo

seu transportador específico (SERT). Os resultados observados por O'Hara et al., (2004) indicam que a recaptação de serotonina é realmente reduzida durante inflamação por *Citrobacter rodentium*, onde as células imunomarcadas para SERT foram reduzidas 10 dias após a infecção. Mesmos resultados foram observados em colites ulcerativas em humanos (Coates et al 2004).

Neste estudo, observa-se aumento na imunomarcação de serotonina no duodeno devido à presença de *Lactobacillus* spp. e *S. Enteritidis*, que estimularam a mucosa intestinal promovendo maior liberação de serotonina das células enterocromafins, porém o mecanismo exato de como este processo ocorre precisa ser mais elucidado.

5. Conclusão

Conclui-se que a administração de 5-hidroxitriptofano isolado ou associado à *Lactobacillus* spp. determinaram maiores densidade e altura das vilosidades no duodeno, e, a presença de *Lactobacillus* spp. e *S. Enteritidis* ocasionaram um aumento na imunoexpressão de serotonina no duodeno. Estes resultados inferem na ação do precursor da serotonina sobre a resposta imune, desenvolvimento intestinal, digestão e absorção de nutrientes de frangos de corte.

6. Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - processo 472571/2011-7) pelo financiamento do projeto e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo 2011/15338-1) pela concessão da bolsa de estudo.

7. Referencias Bibliográficas

Alvarez LC, Barrera EM, Gonzáles EA. Evaluacion de promotores Del crecimiento para pollos de engorda. Veterinária México. 1994; 24(2):141-44.

Alverdy JC, Aoye E, Moss GS. Effect of commercially available chemically defined liquid diets on the intestinal microflora and bacterial translocation from the gut. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition. 1990; 14(1):1-6.

Andreatti Filho RL, Silva EN, Curi PR. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbia no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella Typhimurium* e

Salmonella Enteritidis. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 1997; 49:661-72.

Behmer AO, Tolosa EMC, Freitas Neto AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Manole: 2003. p.331.

Cedraz-Mercez PL, Almeida AC, Thomaz CM, Costa e Sousa RH, Olivares EL, Cortes WS, Medeiros MA, Reis LC. Effect of L-5 Hydroxytryptophan on drinking behavior in *Coturnix japonica* (Temminck and Schlegel, 1849) (Galliformes:Aves): Involvement of rennin-angiotensin system. Brazilian Journal of Biology. 2007; 67(4):771-76.

Coates MD, Mahoney CR, linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, Crowell MD, Sharkey KA, Gershon MD, Mawe GM, Moses PL. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. Gastroenterology. 2004; 126:1657-64.

Corneli J. Avaliação de promotores de crescimento alternativos em substituição aos convencionais sobre o desempenho, características de carcaça e morfometria intestinal em frangos de corte. [Dissertação]. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 2004.

Cunningham JG. Tratado de Fisiologia Veterinária. In: Cunningham, JG. Tratado de Fisiologia Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 450.

Deitch EA, Xu D, Naruhn MB, Deitch DC, Lu Q, Marino AA. Elemental diet and IV-TPN-induced bacterial translocation is associated with loss of intestinal mucosal barrier function against bacteria. Annals of Surgery. 1995; 221(3):299-307.

Dobrogsz WJ, Black BL, Casas JÁ. Delivery of viable *Lactobacillus reuteri* to the gastrointestinal tract of poultry. Poultry Science. 1991; 70:158.

Ferreira AJP, Ferreira CA, Petrella Neto R, Oliveira DR, Nuremberger Junior R, Lopes VCBA. Probiotics: benefits and efficiency in poultry production. Arquivos do Instituto Biológico. 1998; 65:139-49.

Fukumoto S, Tatewaki M, Yamada T. Short-chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5HT release in rats. American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2003; 284:1269-76.

Furlan RL, Macari M, Luquetti BC. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: Simpósio Técnico de incubação, matrizes de corte e nutrição; 2004; Santa Catarina, Balneário Camboriú. Brasil. p. 6-28.

Hasler WL. Serotonin and the GI tract. Current Gastroenterology Reports. 2009; 11:383-91.

Khan WI, Ghia JE. Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*. 2010; 161:19-27.

Linden DR, Chen JX, Gershon MD, Sharkey KA, Mawe GM. Serotonin availability is increased in mucosa of guinea pigs with TNBS-induced colitis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2003; 285:207-16.

Macari M, Maiorka A. Função gastrintestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: Conferência Apinco de ciência e tecnologia avícolas; 2000; Campinas, São Paulo. Brasil. p.161-74.

Maiorka A. Adaptações digestivas pós eclosão. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola; 2001; São Paulo, Campinas. Brasil. p. 141-52.

Manocha M, Khan WI. Serotonin and GI Disorders: An Update on Clinical and Experimental Studies. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 2012; 3:1-6.

Marchini CFP, Silva PL, Nascimento MRBM, Beletti ME, Guimarães EC, Soares HL. Morfometria da mucosa duodenal em frangos de corte submetidos à temperatura ambiente cíclica elevada. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2009; 61(2):491-97.

Masseno APB. Avaliação da fibrose endometrial e dos miofibroblastos nas endometoses ativa e inativa das éguas. [Tese]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – UNESP; 2012.

Murarolli VDA. Efeito de probiótico, prebiótico e simbiótico sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte. [Dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2008.

Nakamura K, Sato T, Ohashi A, Tsurui H, Hasegawa H. Role of a Serotonin Precursor in Development of Gut Microvilli. *The American Journal of Pathology*. 2008; 172(2):333-44.

O'Hara JR, Skinn AC, Macnaughton WK, Sherman PM, Sharkey KA. Consequences of *Citrobacter rodentium* infection on enteroendocrine cells and the enteric nervous system in the mouse colon. *Cellular Microbiology*. 2006; 8:646-60.

O'Hara JR, Ho W, Linden RD, Mawe GM, Sharkey KA. Enteroendocrine cells and 5HT availability are altered in mucosa of guinea pigs with TNBS ileitis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2004; 287:998-1007.

Pelicano ERL, Souza PA, Souza HBA, Oba A, Norkus EA, Kodawara LM, Lima TMA. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 2003; 98:(547):81-84.

Ramos LSN, Lopes JB, Silva SMMS, Silva FES, Ribeiro MN. Desempenho e histomorfometria intestinal de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade recebendo melhoradores de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2011; 40(8):1738-44.

Rocha TS, Baptista AAS, Donato TC, Milbradt EL, Okamoto AS, Rodrigues JCZ, Coppola MP, Andreatti Filho RL. Evaluation of in vitro and in vivo adhesion and immunomodulatory effect of *Lactobacillus* species strains isolated from chickens. *Poultry Science*. 2012; 91:362–69.

SAS Institute. SAS/STAT User`s Guide. Version 9.2. SAS Institute Inc, Cary, NC. 2009.

Schultz M, Munro K, Tannock GW, Melchner I, Gotil C, Schwietz H, Scholmerich J, Rath HC. Effects of feeding a probiotic preparation (SIM) containing insulin on the severity of colitis and on the composition of the intestinal microflora in HLA-B27 transgenic rats. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2004; 11:581-87.

Schwarz KK, Furuya WM, Natali MRM, Gaudezi MC, Lima PAG. Mananoligossacarídeo em dietas para larvas de tilápia. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2011; 40(12):2634-40.

Wang H, Steed J, Motomura Y. CD4+ T cell-mediated immunological control of enterochromafin cell hyperplasia and 5-hydroxytryptamine production in enteric infection. *Gut*. 2007; 56:949-57.

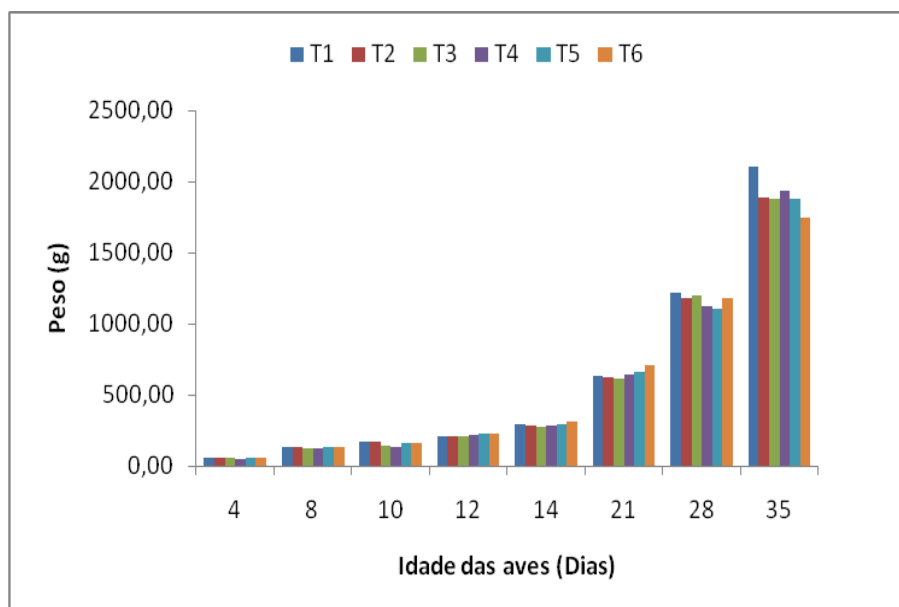


Figura 1. Peso médio corporal de frangos de corte do experimento 1 nos tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano); T2 (NSD1015); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*); T6 (controle negativo).

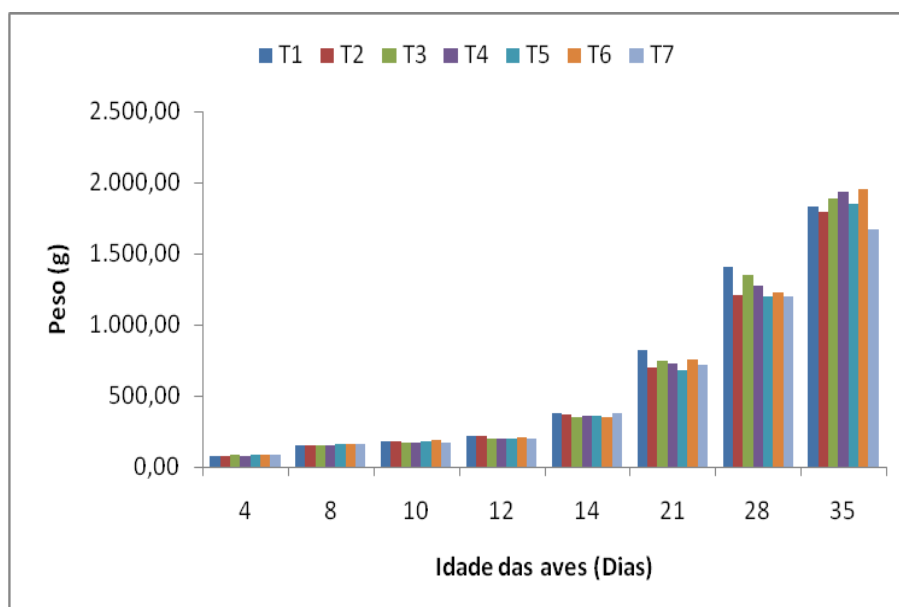


Figura 2. Peso médio corporal de frangos de corte do experimento 2 nos tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano + *S. Enteritidis*); T2 (NSD1015+ *S. Enteritidis*); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T6 (*S. Enteritidis*); T7 (controle negativo).

Tabela 1. Valores médios de densidade dos vilos (numero vilos/campo) no duodeno de frangos de corte, no experimento 1, tratados com 5-hidroxitriptofano, m-hidroxibenzilhidrazine e *Lactobacillus* spp.

Tratamentos*	Idade (Dias)			Médias
	14	21	28	
T1	11,20 ^{B, c**}	9,35 ^{A, d}	8,50 ^{A, b}	9,68 ^e
T2	10,50 ^{C, c}	7,15 ^{B, ab}	5,45 ^{A, a}	7,70 ^{bc}
T3	8,95 ^{B, b}	8,40 ^{AB, cd}	7,60 ^{A, b}	8,32 ^{cd}
T4	8,50 ^{C, b}	7,35 ^{B, abc}	5,95 ^{A, a}	7,27 ^b
T5	10,45 ^{B, c}	7,75 ^{A, bc}	7,45 ^{A, b}	8,55 ^d
T6	7,05 ^{B, a}	6,50 ^{A, a}	5,40 ^{A, a}	6,32 ^a
Médias	9,45 ^C	7,75 ^B	6,73 ^A	

* Tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano); T2 (NSD1015); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*); T6 (controle negativo).

** Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2. Valores médios de densidade dos vilos (numero vilos/campo) no duodeno de frangos de corte, no experimento 2, tratados com 5-hidroxitriptofano, m-hidroxibenzilhidrazine, *Lactobacillus* spp. e desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

Tratamentos*	Idade (Dias)			Médias
	14	21	28	
T1	9,70 ^{B, d*}	7,85 ^{A, c}	6,90 ^{A, b}	8,15 ^d
T2	7,10 ^{B, ab}	6,00 ^{A, a}	5,20 ^{A, a}	6,10 ^{ab}
T3	8,80 ^{B, cd}	8,30 ^{AB, c}	7,25 ^{A, b}	8,12 ^d
T4	7,50 ^{B, abc}	6,20 ^{A, ab}	5,50 ^{A, a}	6,40 ^b
T5	8,25 ^{B, bc}	7,45 ^{B, bc}	6,10 ^{A, ab}	7,27 ^c
T6	6,30 ^{B, a}	5,00 ^{A, a}	4,90 ^{A, a}	5,40 ^a
T7	6,40 ^{B, a}	5,80 ^{AB, a}	5,05 ^{A, a}	5,75 ^{ab}
Médias	7,72 ^C	6,66 ^B	5,84 ^A	

* Tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano + *S. Enteritidis*); T2 (NSD1015+ *S. Enteritidis*); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T6 (*S. Enteritidis*); T7 (controle negativo).

** Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 3. Valores médios da altura de vilos (μm) no duodeno de frangos de corte, no experimento 1, tratados com 5-hidroxitriptofano, m-hidroxibenzilhidrazine e *Lactobacillus* spp.

Tratamentos*	Idade (Dias)			Médias
	14	21	28	
T1	1253,80 ^{A, b**}	1608,58 ^{B, b}	1716,07 ^{B, b}	1526,15 ^c
T2	1096,31 ^{A, ab}	1405,35 ^{B, ab}	1535,86 ^{B, ab}	1345,84 ^{ab}
T3	1300,28 ^{A, b}	1471,72 ^{B, ab}	1586,05 ^{B, ab}	1452,68 ^{bc}
T4	1123,67 ^{A, ab}	1405,30 ^{B, ab}	1482,19 ^{B, a}	1337,05 ^{ab}
T5	1231,92 ^{A, ab}	1423,02 ^{B, ab}	1551,52 ^{B, ab}	1402,15 ^{ab}
T6	1044,78 ^{A, a}	1391,23 ^{B, a}	1477,90 ^{B, a}	1304,64 ^a
Médias	1175,13 ^A	1450,87 ^B	1558,27 ^C	

* Tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano); T2 (NSD1015); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*); T6 (controle negativo).

** Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 4. Valores médios da altura de vilos (μm) no duodeno de frangos de corte tratados com 5-hidroxitriptofano, m-hidroxibenzilhidrazine, *Lactobacillus* spp. e desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

Tratamentos*	Idade (Dias)			Médias
	14	21	28	
T1	1407,04 ^{A, b**}	1606,31 ^{B, d}	1702,13 ^{B, d}	1571,83 ^b
T2	1273,62 ^{A, ab}	1359,55 ^{AB, abc}	1459,91 ^{B, ab}	1364,36 ^a
T3	1381,21 ^{A, b}	1520,97 ^{A, cd}	1679,38 ^{B, cd}	1527,19 ^b
T4	1177,46 ^{A, a}	1386,45 ^{B, abc}	1483,61 ^{B, abc}	1349,17 ^a
T5	1380,21 ^{A, b}	1455,66 ^{A, bcd}	1623,92 ^{B, bcd}	1486,60 ^b
T6	1216,69 ^{A, ab}	1245,14 ^{A, a}	1318,87 ^{A, a}	1260,23 ^a
T7	1227,29 ^{A, ab}	1310,49 ^{AB, ab}	1465,17 ^{B, ab}	1334,32 ^a
Médias	1294,79 ^A	1412,08 ^B	1533,29 ^C	

* Tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano + *S. Enteritidis*); T2 (NSD1015+ *S. Enteritidis*); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T6 (*S. Enteritidis*); T7 (controle negativo).

** Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

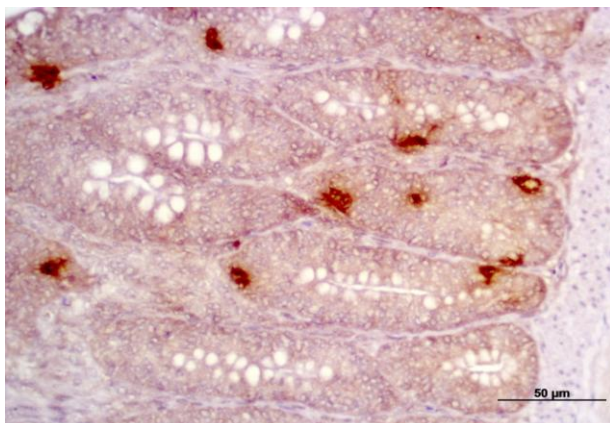


Figura 3. Imunomarcção de serotonina em células enterocromafins de duodeno de frangos de corte aos 14 dias de vida. Barra:50μm.

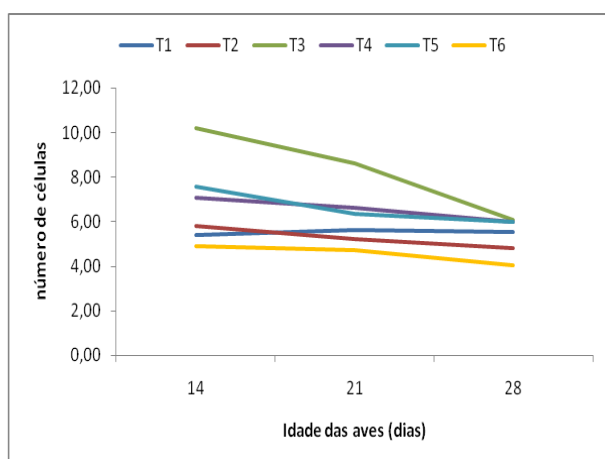


Figura 4. Número de células imunomarcadas para serotonina (numero cels/campo) em duodeno de frangos de corte, no experimento 1, nos tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano); T2 (NSD1015); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*); T6 (controle negativo).

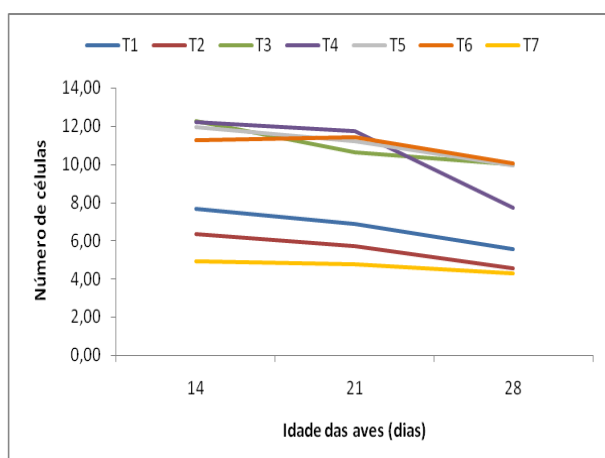


Figura 5. Número de células imunomarcadas para serotonina (numero cels/campo) em duodeno de frangos de corte, no experimento 2, nos tratamentos: T1 (5-hidroxitriptofano + *S. Enteritidis*); T2 (NSD1015+ *S. Enteritidis*); T3 (5-hidroxitriptofano + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T4 (NSD1015 + *pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T5 (*pool* de *Lactobacillus*+ *S. Enteritidis*); T6 (*S. Enteritidis*); T7 (controle negativo).

CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO GERAL

A integridade das células que compõem a mucosa intestinal é de fundamental importância para a saúde do hospedeiro, pois a mucosa atua como a primeira linha de defesa contra infecções virais e bacterianas (MUIR et al., 2000; LIU et al., 2010).

As células enteroendócrinas presentes na mucosa intestinal produzem e liberam substâncias como a serotonina para o lúmen intestinal devido a estímulos, e, esta liberação faz com que a serotonina atue nos processos de digestão, absorção, proliferação epitelial e modulação do sistema imune através de seus receptores podendo muitas vezes atuar como mediador em doenças inflamatórias intestinais (URIBE et al., 1994; GARABAL et al., 2003; FUKUMOTO et al., 2003; HASLER, 2009).

Tendo em vista essa variedade de funções da serotonina e poucos estudos em aves sobre o tema, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da serotonina, através do seu precursor (5HTP) e seu inibidor (NSD1015) associados à *Lactobacillus* spp. na resposta imune e no desenvolvimento das vilosidades intestinais de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis.

Ao avaliar os tratamentos com serotonina, 5HTP e NSD1015 verificou-se que a administração de serotonina para as aves ocasionou alterações comportamentais caracterizadas por sonolência e inibição da ingestão de ração por períodos de aproximadamente 60 minutos. Com isso, o peso médio corporal das aves tratadas com serotonina foi menor e apresentou diferenças significantes em relação aos demais tratamentos.

Nos tratamentos com 5HTP, as aves apresentaram os mesmos sinais de sonolência dos tratamentos com serotonina, porém, estes sinais foram observados em aproximadamente 70% das aves e os efeitos menos intensos. A ingestão de ração foi inibida por períodos inferiores a 10 minutos. Portanto o peso corporal das aves não diferiu dos controles negativos.

Nas aves em que o inibidor NSD1015 foi administrado, observou-se o mesmo comportamento dos controles negativos. Não houve alteração comportamental e a ingestão de ração manteve-se inalterada.

Estes resultados sugerem a possibilidade do envolvimento das vias serotoninérgicas no comportamento das aves e ingestão alimentar influenciando, consequentemente, o peso corporal. Porém os mecanismos exatos de como ocorrem estas interações precisam ser mais elucidados.

De acordo com as observações comportamentais e peso médio corporal das aves, optou-se por utilizar 5HTP (25mg/Kg) e NSD1015 (150mg/Kg). Para isso, o estudo foi dividido em dois experimentos: experimento 1 (aves não desafiadas com *Salmonella* Enteritidis) e experimento 2 (aves desafiadas com *S. Enteritidis*). Avaliou-se resposta imune humoral através das concentrações de IgA intestinal e IgG sérico.

No experimento 1, as concentrações de IgA intestinal e IgG sérico não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$). No experimento 2, as concentrações de IgA mantiveram-se estáveis nos dias 10, 12 e 14 e a partir de 21 dias observou-se uma elevação das mesmas. Aos 28 dias, o tratamento com inibidor e *Lactobacillus* spp. determinou a maior concentração de IgA intestinal e diferiu estatisticamente de 5HTP que apresentou a menor concentração. O mesmo foi observado aos 35 dias. As concentrações de IgG, no experimento 2, foram similares, sem diferenças significativas ($p>0,05$).

Neste caso podemos inferir que o inibidor da serotonina (NSD1015) associado à *Lactobacillus* spp. promoveu maior estímulo no sistema imune quando comparado ao precursor (5HTP).

Pouco se sabe sobre a atuação do precursor (5-hidroxitriptofano) e do inibidor (NSD1015) da serotonina sobre a resposta imune humoral de frangos de corte, mas pelos resultados obtidos neste estudo, sugere-se que esta atuação talvez envolva outros componentes do sistema imunológico, além de IgA e IgG.

Com relação à quantificação de *Salmonella* Enteritidis no conteúdo cecal das aves do experimento 2, observa-se que o tratamento com 5HTP e *Lactobacillus* spp. determinou menor quantificação bacteriana, diferindo do controle positivo. O tratamento com o inibidor apresentou médias de recuperação iguais ao controle positivo, sendo pouco efetivo na redução do agente patogênico.

Apesar dos tratamentos com 5-hidroxitriptofano não apresentarem altos níveis de IgA intestinal e IgG sérica, observou-se uma redução de *Salmonella* Enteritidis, o que demonstra a interação de 5-hidroxitriptofano e *Lactobacillus* spp. com o sistema imunológico das aves por meio de mecanismos que precisam ser mais elucidados em estudos posteriores.

Quanto à morfometria intestinal e peso médio corporal, nota-se que no experimento 1 não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos com relação ao peso médio corporal. Já no experimento 2, os tratamentos com o precursor isolado e associado à

Lactobacillus spp. determinaram maior peso corporal das aves, diferindo significativamente do controle negativo.

Nos dois experimentos, com e sem desafio por *S. Enteritidis*, as aves tratadas com 5HTP apresentaram aumento na densidade e altura das vilosidades no duodeno. A administração de *Lactobacillus* spp. também determinou alturas maiores de vilosidades duodenais, corroborando com os resultados obtidos por Pelicano et al. (2003).

Estes resultados sugerem a atuação de 5-hidroxitriptofano como um agente trófico, que segundo Macari e Maiorka (2000) é definido como uma substância que atua no desenvolvimento intestinal, estimulando o processo mitótico na região cripta:vilo, levando a um aumento no número de células e altura dos vilos.

Quanto a imunexpressão de serotonina, as aves tratadas com *Lactobacillus* spp., no experimento 1, e as aves tratadas com *Lactobacillus* spp. e *S. Enteritidis*, no experimento 2, apresentaram valores superiores aos demais tratamentos. Corroborando com os resultados obtidos por Linden et al. (2003) e O'Hara et al. (2004), que observaram um aumento de células imunomarcadas para serotonina em suínos com colite e ilite experimental induzida pelo ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Sugerindo que processos inflamatórios proporcionam aumento da liberação de serotonina pelas células enterocromafins.

Diante destes resultados nota-se que a administração de precursores, inibidores e a própria serotonina apresentam várias funções ligadas ao trato gastrintestinal das aves, cujos mecanismos de ação precisam ser mais elucidados.

Os dados inferem que 5-hidroxitriptofano pode melhorar a capacidade de digestão e absorção de nutrientes através do desenvolvimento das vilosidades intestinais e promover a liberação de serotonina para o duodeno, estimulando a resposta imune das aves.

A partir do momento em que as ações da serotonina, do seu precursor e do seu inibidor forem sendo esclarecidas surgiram novas estratégias terapêuticas para o controle e prevenção de doenças entéricas em frangos de corte.

CONCLUSÃO GERAL

Os tratamentos com serotonina determinaram alterações caracterizadas por sonolência e diminuíram o peso corporal das aves devido a não ingestão de ração após a administração da monoamina. O 5-hidroxitriptofano também promoveu efeitos semelhantes ao sono, diminuindo a atividade de alerta das aves, porém a intensidade foi menor e não influenciou significativamente o peso corporal e, nas aves em que o inibidor (NSD1015) foi administrado, o comportamento e o peso médio corporal mantiveram-se inalterados.

Houve pouca influência dos tratamentos com o precursor (5-hidroxitriptofano) e inibidor (NSD1015) da serotonina na indução de resposta imune humoral mediada por IgA e IgG, inferindo que a disponibilidade ou inibição da síntese de serotonina possa influenciar o sistema imune a partir de outros componentes. Apesar dos tratamentos com 5-hidroxitriptofano e *Lactobacillus* spp. não apresentarem altos níveis de IgA intestinal e IgG sérico, observou-se uma redução de *Salmonella* Enteritidis, o que demonstra a interação de 5-hidroxitriptofano e *Lactobacillus* spp. com o sistema imunológico das aves por meio da ativação de outros componentes da resposta imune.

A administração de 5-hidroxitriptofano isolado ou associado à *Lactobacillus* spp. determinaram maiores densidade e altura das vilosidades no duodeno, e, a presença de *Lactobacillus* spp. e *S. Enteritidis* ocasionaram um aumento na imunoexpressão de serotonina no duodeno. Estes resultados sugerem o papel do precursor da serotonina (5-hidroxitriptofano) sobre a resposta imune, e, nos processos de digestão e absorção de nutrientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXAN,A.F.; MOHAMED, S. e IBRAHIM, A.M. Immune Response Elicited in Mice after Immunization with Flagellin from *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. **Global Veterinaria**, v.3, n.6, p. 465-471, 2009.

ANLAUF, M.; SCHAFER, M.K.H.; EIDEN, L.; WEIHE, E. Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic and catecholaminergic phenotypes. **The Journal of Comparative Neurology**. v.459, p.90-111, 2003.

ANDREATTI FILHO, R.L. Salmonelose Aviária. In: ANDREATTI FILHO, R. L. 1 Ed **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: ROCCA, 2007, p.84-87.

ANDREATTI FILHO, R.L. Doenças Aviárias e Saúde Pública. In: REVOLLEDO, L & FERREIRA, A.J.P. **Patologia aviária**. Rio de Janeiro: Manole Ltda. 2009, 18-33p.

ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E.N. Probióticos e correlatos na produção avícola. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L. **Farmacologia aplicada à avicultura**. São Paulo: Roca, 2005. 366 p.

BRISBIN, J.T.; GONG, J. e SHARIF, S. Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. **Animal Health Research Reviews**, v.9, n.1, p101–110, 2008.

CALENGE, F.; KAISER, P.; VIGNAL, A.; BEAUMONT, C. Genetic control of resistance to salmonellosis and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. **Genetics Selection Evolution**. v.42, p.2-11, 2010.

CASTRO, J.M.A. **Avaliação da utilização de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 como adjuvante na vacinação contra *Leishmania braziliensis***. 2005. 96 p. Dissertação de Mestrado (Ciências Biológicas, área de concentração: Imunobiologia de Protozoários)- Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

CHAMBERS, J.R.; GONG, J. The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. **Food Research International**, v.44, p.3149–3159, 2011.

CLOEZ-TAYARANI, I.; CHANGEUX, J.P. Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective. **Journal of Leukocyte Biology**, v.81, p.599-606, 2007.

CORR, S. C.; HILL, C. e GAHAN, C.G.M. Understanding the Mechanisms by Which Probiotics Inhibit Gastrointestinal Pathogens. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.56, p.1-15, 2009.

DEBONNET L., GARRET L., CLARKE, G., BIENENSTOCK, J., DINAN, T.G. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. **Journal of Psychiatric Research**, v.43, p.164-174, 2009.

DELUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; PLANETA, C.S.; GALLACI, M.; AVELLAR, M.C.W. **Farmacologia Integrada**. 3 Ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007, cap.21, 184-189p.

DE PONTI, F. Pharmacology of serotonin: what a clinician should know. **Gut**, v.53, p.1520-1535, 2004.

FAO/WHO (2002). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/. Acesso 30 de abril de 2013.

FUJIMIYA, M.; OKUMIYA K.; KUWAHARA, A. Immunoelectron microscopic study of the luminal release of serotonin from rat enterochromaffin cells induced by high intraluminal pressure. **Histochemistry and Cell Biology**, v.108, p.105-113, 1997.

FUKUMOTO, S.; TATEWAKI, M.; YAMADA T. Short-chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5HT release in rats. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.284, p.1269-1276, 2003.

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, Balneário Camburiú, **Anais...** Camburiú, 2004. p.6-28.

GALDEANO, C.M. e PERDIGÓN, G. The Probiotic Bacterium *Lactobacillus casei* Induces Activation of the Gut Mucosal Immune System through Innate Immunity **Clinical And Vaccine Immunology**, n.2, v.13, p.219–226, 2006.

GARABAL, M.F.; NUNEZ, M.J.; BALBOA, J.; DELGADO, P.L.; GALLEGO, R.; CABALLERO, T.G.; ROEL, M.D.F.; BRENLLA, J.; MENDEZ, M.R. Serotonin upregulates the activity of phagocytosis through 5-HT_{1A} receptors. **British Journal of Pharmacology**, v.139, p.457-463, 2003.

GAST, R.K. Paratyphoid Infections. In: CALNECK, B.W. **Diseases of poultry**. 10^a Ed. Ames: Iowa State University Press, 1997, p.81-121.

GERSHON, M.D.; TACK, J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. **Gastroenterology**, v.132, p.397-414, 2007.

GONG, J., FOSTER, R. J., YU, H. et al. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. **FEMS, Microbiology Letters**, v.208, n.1, p.1-7, 2002

HAGHIGHI, H.R.; GONG, J.; GYLES, C.L.; HAYES, M.A.; SANEI, B.; PARVIZI, P.; GISAVI, H.; CHAMBERS, J.R. e SHARIF, S. Modulation of Antibody-Mediated Immune Response by Probiotics in Chickens. **Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12, p.1387–1392, 2005.

HANSEN, M.B.; WITTE, A.B. Review: the role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion. **Acta Physiologica**, v.193, p.311-323, 2008.

HASLER, W. L. Serotonin and the GI tract. **Current Gastroenterology Reports**. v.11, p.383-391, 2009.

HIGGINS, J.P.; HIGGINS, S.E.; WOLFENDEN, A.D.; HENDERSON, S.N; TORRES-RODRIGUEZ, A.; VICENTE, J.L.; HARGIS, B.M. e Tellez, G. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella* Enteritidis in neonatal broilers. **Poultry Science**, v.89, p.243–247, 2010.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.da; REIS, E. M. F. dos. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p.55-62, 1997.

HUANG, M.K.; CHOI, Y.J.; HOUDE, R.; LEE, J.W.; LEE, B. e ZHAO, X. Effects of *Lactobacilli* and an Acidophilic Fungus on the Production Performance and Immune Responses in Broiler Chickens. **Poultry Science**, v.83, p.788–795, 2004.

ITO, N. M.K.; MIYAJI, C.I.; MIYAJI, S.O.; LIMA, E.A. Fisiopatologia do sistema digestório e anexos. IN: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2009, 215-227p.

IWASAKI, A. e MEDZHITOV, R. Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. **Science**, v.327, p.291-295, 2010.

JACKSON, G.J., LANGFORD, C.F., ARCHER, D.L. Control of salmonellosis and similar foodborne infections. **Food Control**, v.2, p.26-34, 1991.

KHAN, W.I.; GHIA, J.E. Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v.161, p.19-27, 2010.

KIDD, M.; MODLIN, I.M.; GUSTAFSSON, B.I. Luminal regulation of normal and neoplastic human EC cell serotonin release is mediated by bile salts, amines, tastants, and olfactants. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.295, p.262-272, 2008.

KITAZAWA, T.; UKAI, H.; KOMORI, S.; TANEIKE, T. pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine induced contraction in the chicken gastrointestinal tract. **Autonomic & Autacoid Pharmacology**, v.26, p.157-168, 2006.

LESURTEL, M.; SOLL, C.; GRAF, R.; CLAVIEN, P.A. Role of serotonin in the hepato-gastrointestinal tract: an old molecule for new perspectives. **Cellular and Molecular Life Science**, v.65, p.940-950, 2008.

LINDEN, D.R., CHEN, J.X., GERSHON, M.D., SHARKEY, K.A., MAWE, G.M. Serotonin availability is increased in mucosa of guinea pigs with TNBS-induced colitis. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.285, p.207-216, 2003.

LIU, F.; YANG, J.; ZHANG, Y.; ZHOY, D.; CHEN, Y.; SHI, W.; LI, Q.; TIEN, P.; YAN, H. Recombinant flagellins with partial deletions of the hypervariable domain lose antigenicity but not mucosal adjuvancy. **Biochemical and biophysical research communications**. v.392, p.582-587, 2010.

LÓPEZ, F.E.; PESCARETTI, M.M.; MORERO, R.; DELGADO, M.A. *Salmonella* Typhimurium general virulence factors: A battle of David against Goliath?. **Food Research International**, v. 45, n.2, p.842-851, 2012.

LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J.J.; LEE, M.D. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.6816-6824, 2003.

MACARI, M.; MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: Conferência Apinco de ciência e tecnologia avícolas; Campinas, São Paulo. Brasil. 2000. p.161-74.

MANOCHA, M.; KHAN, W.I. Serotonin and GI Disorders: An Update on Clinical and Experimental Studies. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v.03, p.01-06, 2012.

MASTROENI, P.; CHABALGOITY, J.A.; DUNSTAN, S.J.; MASKELL, D.J.; DOUGAN, G. *Salmonella*: Immune responses and vaccines. **The Veterinary Journal**, v.161, p.132–164, 2000.

MATHEW, A.G. Effect of galactan on selected microbial populations and pH and volatile fatty acids in the ileum of the weanling pig. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.71, n.6, p.1503-1509, 1993.

MIYAMOTO, T.; HORIE, T.; FUJIWARA, T.; FUKATA, T.; SASAI, K.; BABA, E. *Lactobacillus* Flora in the Cloaca and Vagina of Hens and Its Inhibitory Activity Against *Salmonella* Enteritidis *In Vitro*. **Poultry Science**, v.79, p.07-11, 2000.

MONTASSIER, H.J. 2009. Fisiopatologia do sistema imune. In: BERCHIERI JUNIOR A.; SILVA E.N.; DI FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. 2 ed. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2009, 391-429p.

MUIR, W.I.; BRYDEN, W.L. e HUSBAND, A.J. Immunity, vaccination and the avian intestinal tract. **Developmental and Comparative Immunology**, v.24, p.325-342, 2000.

MURAROLLI, V.D.A. **Efeito de probiótico, prebiótico e simbiótico sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte**. 2008. Tese (Dissertação Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo), Universidade de São Paulo, São Paulo.

MURRY, A.C.; HINTON, A. e MORRISON, H. Inhibition of Growth of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, and *Clostridia perfringens* on Chicken Feed Media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Poultry Science**, v.3, n.9, p.603-607, 2004.

NAKAMURA, K.; SATO, T.; OHASHI, A.; TSURUI, H.; HASEGAWA, H. Role of a Serotonin Precursor in Development of Gut Microvilli. **The American Journal of Pathology**, v.172, n.2, p.333-344, 2008.

O'CONNELL P.J.; WANG X.; LEON-PONTE M.; GRIFFITHS C.; PINGLE S. C.; AHERN G. P. A novel form of immune signaling revealed by transmission of the inflammatory mediator serotonin between dendritic cells and T cells. **Blood**. v.107, p.1010-1017, 2006.

OGRA, P.L.; FADEN, H.; WELLIVER, R.C. Vaccination strategies for mucosal immune responses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p.430–445, 2001.

O'HARA J.R.; HO, W.; LINDEN, R.D.; MAWE, G.M.; SHARKEY, K.A. Enteroendocrine cells and 5HT availability are altered in mucosa of guinea pigs with TNBS ileitis. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.287, p.998-1007, 2004.

O'HARA, J.R.; SKINN, A.C.; MACNAUGHTON, W.K.; SHERMAN, P.M.; SHARKEY, K.A. Consequences of *Citrobacter rodentium* infection on enteroendocrine cells and the enteric nervous system in the mouse colon. **Cellular Microbiology**, v.8, p.646-660, 2006.

OKAMOTO, A.S.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T.; PEREIRA, R.E.P.; MENCONI, A.; ROCHA, T.S.; MARIETTO-GONÇALVES, G.A. Immunological evaluation of the intestinal mucosa

of broiler chicks treated with *Lactobacillus* spp. and challenged with *Salmonella* Enteritidis. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.9, n.4, p.259-262, 2007.

PELICANO, E.R.L., SOUZA, P.A., SOUZA, H.B.A., OBA, A., NORKUS, E.A., KODAWARA, L.M., LIMA, T.M.A. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.98, n.547, p.81-84, 2003.

POLO, P.A.; REIS, R.O., CEDRAZ-MERCEZ, P.L.;CAVALCANTE-LIMA, H.R.; OLIVARES, E.L.; MEDEIROS, M.A.; CORTES, W.R.; REIS, L.C. Behavioral and neuropharmacological evidence that serotonin crosses the blood-brain barrier in *Coturnix japonica* (Galliformes; Aves). **Brazilian Journal of Biology**. v.67, p.167-171, 2007.

RAJA,M.M.M.; RAJA, A. E IMRAN, M. M. *Lactobacillus* as a Probiotic Feed for Chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.8, n.8, p.763-767, 2009.

RAMOS, L.S.N.; LOPES, J.B.; SILAVA, S.M.M.S.; SILVA, F.E.S.; RIBEIRO, M.N. Desempenho e histomorfometria intestinal de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade recebendo melhoradores de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.40, n.8, p.1738-1744, 2011.

RAWDON B.B; ANDREW A. Gut endocrine cells in birds: an overview, with particular reference to the chemistry of gut peptides and the distribution, ontogeny, embryonic origin and differentiation of the endocrine cells. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v.34, p.3-82, 1999.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P.; MEAD, G.C. Prospects in *Salmonella* control: competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. **Journal Applied Poultry Research**. v.15, p.341-351, 2006.

SANTINI, C.; BAFFONI, L.; GAGGIA, F.; GRANATA, M.; GASBARRI, R.; GIOIA, D.E.; BIAVATI, B. Characterization of probiotic strains: An application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p.S98-S108, 2010.

SHARKEY, K.A.; MAWE, G.M. Neuroimmune and epithelial interaction in intestinal inflamtion. **Current Opinion in Pharmacology**, p.669-677, 2002.

SHEA, M.M.; MENCH, J.A.; THOMAS, O.P. The Effect of Dietary Tryptophan on Agressive Behavior in Developing and Mature Broiler Breeder Males. **Poultry Science**, v.69, p.1664-1669, 1990.

SILVA, E.N.; ANDREATTI FILHO, R. L. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVICOLA, 2000, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 2000. p.45-55.

SILVA, L.P.; NÖRNBERG, J.L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.5, p.983-990, 2003.

SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F; FILHO, J.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência Saúde Coletiva**. v.13, n.5, 2008.

STERNS, T.; POLLAK, N.; ECHTENACHER, B.; MANNEL, D.N. Divergence of protection induced by bacterial products and sepsis-induced immune suppression. **Infection and immunity**, v.73, p.4905-4912, 2005.

TONINI, M. 5-Hydroxytryptamine effects in the gut: 3, 4 and 7 receptors. **Neurogastroenterology and Motility**, v.17, p.637-642, 2005.

URIBE, A.; ALAM, M.; JOHANSSON, O.; MIDTVEDT, T.; THEODORSSON, E. Microflora Modulates Endocrine Cells in the Gastrointestinal Mucosa of the Rat. **Gastroenterology**. v.107, p.1259-1269, 1994.

YANG, G.; LACKNER, A.A. Proximity between 5-HT secreting enteroendocrine cells and lymphocytes in the gut mucosa of rhesus macaques (*Macaca mulata*) is suggestive of the role for enterochromaffin cell 5-HT in mucosal immunity. **Journal of Neuroimmunology**. v.146, p.46-49, 2003.

WANG, H.; STEEDS J.; MOTOMURA, Y. CD4+ T cell-mediated immunological control of enterochromaffin cell hyperplasia and 5-hydroxytryptamine production in enteric infection. **Gut**, v.56, p.949-957, 2007.

WATANABE, T.; CHIIHAZAWA, H.; CHUNGSAMARNYART, N.; FUJIOKA, T.; YAMADA, J. Serotonin-storing cells of the chicken duodenum: light, fluorescence and electron microscopy, and immunohistochemistry. **Cell and Tissue Research**, v.247, p.25-32, 1987.