

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

DÉLCIO EUSTÁQUIO DE PAULA JÚNIOR

**INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES GHS-R1a NAS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS E TÉRMICAS DIANTE DA ENDOTOXEMIA**

Alfenas/MG

2015

DÉLCIO EUSTÁQUIO DE PAULA JÚNIOR

**INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES GHS-R1a NAS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS E TÉRMICAS DIANTE DA ENDOTOXEMIA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva.

Alfenas/MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Paula Júnior, Délcio Eustáquio de.
Influência dos receptores GHS-R1a nas respostas
comportamentais e térmicas diante da endotoxemia. / Délcio
Eustáquio de Paula Júnior. -- Alfenas/MG, 2015.
76 f.

Orientador: Alexandre Giusti-Paiva.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade
Federal de Alfenas, 2015.
Bibliografia.

1. Grelina. 2. Comportamento de Doença. 3. Lipopolissacarídeo.
I. Giusti-Paiva, Alexandre. II. Título.

CDD-612

DÉLCIO EUSTÁQUIO DE PAULA JÚNIOR

INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES GHS-R1a NAS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS E TÉRMICAS DIANTE DA ENDOTOXEMIA

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia.

Aprovado em: 27/02/2015

Professor: José Alexandre Tomaz da Silva

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Professor: Maria Maurícia Bernardi

Instituição: UNIFAL-SP

Assinatura: 

Professor: Alexandre Gust. Paiva

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dedico este trabalho a Deus e a
minha família que sempre
serão a base de todas as minhas
conquistas.

AGRADECIMENTOS

À minha família; em especial ao meu pai, que por muitas vezes deixa de realizar seus próprios sonhos para realizar os meus. Mãe, irmãs, avós, obrigado pelo apoio incondicional, vocês me fazem vitorioso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas, por me formar mestre.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva, pela oportunidade e pelos inúmeros ensinamentos, que contribuíram para o meu crescimento.

Aos colegas de pós-graduação, pela partilha de conhecimento.

À Lidiane por estar sempre ao meu lado me dando conforto e apoio, um verdadeiro anjo na minha vida.

À Natália pelos inesquecíveis momentos vividos, por compartilhar angústias e alegrias. Após sete anos andando lado a lado, vai ser difícil acostumar com a sua ausência.

À Vanessinha, por ser tão prestativa, amiga e competente. Você me serve de inspiração.

Aos funcionários Marina, José, Antonieta e João por oferecerem seus trabalhos em prol da pesquisa.

À todos os que deram suas parcelas de contribuição, direta ou indireta, para a conclusão desta jornada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido.

E por fim, mas não menos importante, aos animais que doaram suas vidas para que esse trabalho se concretizasse.

Sê humilde; e o Senhor teu Deus
te conduzirá pela mão e dará
resposta a tuas orações.

Doutrina e Convênios 112:10

RESUMO

A endotoxemia por LPS, componente estrutural da parede celular de bactérias gram-negativas, é um modelo adequado para o estudo da resposta imune frente a uma invasão bacteriana. A administração desta toxina desencadeia uma rápida resposta imune que culmina na liberação de citocinas próinflamatórias e hormônios como a corticosterona. Conjuntamente à outros, estes mediadores são responsáveis pela expressão de um fenótipo doentio nos animais. Tal fenótipo envolve alterações comportamentais que juntas são denominadas comportamento doentio. Agentes moduladores da resposta inflamatória são capazes de gerar mudanças significativas nesse tipo de comportamento. A Grelina é um hormônio orexígeno, sintetizado principalmente no estômago, que apresenta ampla atuação em diversos tecido, sendo por isso considerada um hormônio multifuncional. Dentre suas funções já conhecidas pode-se citar seu efeito imunomodulador e ativador do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Frente a isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, em ratos *Wistar* machos, a influência da administração intracerebroventricular do antagonista dos receptores de Grelina (GHS-R1a) sobre o comportamento doentio, respostas termorregulatórias e ativação do eixo HHA em animais endotóxicos. Inicialmente conduziu-se um estudo para estabelecer a dose e o tempo pós-tratamento com LPS (2, 6 e 24 horas) apropriados para a realização dos testes de campo aberto, preferência à sacarose, ingestão alimentar e monitoramento da temperatura corporal. Os resultados demonstraram que as três doses testadas (200, 500 e 1000µg/Kg) foram capazes de evocar o comportamento doentio, e que ele se mostrou mais evidente 2h após a indução da endotoxemia. A seguir, avaliou-se os efeitos da infusão central do antagonista de grelina (20nmol/animal) em animais que receberam o LPS nos testes de campo aberto, preferência à sacarose, ingestão alimentar, os níveis de corticosterona sérica e a temperatura corporal foi monitorada. Os resultados demonstraram que a infusão central do antagonista dos receptores de Grelina reduz a expressão do comportamento doentio, uma vez que melhora todas as respostas comportamentais dos animais frente ao LPS. O uso do antagonista ainda foi capaz de reduzir os níveis séricos de corticosterona. Entretanto os resultados de monitoramento da temperatura corporal mostraram que o pré-tratamento com[D-Lys³]-GHRP-6 não é capaz de modificar a resposta febril decorrente da endotoxemia. Desta forma conclui-se que o antagonista dos receptores de Grelina exerce um efeito modulador central sobre o comportamento doentio, mas não é capaz de alterar a resposta febril evocada pelo tratamento com LPS.

Palavras-chave: Grelina. Comportamento doentio. Lipopolissacarídeo.

ABSTRACT

Endotoxemia is an appropriate model to study the immune response against bacterial invasion. The administration of this toxin triggers a rapid immune response that culminates in the release of proinflammatory cytokines and hormones, such as corticosterone. Along with others, these mediators are responsible for the expression of a sick phenotype in animals. This phenotype involves behavioral changes that together are called sickness behavior. Modulating agents of the inflammatory response are capable of generating significant changes in this type of behavior. Ghrelin is an orexigenic hormone mainly synthesized in the stomach that presents wide performance in several tissues and therefore, is considered a multifunctional hormone. Among its already recognized functions, we can mention its immunomodulatory and activator effect on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Therefore, the objective of the present study was to evaluate, in male *Wistar* rats, the influence of intracerebroventricular administration of ghrelin receptors antagonist over sickness behavior, thermoregulatory responses and HPA axis activation in endotoxic animals. For this purpose, these were submitted to the tests of open field, sucrose preference, food intake and social interaction, and had the serum corticosterone levels measured as well as the body temperature monitored. Prior to the study of Ghrelin effects on sickness behavior, a study was conducted to establish the best dose and the best post-treatment time to perform the test. The results of this first part of the work demonstrated that the three doses tested (200, 500 and 1000 μ g/Kg) are capable to evoke the sickness behavior, that shows itself more evident 2 hours after endotoxemia induction. The results of the second part of the work demonstrated that the central infusion of ghrelin receptors antagonist reduces expression of sickness behavior, as it improves all behavioral responses of animals against LPS. Use of the antagonist was also able to reduce serum corticosterone levels. However, body temperature monitoring results showed that pre-treatment with [D-Lys³]-GHRP-6 is not capable of modifying the febrile response due endotoxemia. Therefore, we conclude that ghrelin receptors antagonist plays a key modulatory effect on sickness behavior, but can not alter the febrile response evoked by LPS treatment.

Keywords: Ghrelin. Sickness behavior. Lipopolysaccharide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Formas pelas quais o hormônio de crescimento pode ser liberado pela glândula hipófise.....	23
Figura 2	Grelina acetilada.....	24
Figura 3	Efeito de diferentes doses de LPS sobre o comportamento no aparato de campo aberto, decorridas 2h da aplicação.....	39
Figura 4	Efeito de diferentes doses de LPS sobre o comportamento no campo aberto, após 6h da aplicação.....	40
Figura 5	Efeito de diferentes doses de LPS sobre o comportamento no aparato de campo aberto, decorridas 24h da aplicação.....	41
Figura 6	Efeito de diferentes doses de LPS sobre a porcentagem de preferência à sacarose, decorridas 2h (A), 6h (B) e 24h (C) da aplicação.....	42
Figura 7	Efeito do LPS nas doses de 200µg/Kg, 500 µg/Kg e 1000 µg/Kg sobre a ingestão alimentar ao longo de 24h.....	43
Figura 8	Efeito de diferentes doses de LPS sobre o tempo de interação social, após 2h (A), 6h (B) e 24h (C) da aplicação.....	44
Figura 9	Efeito da administração de LPS (i.p.) na variação da temperatura corporal bruta no decurso de 8h.....	45
Figura 10	Efeito da administração de LPS (i.p.) no delta de variação da temperatura corporal no decurso de 8h.....	45
Figura 11	Efeito de diferentes doses de LPS sobre os valores de índice térmico, calculados com base na área sobre a curva da variação de temperatura.....	46
Figura 12	Efeito do pré-tratamento com [D-Lys ³]-GHRP-6 e tratamento com LPS sobre os cruzamentos periféricos (A), centrais (B), totais (C) e número de <i>rearings</i> (D) no aparato de campo aberto.....	48
Figura 13	Efeito do pré-tratamento com [D-Lys ³]-GHRP-6 e tratamento com LPS sobre a porcentagem de preferência à sacarose.....	49

Figura 14	Efeito do pré-tratamento com [D-Lys ³]-GHRP-6 e tratamento com LPS sobre o tempo de interação social.....	50
Figura15	Efeito do pré-tratamento com [D-Lys ³]-GHRP-6 e tratamento com LPS sobre a ingestão alimentar no decorrer de 24h.....	51
Figura 16	Efeito do pré-tratamento com [D-Lys ³]-GHRP-6 e tratamento com LPS sobre a variação da temperatura corporal bruta no decurso de 8h.....	52
Figura 17	Efeito do pré-tratamento com [D-Lys ³]-GHRP-6 e tratamento com LPS sobre o delta de variação da temperatura corporal no decurso de 8h.....	53
Figura 18	Efeito do pré-tratamento com [D-Lys ³]-GHRP-6 e tratamento com LPS sobre os valores de índice térmico, calculados com base na área sobre a curda da variação de temperatura.....	54
Figura 19	Efeito do pré-tratamento com [D-Lys ³]-GHRP-6 e tratamento com LPS sobre a concentrações séricas de corticosterona.....	55

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ARQ	Núcleo Arqueado
bpm	Batimentos por minuto
cAMP	Adenosina monofosfatocíclica
CD14-MD2	Receptor de Macrófago
COX2	Cicloxygenase 2
CRF	Fator liberador de corticotrofina
DAMP	Padrão molecular associado à dano
GH	Hormônio do crescimento
GHSR1a	Receptor 1a secretagogo de GH
GOAT	Enzima acetiladora de grelina
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Oxido nítrico sintetase induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
mmHg	Milímetros de mercúrio
PAMP	Padrão molecular associado à patógenos
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
POA	Área pré-óptica
PVN	Núcleo paraventricular
SON	Núcleo supra-óptico
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TLR4	Receptor do tipo toll 4
UTI	Unidades de terapia intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	A SEPSE, O LPS E A ENDOTOXEMIA	13
1.2	COMPORTAMENTO DOENTIO	16
1.3	TERMORREGULAÇÃO E FEBRE	19
1.4	GRELINA.....	22
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL.....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	ANIMAIS	27
3.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	27
3.2.1	Estereotaxia	27
3.2.2	Testes comportamentais	28
3.2.2.1	Campo aberto.....	29
3.2.2.2	Interação social	29
3.2.2.3	Preferência à sacarose.....	30
3.2.2.4	Ingestão alimentar.....	31
3.2.3	Dosagem de corticosterona	31
3.2.4	Monitoramento da temperatura corporal	32
3.3	DROGAS.....	32
3.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
3.5	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	33
3.5.1	Efeito do LPS sobre as alterações comportamentais	33
3.5.1.1	Campo aberto.....	33
3.5.1.2	Interação social	34
3.5.1.3	Preferência à sacarose.....	34
3.5.1.4	Ingestão alimentar.....	34
3.5.1.5	Telemetria.....	35
3.5.2	Efeito da administração do antagonista nas alterações comportamentais decorrentes da injeção de LPS	35
3.5.2.1	Campo aberto.....	35
3.5.2.2	Interação social	36
3.5.2.3	Preferência à sacarose.....	36
3.5.2.4	Ingestão alimentar.....	36
3.5.2.5	Dosagem de corticosterona.....	36
3.5.2.6	Telemetria.....	37
4	RESULTADOS	38

4.1	EFEITO DO LPS NO TESTE DE CAMPO ABERTO, PREFERÊNCIA À SACAROSE, INGESTÃO ALIMENTAR E INTERAÇÃO SOCIAL.....	38
4.2	EFEITO DO LPS SOBRE A TEMPERATURA CORPÓREA	44
4.3	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO ANTAGONISTA [D-Lys ³]-GHRP-6 NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DECORRENTES DA INJEÇÃO DE LPS	46
4.3.1	Campo aberto	47
4.3.2	Preferência à sacarose	48
4.3.3	Interação social	49
4.3.4	Ingestão alimentar	50
4.3.5	Temperatura corporal	51
4.3.6	Corticosterona sérica	54
5	DISCUSSÃO	56
5.1	INFLUÊNCIA DO LPS NO COMPORTAMENTO DOENTIO E NA TEMPERATURA CORPORAL.....	56
5.2	INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES GHSR-1a NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E TÉRMICAS FRENTE A ENDOTOXEMIA POR LPS	59
6	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

Nos tópicos apresentados abaixo encontra-se uma introdução, com base em revisão da literatura acerca do tema discutido no trabalho. Tal revisão permitirá ter uma visão geral do assunto, proporcionando um melhor entendimento.

1.1 A SEPSE, O LPS E A ENDOTOXEMIA

A Sepsé é uma síndrome clínica em que infecção e inflamação sistêmica estão presentes concomitantemente (ZARDI et al., 2007). Esta síndrome é responsável por altas taxas de morbidade, mortalidade e ônus econômicos em todo o mundo. Estima-se que sejam registrados, por ano, 751 mil casos de sepsé nos Estados Unidos (JANDA et al., 2010). Mesmo representando apenas 10% do total de pacientes admitidos em unidades de terapia intensiva (UTI), a sepsé se responsabiliza pela maioria dos óbitos registrados nestas unidades. Cerca de 30% dos casos de sepsé culminam em morte, mesmo existindo uma vasta gama de antibioticoterapia. Os gastos decorrentes do tratamento de tal quadro patológico geram despesa anual em torno de 16 bilhões de dólares. A tríade formada pelas doenças cardiovasculares, o câncer e a sepsé é a maior causadora de morte nos Estados Unidos. (JANDA et al., 2010; KEEGAN e WIRA III, 2014). Mundialmente falando, a síndrome mata 1000 pessoa a cada hora, fato que faz dela um imenso problema de saúde pública (REINHART et al., 2013).

Os dados epidemiológicos relacionados à sepsé no Brasil são escassos, e os existentes são desatualizados, mas mesmo assim nos permitem ter noção da gravidade da síndrome. Em 2006, Junior J.A.L.S. e colaboradores publicaram um estudo que envolveu 65 hospitais em todas as macrorregiões brasileiras. No período de 1 mês foram identificados 3128 pacientes com sepsé. A mortalidade global chegou a 46,6%, porcentagem que aumenta quando se considera a taxa de mortalidade entre os pacientes diagnosticados com choque séptico, a manifestação mais grave da síndrome. Os autores na conclusão de seu trabalho ainda tecem um paralelo entre dados brasileiros e internacionais e apontam que, no Brasil, a mortalidade em decorrência do choque séptico é maior, ademais, pacientes sépticos brasileiros permanecem mais tempo

internados em decorrência da doença, o que nos leva a concluir que em nosso país a síndrome gere um ônus econômico ainda maior do que a média internacional.

Em 1991, ocorreu em Chicago uma conferência que tinha como objetivo oferecer uma definição prática da resposta inflamatória a infecção. Nela a expressão Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) foi proposta para descrever a reação a inflamatória desencadeada pelo organismo frente a qualquer agressão, seja ela infecciosa ou não. O termo sepse foi proposto para definir uma situação de resposta inflamatória sistêmica do organismo frente a um estímulo infeccioso, que deve necessariamente incluir a presença de dois ou mais sintomas clínicos, dentre os quais podemos citar: temperatura corporal maior que 38°C ou menor que 36°C, frequência respiratória maior que 20 movimentos por minuto ou pCO₂ menor que 32mmHg, frequência cardíaca maior que 90bpm, leucocitose (> 12.000 células/mm³), leucopenia (< 4.000 células/mm³) e presença de células imunitárias na periferia superior a 10% (SALLES, 1999).

A resposta inflamatória sistêmica frente a agressores infecciosos tem seu início com o reconhecimento de produtos microbianos, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a dano (DAMPs), por parte de leucócitos e outras células imunológicas. Em seguida tem-se produção de mediadores inflamatórios que atingem a circulação sanguínea podendo levar à falência de órgãos e até a morte do paciente (JANDA et al., 2010). Embora durante a sepse exista a presença de um agente patogênico, são as respostas imunológicas do hospedeiro que determinam o curso da infecção, de modo que uma resposta deficiente pode gerar danos aos tecidos normais (ZARDI et al., 2007). As bactérias gram-negativas são os microrganismos mais comumente identificados em culturas de pacientes sépticos, embora a sepse possa também ser causada por bactérias gram-positivas, fungos e vírus (Ramachandran, 2014).

Os padrões moleculares capazes de ativar o sistema imune variam de acordo com o microrganismo, por exemplo, um indivíduo sob uma infecção fúngica tem seu sistema imune ativado pela presença do Zymosan, uma β-glucana presente na parede celular quitinosa dos fungos; no caso de infecções bacterianas a resposta imune é evocada após o reconhecimento do ácido teicoico ou lipopolissácrídeo (LPS), componentes estruturais das membranas esqueléticas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente.

Por ser um constituinte externo da parede celular de bactérias negativas na coloração de Gram, o LPS é facilmente reconhecido por células imunes principalmente

macrófagos. Estruturalmente esta toxina é constituída por uma unidade glicídica associada ao lipídio A, sendo este altamente conservado nas bactérias, uma vez que é o centro biologicamente ativo da molécula e o responsável pelos seus efeitos. Devido à sua apolaridade, na corrente sanguínea, o LPS é transportado por lipoproteínas de alta densidade (HDL), sendo a formação do complexo HDL-LPS fator importante na modulação da resposta imunológica. (FREUDENBERG et al., 2001)

Após ser reconhecidos pelos receptores Toll-like 4 (TLR4) presente na superfície de células apresentadoras de antígenos (monócitos e macrófagos), o LPS torna-se um potente estimulador da liberação de mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas, histamina e serotonina (KELMER, 2009); e também de citocinas tais como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina6 (IL-6) e interleucina 1 β (IL1 β); é ainda capaz de estimular a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e a ciclooxigenase 2 (COX 2) (NISHIO et al., 2013). A liberação destes mediadores, por diversas vias, leva sinais para o cérebro, que alcançam direta ou indiretamente neurônios e células de apoio (micróglia e astrócitos) que promoverão alterações no sistema nervoso autônomo e endócrino regulando a resposta do indivíduo à infecção (MARTIN et al., 2013).

No âmbito molecular o LPS tem a capacidade de se ligar a LPB, que o transfere para um receptor na membrana dos macrófagos (CD14-MD2), que por sua vez transfere o sinal para dentro da célula através de um receptor Toll-like (TLR4). Uma vez ativado o TLR4 ativa um série de genes responsáveis por estimular a produção de mediadores da inflamação, desencadeando um processo inflamatório agudo capaz de lesar vários órgãos e provocar a morte (KELMER, 2009).

O interesse no entendimento das respostas desencadeadas pela ativação do sistema imune é antigo, o que fez surgir muitos modelos experimentais para o estudo deste quadro de ativação imunológica (CHAUDRY, 1999). Os primeiros envolviam a administração de grandes doses de endotoxina e bactérias vivas em animais (DEITCH, 1998; LAGOA et al., 2004). Na atualidade, o uso de modelos que envolvem a ligação e perfuração cecal são bastante utilizados para mimetizar alguns aspectos da sepse, no entanto, estes modelos são imperfeitos, uma vez que a amplitude da resposta pode variar bastante de um animal para outro, tendo em vista que não tem-se o controle da quantidade de bactérias que ganham a cavidade peritoneal (DEITCH, 1998). Neste contexto, o emprego de endotoxinas em doses moderadas, tem sido vastamente empregado para examinar uma ampla gama de respostas homeostáticas, cardiovasculares, respiratórias e comportamentais que se desenvolvem nas respostas

inflamatórias agudas (CATANIA; SUFFREDINI; LIPTON, 1995; HESSE et al., 1988; KUMAR et al., 2004; MICHIE et al., 1988; PAJKRT et al., 1996; PREAS et al., 2001; SUFFREDINI et al., 1989; SUFFREDINI et al., 1992; SUFFREDINI; HARPEL; PARRILO, 1989; VON DER MOHLEN et al., 1995)

As modificações comportamentais decorrentes da resposta de fase aguda, frente a patógenos microbianos, já são estudadas há muitos anos e os da década de 90 foram importantes para o melhor entendimento de tais modificações. Neste sentido, pesquisadores como Johnson et al. (1993) deram grandes contribuições científicas para a área. Estes pesquisadores conseguiram demonstrar que o LPS administrado intraperitonealmente (IP), em pássaros, possuía a capacidade de diminuir a ingestão de alimentos, aumentar a sonolência, diminuir as concentrações plasmáticas de ferro e zinco, e elevar a concentração plasmática de corticosterona. Além de administrar o LPS intraperitonealmente, a administração intracerebroventricular (i.c.v.) também foi realizada para verificar se alguns dos efeitos citados anteriormente poderiam ser mediados centralmente. Com isso, eles observaram que haviam diferenças nas respostas desencadeadas e chegaram à conclusão que a magnitude destas respostas dependiam do local de atuação do LPS, central ou periféricamente.

Em modelos murinos a injeção intraperitoneal de LPS é associada há vários anos com alterações fisiológicas como a febre e comportamentais tais como hipofagia, redução no comportamento sexual e social, bem como reduzida preferência a sacarose (O'REILLY, VANDER; KLUGER, 1988; YIRMYA, 1996).

1.2 COMPORTAMENTO DOENTIO

A invasão por micróbios geralmente produz sintomas comportamentais inespecíficos, dentre os quais estão o aumento do sono de ondas lentas, mal-estar, perda de interesse em atividades diárias, redução da ingestão de alimentos, piloereção, postura corporal curvada (cifose), tremores, anorexia, adipsia, diminuição do comportamento exploratório, menor interação social e perda do apetite sexual (AUBERT, 1999). A este conjunto de manifestações comportamentais dá-se o nome de comportamento doentio, que parece ser parte de uma estratégia evocada para poupar energia (DANTZER et al., 1991; PENCCHI et al., 2009). Hart (1988) sinaliza que o aparecimento do

comportamento doentio é uma resposta adaptativa do animal que o ajuda a combater a infecção, na medida em que cria um ambiente desfavorável ao patógeno, porém mais propício para o estabelecimento de uma resposta imune eficaz.

Estas respostas comportamentais surgem em decorrência de uma complexa interação entre sistema imune e endócrino, na qual diversas moléculas têm papel de destaque como PGE₂, cicloxigenase, óxido nítrico e principalmente citocinas (DANTZER, 2009; DE PAIVA et al.; 2010; KELLY et al., 2003; RIBEIRO et al., 2013; TEELING et al., 2010;).

A liberação periférica de citocinas pode alcançar diretamente o cérebro através dos órgãos circunventriculares, e lá desencadear respostas adaptativas, ou podem lançar mão de sistemas de sinalização indiretos por meio de nervos periféricos; como vago, glossofaríngeo e hipoglosso; podem ainda interagir com células endoteliais e perivasculares que levarão à ativação de células do sistema nervoso, como micróglias, capazes de produzir citocinas centralmente. A produção destas citocinas aliada a uma maior síntese de prostaglandinas leva ao aparecimento do comportamento doentio (BANKS; ERICKSON, 2010; MCCUSKER, KELLEY, 2013; SERRATS; SAWCHENKO, 2009).

O comportamento doentio pode ser facilmente induzido e estudado em animais de laboratório através da administração intraperitoneal de agentes infecciosos ou endotoxinas. Em 1979, Murray e Murray observaram um clássico componente do comportamento doentio, a anorexia, ao administrar bactérias vivas no peritônio de camundongos. Atualmente, no meio científico, existem vários e eficazes métodos para avaliação do comportamento doentio em ratos, dentre eles podemos citar o teste de campo aberto, interação social, preferência à sacarose e ingestão de alimento.

O teste de campo aberto é um teste popular de avaliação da motivação locomotora em modelo animal, no qual a atividade exploratória é observada, devido a uma natural tendência de exploração de novos ambientes vista em roedores (PRUT; BELZUNG, 2003).

Há mais de 30 anos atrás File e Hyde (1978) desenvolveram o primeiro teste de avaliação de estados doentios que usa fontes etologicamente relevantes e lança mão de um comportamento naturalmente exibido pelo animal; a esse teste deu-se o nome de teste de interação social. Neste a variável analisada é o tempo gasto pelo animal interagindo com outro de sua espécie (limpar, cheirar, morder, imitar, seguir ou apresentar comportamento sexual em relação ao outro). Vários fatores podem alterar a

resposta de roedores ao teste, desde fatores fisiológicos até externos relacionados ao ambiente de experimentação. É possível encontrar na literatura trabalhos mostrando que a interação social é mais elevada quando os ratos são testados numa arena com a qual estão familiarizados e, iluminada por luz baixa. Desde sua criação foram feitas diversas tentativas de validá-lo comportamental, fisiológica e farmacologicamente, que revelaram como sendo este um teste sensível até mesmo a mudanças na ansiedade, geradas por meios não farmacológicos (FILE E SETH, 2003). Hennessy et al, (2014) destaca que existe uma complexa relação entre o comportamento social e o comportamento doentio, de modo que este pode tanto inibi-lo quanto exacerbá-lo.

Em determinadas situações os roedores podem exibir um estado anedônico, a infecção é uma delas. O termo anedonia foi cunhado pelo psicólogo francês Théodule Ribot (1896) para designar uma completa ausência de prazer. Atualmente o conceito se refere a uma incapacidade e/ou vontade reduzidas para realização de tarefas prazerosas como ingerir alimentos, exibir comportamento sexual, dentre outros (D'HAENEN, 1996).

Testes que avaliam a motivação para a alimentação e o teste de preferência à sacarose são tidos como métodos capazes de avaliar anedonia. Animais anedônicos reduzem tanto a ingestão de alimento quanto a preferência à sacarose (MARTYNHAK et. al., 2011; SONCINI et al., 2012).

Respostas comportamentais, bem como fisiológicas podem ser desencadeadas em situações de estresse. Dentre as respostas fisiológicas pode-se citar a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). A corticosterona, um hormônio sintetizado por células do córtex das glândulas adrenais é liberado em resposta a ativação do eixo HHA em situação de estresse, como por exemplo, o estresse imunológico gerado pelo LPS (YIRMYA, 1996). Estudos demonstram que os níveis deste hormônio encontram-se elevados em ratos expostos a novas situações, incluindo os testes usados para avaliação do comportamento doentio como a interação social e o campo aberto (FILE et al., 1993).

O LPS é capaz de aumentar os níveis plasmáticos de corticosterona por meio, principalmente, da liberação de interleucina-1 (IL-1). A IL-1 induz a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que age no córtex da adrenal promovendo a secreção de corticosterona. No hipotálamo, citocinas como IL-1 também estimulam a liberação do fator liberador de corticotrofina (CRF) (JOHNSON, 1993).

As alterações comportamentais que surgem na endotoxemia são essenciais para a sobrevivência do animal, bem como as respostas termorregulatórias que levam à febre, tendo em vista a criação de um ambiente desfavorável ao patógeno e o aumento da eficácia da resposta imune (MOLTZ, 1993). A febre potencializa a imunidade inata, fazendo aumentar a capacidade fagocítica de neutrófilos, e também a imunidade adaptativa, induzindo a proliferação de linfócitos e aumentando a produção de anticorpos (KLUGER, 1986). A ocorrência da febre foi descrita em praticamente todos os grupos de vertebrados (BURNS et al., 1996; MONAGAS; GATTEN, 1983; HUTCHISON; ERSKINE, 1981; KLUGER, 1991; KLUGER et al., 1977; LANG, 1987; MACARI et al., 1993; MYHRE et al., 1977) e também em invertebrados (KLUGER, 1991), o que sinaliza uma seleção evolutiva da mesma, demonstrando ser ela uma importante resposta de defesa do hospedeiro em situações infecção (KLUGER, 1991).

1.3 TERMORREGULAÇÃO E FEBRE

Praticamente todas as aves e mamíferos são capazes de manter sua temperatura interna constante ao longo de uma gama relativamente grande de temperatura ambiente, capacidade esta que os coloca dentro do grupo dos animais homeotérmicos. A termorregulação é vital para manutenção da funcionalidade normal das células, uma vez que a atividade enzimática apresenta forte dependência térmica. Temperaturas elevadas ($> 42^{\circ}\text{C}$) desnaturam proteínas, fazendo com que elas percam sua função e levem a célula à morte, enquanto que as baixas temperaturas ($< 36,1^{\circ}\text{C}$) provocam uma acentuada queda no metabolismo celular e diminuem a demanda energética (GORDON, 2012; KUHT; FARMERY, 2014). Um conjunto de processos termorregulatórios é necessário para manter a temperatura do corpo dentro de estreitas faixas homeostáticas. A temperatura corporal central só pode ser mantida constante se a absorção e a produção de calor são compensadas pela perda do mesmo (GILBERT et al., 2004). Alterações autonômicas e comportamentais tornam possível este tipo de regulação (BICEGO et al., 2007).

A homeostasia térmica está sob comando de uma gama de estruturas neurais, dentre as quais podemos citar o hipotálamo, sistema límbico, troncocerebral, a formação reticular, medula espinhal e gânglios simpáticos (BOULANT, 2000).

Dentre as estruturas participantes da termorregulação o hipotálamo é a de maior destaque. Situado na parede do terceiro ventrículo, essa estrutura diencefálica contém os mais importantes receptores de temperatura central, contudo termorreceptores espinhais, viscerais, vasculares e cutâneos também são de grande importância na regulação da temperatura, pois são responsáveis pelas aferências térmicas periféricas (KUHT; FARMERY, 2014).

Variações na temperatura do ambiente externo são percebidas por termorreceptores periféricos presente na pele. Estes termorreceptores são de dois tipos, os receptores frios que são maximamente ativados por temperaturas menores que 25°C e os quentes que são disparados por temperaturas elevadas. As aferências térmicas periféricas são conduzidas ao sistema nervoso central por meio do trato espinotalâmico, que as levam, em última instância, até a área pré-óptica hipotalâmica (POA) (KUHT; FARMERY, 2014).

O hipotálamo estabelece o “*setpoint*” termorregulatório, que é tido como o valor de temperatura corporal aceitável em determinada circunstância; variações de $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ no *setpoint* geram respostas compensatórias no sentido de perder ou ganhar calor (WEELEER, 2006). Alterações neste termostato fisiológico podem ocorrer no sentido de aumentar de forma regulada a temperatura corporal, causando febre, ou diminuí-la, gerando um quadro de anapirexia.

A febre configura uma das mais antigas manifestações clínicas de doença em animais (HEART, 1988). Ela geralmente ocorre em resposta a uma infecção, inflamação ou trauma; e é considerado o componente mais proeminente de uma resposta complexa do hospedeiro à agentes invasores, chamada de resposta de fase aguda. Além do mais, parece ter grande o valor adaptativo tendo em vista que, experimentalmente e também clinicamente, a taxa de mortalidade de animais, incluindo seres humanos, infectados por vírus ou bactérias, impedidos de desenvolver uma resposta febril devido ao uso de fármacos antipiréticos, é bem maior quando comparados com animais capazes de desencadear a febre diante da infecção (KLUGER, 1986). Esta relação positiva entre a febre a sobrevivência se deve ao fato que o aumento da temperatura corporal cria um ambiente desfavorável para o patógeno, contudo, propício para o estabelecimento de uma resposta imune mais eficaz (MOLTZ, 1993).

A resposta febril tem sua complexidade atribuída aos seus efeitos sobre múltiplos sistemas como endócrino, neurológico, imunológico. Além de um aumento regulado da temperatura corporal, a febre, também é acompanhada por vários

comportamentos doentios, alterações metabólicas e fisiológicas (OGOINA, 2011). Contudo, o termo febre não deve ser confundido com hipertermia, a febre é um aumento da temperatura que ocorre em resposta a um agente invasor, enquanto a hipertermia refere-se a um aumento na temperatura em decorrência de um ganho de calor superior a capacidade de dissipação.

O desenvolvimento da hipertermia está em dependência da temperatura ambiente, ao passo que a febre se desenvolve em qualquer temperatura. As diferenças entre estas situações patológicas são tão evidentes que podem ser vistas comportamentalmente. Indivíduos febris preferem ambientes quentes, ao contrário dos hipertérmicos que buscam por ambientes frios no intuito de facilitar a irradiação de calor para o meio externo (BLATTIES, 2006).

A resposta febril está associada a ação de pirógenos (endógenos ou exógenos), moléculas capazes de desencadear a febre. Na maioria das vezes os pirógenos exógenos são provenientes de microrganismos como vírus, bactérias, fungos e outros parasitas (ZEISBERGER, 1999). Os endógenos compreendem proteínas termossensíveis e mediadores lipídicos, sendo sua produção geralmente estimulada pela presença de pirógenos exógenos, além de lesões, traumas e estresse. As citocinas, prostaglandinas e endotelina formam um importante grupo de pirógenos endógenos (ROTH E SOUZA, 2001).

A administração sistêmica de LPS é uma ferramenta antiga utilizada para avaliar uma grande variedade de alterações fisiológicas incluindo a febre. Na atualidade o LPS é o pirógeno exógeno mais estudado, sendo utilizado na obtenção da maioria dos dados atuais relacionados a resposta febril (OGOINA, 2011).

O LPS medeia a liberação de citocinas por células imunológicas e estas serão responsáveis por induzir, por vias neurais ou humorais, a produção de prostaglandinas, em especial a prostaglandina E₂ (PGE₂), responsável pela ativação de neurônios termossensíveis, na POA, gerando o estado febril (BLATTEIS, 2006). Existem basicamente quatro vias pelas quais as citocinas sinalizam sua presença na corrente sanguínea. Estas podem ser transportadas para o cérebro através de transportadores específicos presentes na barreira hematoencefálica ou passar para o cérebro por intermédio dos órgãos circumventriculares, podem induzir a produção de prostaglandinas na interface entre o cérebro e a corrente sanguínea e ainda podem fazer sinalização por intermédio da ativação de nervos periféricos (ENGBLOM et al, 2002).

Além das prostaglandinas, alguns hormônios, como o hormônio do crescimento, prolactina e grelina se mostram capazes de interferir nas respostas imunológicas (DIXIT, 2004; GALA, 1991; KELLY, 1990). Dixit e Taub em sua revisão publicada em 2005 dão enfoque ao recém descoberto efeito imunomodulador da grelina e a sinalizam como um novo e importante jogador no velho campo das estreitas relações entre os sistemas endócrino e imune.

1.4 GRELINA

A etimologia da palavra grelina nos remete a palavra *Ghrelin* sendo que esta resultou da união das palavras que compõem a expressão *growth hormone release*, que se relaciona com a primeira função atribuída a este hormônio, ligante endógeno dos receptores GHS-R1a (*growth hormone secretagogue receptor 1a*), que se localizam tanto no sistema nervoso central quanto em tecidos periféricos, cuja ativação resulta na liberação do hormônio do crescimento pela glândula hipófise (GNANAPAVAN et. al., 2002; KOJIMA et. al., 2001).

Em 1999, Kojima e colaboradores relataram o descobrimento do ligante endógeno dos receptores GHSR-1a, que estimulam a liberação do hormônio do crescimento (GH) pela hipófise. Este ligante foi purificado de estômago de ratos e recebeu o nome de GHrelín, sendo que a palavra grelina é o termo aportuguesado. A grelina é um peptídeo composto por 28 aminoácidos e possui duas formas, a acetilada (serina 3 octanoilada) e a não acetilada, sendo a forma acetilada capaz de induzir a liberação de GH pela hipófise, mostrando que a regulação deste hormônio não é feita somente pelo hipotálamo, mas também pela grelina (HOSODA et al., 2000; KOJIMA et. al., 1999).

Antes da descoberta da grelina, os receptores GHS-R1a eram chamados de órfãos pelo fato de não se conhecer seu ligante endógeno, porém já era claro que substâncias exógenas, como a hexarelina, eram capazes de se ligar a eles. Grelina e hexarelina induzem a liberação de GH por meio da interação com os receptores GHSR1a, que usam a adenosina monofosfato cíclica (AMPC) e cálcio como segundos mensageiros (KOJIMA et al., 2001).

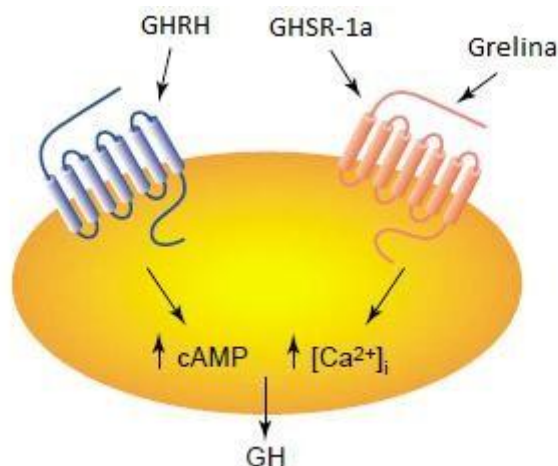


Figura 1- Forma pelas quais o hormônio de crescimento pode ser liberado pela glândula hipófise.
 Nota: GHRH (hormônio estimulador da liberação de GH) e o ligante endógeno (Grelina) dos receptores GHS-R1a, agem sobre as células da pituitária anterior aumentando os níveis intracelulares de cálcio intracelular (Ca^{2+}).
 Fonte: KOJIMA et. al., 2001

O gene responsável por codificar a grelina humana encontra-se no cromossomo 3p25-26 (SMITH et al., 1997). Quando transcrito e traduzido codifica a pré-pro-grelina, um peptídeo de 117 aminoácidos, que é clivada em pro-grelina. Subseqüentes alterações pós-traducionais dão origem a grelina acetilada.

A grelina acetilada corresponde a forma capaz de interagir com os receptores GHS-R1a, isso porque ela possui uma modificação pós-traducional n-octanoica no resíduo 3 de serina (Figura 3), importantíssima para o desempenho de suas funções, pois sem ela a grelina não é capaz de ultrapassar a barreira hemato-encefálica (KOJIMA et. al., 1999; KOJIMA et. al., 2001). A reação de acetilação da grelina é catalisada pela enzima grelina O-acetiltransferase (GOAT) (YANG et al., 2008).

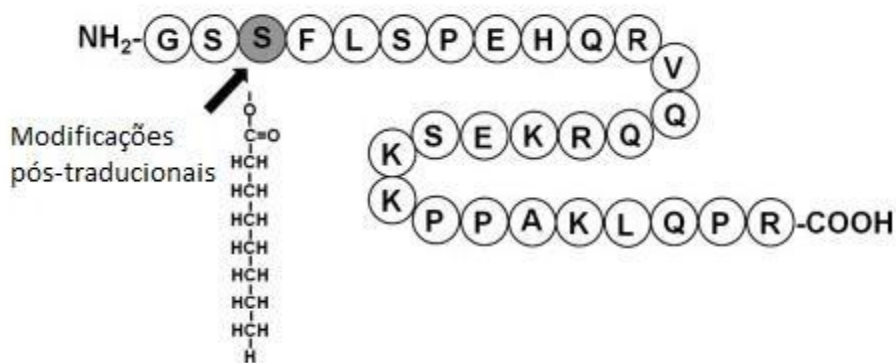


Figura 2- Grelina acetilada.

Nota: Depois de traduzida a grelina sofre uma modificação pós-traducional que insere, no resíduo de serina 3, um ácido graxo de seis carbonos, tal modificação é mediada pela GOAT.

Fonte: KING et. al., 2013

A grelina é produzida principalmente pelas células oxínticas do estômago, porém expressiva síntese do hormônio pelo hipotálamo já foi reportada na literatura, o que justifica a intensa presença dos receptores de grelina em importantes áreas cerebrais hipotalâmicas como núcleo paraventricular (PVN), núcleo supra-óptico (SON) e núcleo arqueado (ARQ), e extra hipotalâmicas como tálamo, córtex, hipocampo e hipófise (GARCÍA-GARCÍA et. al., 2014; HOWARD et al, 1996).

Desde 1999 foi atribuída a grelina uma multiplicidade de funções fisiológicas, sendo que as mais notáveis são sua influência no metabolismo energético e seu papel estimulador do apetite, sendo por isso alcunhada de “hormônio da fome” (KING et. al., 2013). Descobertas recentes conferem a ela funções peculiares, que vão desde induzir a ingestão alimentar e diminuir o gasto energético, até o controle da pressão arterial e a regulação o ciclo sono-vigília (GARCÍA-GARCÍA et al., 2014; STOYANOVA et al., 2014; VLASOVA; JÄRVINEN; HERZIG, 2009).

Em razão de se mostrar como um importante hormônio na manutenção da homeostasia, intensas pesquisas vem sendo feitas em outros campos no sentido de elucidar a ampla gama de processos fisiológicos nos quais ela estaria envolvida, além de seu papel metabólico, o que é extremamente relevante, uma vez que ela está presente em todos os vertebrados, resguardando, porém, diferenças bioquímicas e fisiológicas de acordo com o táxon estudado (KAIYA et al., 2008).

Em meio aos mais diversos artigos sobre os diferentes papéis da grelina destaca-se sua atuação sobre o sistema imune. Hattori e seus colaboradores em 2001 afirmaram pela primeira vez que todas a células do sistema imunológico são capazes de expressar

tanto grelina quanto os receptores GHSR-1a. Decorrida mais de uma década após esta descoberta pode-se afirmar que a presença destes receptores em componentes celulares de sistema imune não é casual. Em 2011, Soriano e coautores associaram a administração i.p. de grelina com a redução da febre endotóxica. A grelina exerce papel imunomodulador, fazendo com que as células imunológicas liberem quantidades menores de citocinas (WANG et al., 2009). Waseem et al. (2008) observaram que macrófagos murinos, pré-tratados com grelina, liberavam menos citocinas pró-inflamatórias quando em contato com o LPS.

Desde a descoberta da grelina seu o envolvimento na modulação dos mais diversos tipos de comportamento animal estão sendo estudado, contudo, os resultados são ainda pouco conclusivos haja vista que, por vezes, se mostram divergentes. Lutter e seus colaboradores no ano de 2008 demonstraram que ambas, a restrição calórica e a injeção subcutânea de grelina foram capazes de reduzir os comportamentos tipo ansioso e tipo depressivo de camundongos submetidos aos testes de labirinto em cruz elevado e nado forçado, respectivamente. O observaram ainda níveis persistentemente elevados de grelina plasmática nos animais expostos ao paradigma de estresse crônico por isolamento social. Em contrapartida, a administração crônica e central de grelina, em ratos, gera sintomas relacionados a ansiedade e depressão, tais como menor locomoção em campo aberto e maior tempo de imobilidade em nado forçado; tal como demonstrado por Hansson et al., 2011. Em humanos dados da literatura associam o polimorfismo no gene codificador da grelina com a depressão mas não com desordens de humor relacionadas ao pânico (NAKASHIMA et al., 2008). Além dos supracitados, existem vários outros dados na literatura nos permitem visualizar a existência de controvérsias quanto aos efeitos da grelina sobre o comportamento.

Diante do papel imunomodulador da grelina e seu envolvimento, ainda pouco elucidado, na manifestação de diversos comportamentos animais, o presente estudo ganha relevância uma vez que teve como objetivo relacionar o papel da grelina na exibição do comportamento doentio exibido durante ativação do sistema imunológico por meio da administração de LPS.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo seguem descritos abaixo.

2.1 OBJETIVO GERAL

O intuito do presente trabalho foi verificar a participação dos receptores GHS-R1a na modulação do comportamento doentio (*sickness behavior*), induzido pela endotoxemia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a menor dose de LPS (200, 500 ou 1000 µg/Kg) eficaz e o melhor tempo (2, 6 ou 24 horas após a aplicação) que sejam capazes de induzir nos animais alterações comportamentais nos testes de campo aberto, interação social, preferência à sacarose e ingestão de alimento;
- b) Verificar a participação dos receptores GHS-R1a como agente modulador do *sickness behavior*, através dos testes de campo aberto, interação social, preferência à sacarose e ingestão de alimento;
- c) Avaliar a participação dos receptores GHS-R1a na febre induzida pelo LPS;
- d) Verificar participação dos receptores GHS-R1a na ativação do eixo HHA, decorrente da administração de LPS, através da dosagem de corticosterona plasmática.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos empregados no presente trabalho encontram-se descritos abaixo.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar*, na idade adulta, com massa corporal variando entre 250 e 300g; provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas. Após saída do Biotério Central os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno e mantidos no Biotério setorial, situado no laboratório de Fisiologia. Enquanto no Biotério setorial os animais foram submetidos a ciclo claro-escuro de 12h (com luzes sendo acesas às 7h e apagadas às 19h), e a temperatura foi mantida a 23°C (com variação de 2°C pra mais ou pra menos) (COSTA et al., 2013).

Os animais receberam ração comercial peletizada e água *ad libitum*, ressalvando os casos em que o protocolo experimental preconizava o contrário. É válido salientar que cada animal foi utilizado em apenas um teste experimental, sendo ao final submetidos a eutanásia por decapitação ou inalação de anestésico de acordo com a pertinência.

O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética de uso animal da Universidade Federal de Alfenas, com número de protocolo 541/2013.

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os itens 3.2 descrevem, de forma minuciosa, os procedimentos experimentais utilizados na condução deste estudo.

3.2.1 Estereotaxia

Com finalidade de permitir o acesso e canulação do ventrículo lateral os animais anestesiados tiveram a cabeça imobilizada por meio de fixação em três pontos, mandíbula e orifícios auditivos direito e esquerdo. Uma incisão de aproximadamente 1,5 cm foi feita no tecido epitelial e subcutâneo, aquele previamente tricotomizado, para possibilitar acesso a abóboda craniana.

O bregma, ponto onde a sutura sagital encontra perpendicularmente a sutura coronal, foi tido como referência para acesso ao ventrículo lateral. A superfície craniana foi limpa com água oxigenada 10% (v/v), dando uma maior nitidez ao ponto de encontro entre as suturas.

A matéria prima para confecção das cânulas, que mediam 10 mm, foi agulha hipodérmica estéril com 6 mm de diâmetro.

O acesso ao ventrículo lateral foi permitido usando as coordenadas presentes no atlas "*The Rat Brain*", de Paxino e Watson (1998): -0,5 mm posterior, -1,5 mm lateral e 3,7 mm ventral, tendo como ponto zero o bregma.

Para fixação da cânula e fechamento da incisão foi utilizado acrílico odontológico polimerizável capaz de formar uma espécie de capacete no local. Para evitar que o capacete de acrílico se descolasse do crânio do animal, dois parafusos de 5mm foram fixados nos ossos parietais direito e esquerdo, para servirem de suporte.

Instantes antes do início da cirurgia administraram-se nos animais 0,02 mL de antibiótico veterinário (Pentabiótico) por via intramuscular e 0,1mL de anti-inflamatório (Cetoprofeno) por via subcutânea.

Após a cirurgia os animais foram alocados individualmente em caixas de acrílico de formato retangular (30cm x 19,5cm x 12cm), onde permaneceram de 6 a 7 dias para que pudessem se recuperar do procedimento cirúrgico.

Ao final dos experimentos foi verificado o posicionamento correto da cânula através da infusão de 5µL do corante azul de Evans (2%). A visualização do corante no terceiro ventrículo sinalizava que o procedimento cirúrgico foi bem sucedido. Os animais que não tiveram o terceiro ventrículo corado não foram incluídos nas análises estatísticas.

3.2.2 Testes comportamentais

Seguem descritos, a seguir, os procedimentos experimentais concernentes aos testes comportamentais utilizados na avaliação do comportamento doentio.

3.2.2.1 Campo aberto

Para execução do teste de campo aberto os animais foram colocados em uma arena circular de acrílico, com 60 cm de diâmetro e paredes com altura de 50 cm. O piso da arena apresentava-se dividido em áreas, sendo 8 periféricos (próximos a parede do aparato) e 4 centrais. Cada animal foi colocado na região central do campo aberto e seu comportamento registrando através de filmagem no decorrer de 5 minutos. Após cada filmagem a arena foi higienizada com etanol 10% antes de ser introduzido um novo animal.

Na noite anterior ao teste os animais eram colocados na sala de experimentação para que se habituassem ao novo ambiente.

Os vídeos foram analisados e procedeu-se a quantificação do número de cruzamentos com as quatro patas na área central e periférica, além do número de *rearings*, comportamento de exploração vertical. Foi considerado cruzamento periférico a entrada do animal com as quatro patas em alguma das oito áreas periféricas e cruzamentos centrais quando o animal entrou com as quatro patas nas áreas centrais. Quantificaram-se como *rearings* os eventos em que o animal se manteve em posição bípede sobre as duas patas traseiras (SWIERGIEL; DUNN, 2007).

3.2.2.2 Interação social

O teste de interação social consistiu no confronto entre o animal a ser testado (animal residente) e um indivíduo da mesma espécie que tenha, porém, idade e peso inferior – no mínimo 100g a menos - (animal intruso). Para tanto os animais foram colocados na arena de campo aberto e a interação entre residente e intruso foi registrada por uma câmera filmadora, durante 5 min. Para evitar que o comportamento exploratório atrapalhasse a exibição do comportamento de interação social, o animal

residente foi ambientizado à arena do campo aberto por 3 dias consecutivos, anteriores ao dia do teste, por um período de 15 minutos.

No dia do teste a exibição de comportamentos tais como: exploração anogenital do intruso, segui-lo ou monta (colocar as patas dianteira sobre o intruso), bem como imitá-lo foram considerados como interação social. Os vídeos foram analisados e o tempo total de interação entre residente e intruso foi contabilizado (DER-AVAKIAN; MARKOU, 2014).

Considerou-se exploração anogenital os eventos em que o animal testado cheirava a região perianal do intruso. A exibição de comportamento sexual, situação em que o animal testado monta sobre o intruso, bem como situação de mimetismo, em que o animal teste imitava os movimentos do intruso foram consideradas interações sociais.

3.2.2.3 Preferência à sacarose

O teste de preferência à sacarose foi utilizado para revelar um possível estado de anedonia nos animais, ou seja, perda da capacidade de sentir prazer (SHANKMAN et al., 2010). O presente teste foi conduzido tal como descrito por Soncini et al. (2012).

Os animais que passaram pelo teste de preferência à sacarose, durante cinco dias, tiveram acesso (2h/dia) a uma solução de sacarose a 10%; este consistindo em um período de treinamento. Durante o período de treinamento os animais tiveram livre acesso a água e comida. Depois de treinados estes foram submetidos ao teste, durante o qual tiveram acesso a água, comida e solução de sacarose, ao final de 2 horas (LI et al., 2012) os volumes ingeridos de água e sacarose foram coletados, com base na diferença de peso das duas garrafas. Durante o período de ambientação os animais foram colocados em contato com a solução de sacarose sempre no mesmo horário do dia.

A preferência à sacarose (PS) foi determinada usando a seguinte equação:

$$PS = \frac{\text{volumedesacaroseingerido (mL)}}{\text{total(volumedeágua + volumedesacaroseingerido)}} \times 100$$

3.2.2.4 Ingestão alimentar

A avaliação do padrão de ingestão de ração foi conduzida em gaiolas metabólicas.

Anteriormente ao dia do teste os animais foram colocados individualmente nas gaiolas para que se habituassem ao novo ambiente, por no mínimo 12h. Em seguida os animais ficaram de jejum por 12h, contudo tiveram acesso irrestrito a água. Posteriormente ao jejum ração comercial em pó foi colocada acessível para os animais e o padrão de ingestão foi monitorado durante 24h, por meio de pesagem da mesma nos tempos de 2h, 4h, 6h e 24h após sua reintrodução (RORATO et al., 2012).

3.2.3 Dosagem de corticosterona

Para examinar a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal procedeu-se a dosagem de corticosterona. Os animais foram decapitados e 5 mL de sangue coletados em tubos heparinizados. Imediatamente após a coleta o sangue foi centrifugado a uma rotação de 3000rpm à 4°C por 15 minutos para ter o plasma separado dos elementos figurados do sangue. Este foi mantido a uma temperatura de -20°C até o momento das dosagens hormonais.

No primeiro dia do ensaio para dosagem do hormonal, a corticosterona foi extraída de 25 µL de soro por meio do uso de 1 mL de etanol, e liofilizada. A dosagem de corticosterona foi realizada pela técnica de radioimunoensaio (RIE) e, para tanto, este projeto contou com a colaboração do Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, coordenado pelo Prof. Dr. José Antunes Rodrigues. Para o RIE, as amostras foram solubilizadas em tampão apropriado e ensaiadas em duplicata juntamente com uma curva padrão. As replicatas foram incubadas com um anticorpo anti-corticosterona produzido em coelho (#C8784, Sigma) e com corticosterona triciada [1,2-3(H)] (New England Nuclear). A separação da fração livre da ligada foi realizada com uma solução de carvão-dextran 0,5/0,05% por meio de centrifugação. O sobrenadante foi então lido em Cintilador capaz de quantificar a emissão de radiação beta, as concentrações foram estimadas com base na curva padrão (ELIAS et al., 2004; ELIAS et al., 1997).

3.2.4 Monitoramento da temperatura corporal

Para que fosse possível o monitoramento da temperatura corpórea dos animais, estes tiveram um transmissor de biotelemetria implantado na cavidade peritoneal que transmitia sinais, a cada um minuto, para uma placa receptora acoplado a um computador. O acesso a cavidade peritoneal foi possível por meio de laparotomia de aproximadamente 2cm, com os animais sob efeito de anestésico injetável (TBE). Após o implante do transmissor a incisão foi fechada por meio de dois pontos internos feitos no tecido muscular e dois externos feitos no tecido epitelial (CRUNFLI et al., 2014).

Nos momentos em o procedimento experimental experimental preconizava, os animais imediatamente após sofrerem cirurgia para implantação dos transmissores biotelemétricos eram acoplados a um estereotáxico digital para que tivessem o ventrículo lateral direito canulado.

Após 6 ou 7 de cirurgia os animais foram colocados individualmente sobre um receptor telemétrico (Data Science) acoplado a um computador que recebia, transformava e armazenava os dados. Trinta minutos antes do início de qualquer manipulação a temperatura basal dos animais foi determinada. Posteriormente as manipulações, injeção i.p e/ou i.c.v, a temperatura dos animais foi monitorada por um período de oito horas (CRUNFLI et al., 2014).

3.3 DROGAS

Durante a execução deste trabalho foram utilizadas as seguintes drogas: Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* sorotipo 026:B6, antagonista dos receptores GHS-R 1a, da grelina ([D-Lys³]-GHRP-6), ambos adquirido da Sigma-AldrichCo (EUA); Cetoprofeno (Cristalina), Pentabiótico (Fort Dodge Saúde Animal LTDA), Ketamina (Dopalen) e Xilazina (Dopaser); Tribromoetanol (TBE-Sigma) e soro fisiológico 0,9% (Isofarma).

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média±erro padrão da média. Para comparação de três ou mais médias proceder-se-á a análise de variância de uma via, quando existia somente um variável (LPS) seguida do pós-teste de Newman-Keuls. Os dados de telemetria tiveram sua estatística realizada através da área sob a curva calculado do delta da temperatura no intervalo de 3 à 7 horas. ANOVA de duas vias, seguida do pós teste de Bonferroni, foi utilizada para analisar os dados nas situações em que existiam duas variáveis: pré-tratamento ([D-Lys³]-GHRP-6 ou veículo) e tratamento (Salina ou LPS). O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p < 0.05$).

3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os itens 3.5 listados, a seguir, referem-se aos procedimentos experimentais aos quais os animais foram submetidos.

3.5.1 Efeito do LPS sobre as alterações comportamentais

Para avaliar os efeitos do LPS no campo aberto os animais foram divididos em 4 grupos:

- a) Controle, que recebeu injeção i.p. de salina (100mL/Kg)
- b) L1, que recebeu injeção i.p. de LPS (200µg/Kg)
- c) L2, que recebeu injeção i.p. de LPS (500µg/Kg)
- d) L3, que recebeu injeção i.p. de LPS (1000µg/Kg)

3.5.1.1 Campo aberto

Os animais (n= 6) passaram por um período de ambientação na sala do teste por um período de, no mínimo, 12 horas. No dia seguinte à ambientação os animais receberam as injeções (i.p.) e após duas, seis ou vinte e quatro horas eles foram colocados no centro do aparato de campo aberto e filmados por 5 minutos.

3.5.1.2 Interação social

Anteriormente ao teste os animais (n= 6 a 7) foram ambientados no aparato de campo aberto durante 15 minutos, por 3 dias imediatamente anteriores ao dia do teste. No dia em que se conduziu o teste foi aplicado LPS ou salina (i.p.) e após 2, 6 ou 24h os animais foram colocados na arena do campo junto com um intruso. O comportamento de interação ativa foi filmado por 5 min.

3.5.1.3 Preferência à sacarose

Os animais (n= 6 a 7) submetidos a esse teste foram ambientados à solução de sacarose por um período de 5 dias. Depois da ambientação os animais foram divididos em quatro grupos como descrito no item 3.5.1. No sexto dia, decorridas 2, 6, ou 24h horas após as injeções (i.p.) de LPS ou salina os animais tiveram acesso a água e solução de sacarose 10%. As garrafas de água e de solução de sacarose foram pesadas no início e no final do teste.

3.5.1.4 Ingestão alimentar

Os animais (n= 6 a 7) foram colocados em gaiolas metabólicas por um período mínimo de 24h para se habituarem ao novo ambiente. Após a habituação foram submetidos a um jejum de 12h. O acesso à comida foi permitido 2h após o tratamento com LPS. A ração foi pesada antes da reintrodução e após 2, 4, 6 e 24h.

3.5.1.5 Telemetria

Sete dias após a cirurgia de implantação dos probes os animais (n= 8 a 9) tiveram a temperatura corporal monitorada. Trinta minutos antes da administração do LPS foram coletadas as temperaturas basais. O monitoramento foi feito ao longo das oito horas que se seguiram à administração do LPS.

3.5.2 Efeito da administração do antagonista nas alterações comportamentais decorrentes da injeção de LPS

Para avaliar a influência dos receptores GHS-R1a no comportamento doentio induzido pelo LPS (200µg/Kg) os animais foram divididos em 4 grupos:

- a) Controle, pré-tratados com salina (i.c.v.) e tratados com salina (i.p.);
- b) E1, pré-tratados com salina (i.c.v.) e tratados com LPS (i.p.);
- c) E2, pré-tratados com antagonista (i.c.v.) e tratados com salina (i.p.);
- d) E3, pré-tratados com antagonista (i.c.v.) e tratados com LPS (i.p.).

Todos os testes foram conduzidos no sétimo dia após a realização da cirurgia de estereotaxia. Foi infundido centralmente, com auxílio de seringas Hamilton, 5µL de salina ou 5µL de antagonista (1nmol/animal) (FUJINO et al., 2003).

3.5.2.1 Campo aberto

Trinta minutos antes da aplicação do LPS (i.p.) os animais (n= 9 a 11) foram tratados i.c.v. com antagonista ou salina. Após 2h e 30 minutos da infusão central eles foram submetidos ao teste de interação social seguindo o protocolo já descrito.

3.5.2.2 Interação social

Trinta minutos antes da aplicação do LPS (i.p.) os animais (n= 8 a 10) foram tratados i.c.v. com antagonista ou salina. Após 2h e 30 minutos da infusão central eles foram submetidos ao teste de interação social seguindo o protocolo já descrito.

3.5.2.3 Preferência à sacarose

Trinta minutos antes da aplicação do LPS os animais (n= 8 a 10) foram tratados i.c.v. com antagonista ou salina. Após 2h e 30 minutos da infusão central eles tiveram acesso a solução de sacarose por 2h, seguindo o protocolo já descrito.

3.5.2.4 Ingestão alimentar

Após 9h e 30 minutos de jejum os animais (n= 8 a 9) foram tratados i.c.v. com antagonista ou salina. Trinta minutos depois da aplicação central foi administrado o LPS (i.p.). O acesso a comida foi permitido 2h após a injeção de LPS (12h de jejum). A ração foi pesada antes da reintrodução e após 2, 4, 6 e 24h.

3.5.2.5 Dosagem de corticosterona

Trinta minutos antes da aplicação do LPS os animais (n= 10 a 13) foram tratados i.c.v. com antagonista ou salina. Duas horas após a aplicação do LPS eles foram guilhotinados e o sangue foi coletado e processado para posteriores análises, como descrito no item 3.2.3.

Os animais submetidos a este protocolo experimental foram mantidos em caixas individuais alojadas em sala silenciosa na qual qualquer acesso era restrito para

minimizar a ocorrência de estresse, a não ser o imunológico, durante o período das duas horas que se seguiram após a aplicação do LPS (i.p.).

3.5.2.6 Telemetria

Trinta minutos antes da injeção central foi coletada a temperatura basal dos animais. O antagonista foi infundido meia hora antes da injeção do LPS. O monitoramento da temperatura foi feito por 8h. Durante os 6 dias anteriores ao teste os animais eram diariamente manipulados de forma similar ao que ocorreu no dia teste, para que se habituassem, a finalidade da manipulação foi minimizar o estresse decorrente da aplicação das drogas.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos, após análise estatística dos dados coletados durante a execução do presente trabalho, são apresentados a seguir.

4.1 EFEITO DO LPS NO TESTE DE CAMPO ABERTO, PREFERÊNCIA À SACAROSE, INGESTÃO ALIMENTAR E INTERAÇÃO SOCIAL

No teste de campo aberto as três doses de LPS 200, 500 e 1000 μ g/Kg causaram uma diminuição no número de cruzamentos periféricos (Figura 3A) ($F_{3,23}= 7,424$; $p<0,01$ nas doses de 200 e 500 μ g/kg; $p<0,001$ na dose de 1000 μ g/kg), o número de cruzamentos centrais (Figura 3B) também foi diminuído nas três doses de LPS ($F_{3,23}= 8,097$, $p<0,01$) assim como o total de cruzamentos (Figura 3C) ($F_{3,23}= 9,457$; $p<0,01$ nas doses 200 e 500 μ g/kg; $p<0,001$ na dose de 1000 μ g/kg), do mesmo modo houve redução do número de *rearings* (Figura 3D) ($F_{3,23}= 9,043$, $p<0,05$ nas doses de 200 e 500 μ g/kg; $p<0,001$ na dose de 1000 μ g/kg).

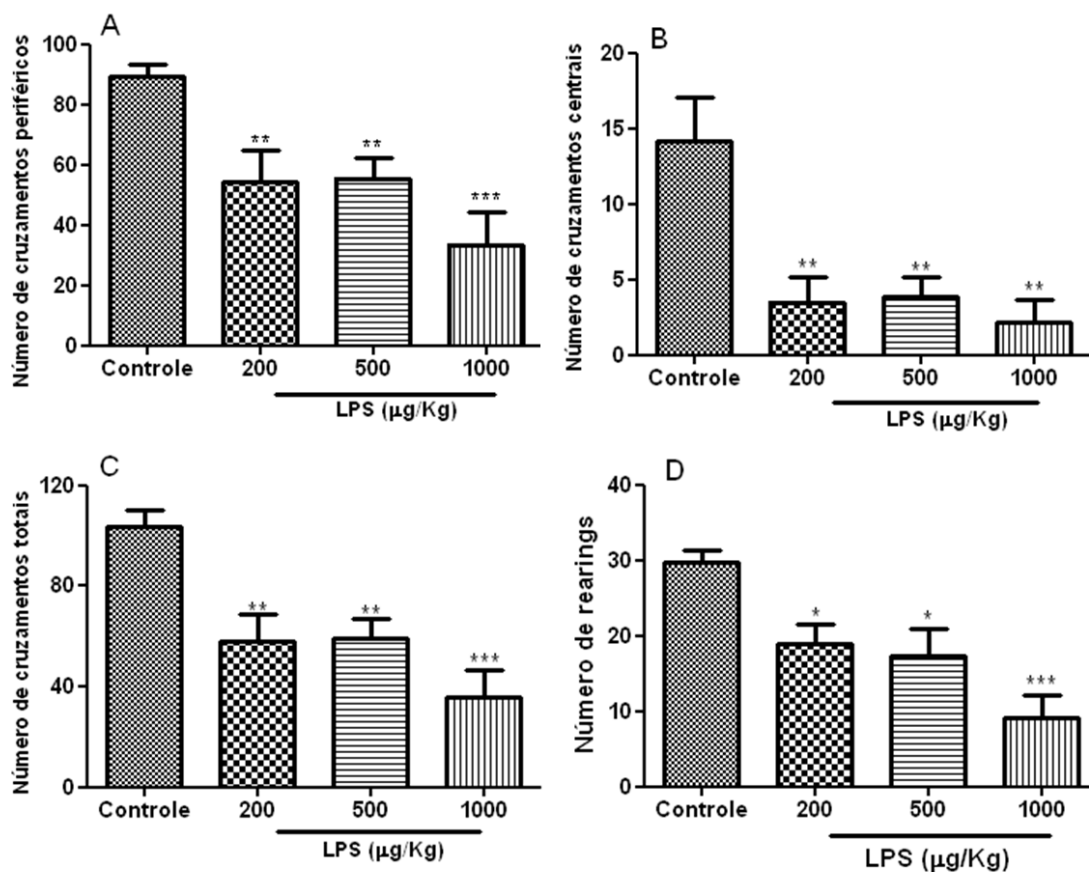


Figura 3 - Efeito de diferentes doses de LPS sobre o comportamento no aparato de campo aberto, decorridas 2h da aplicação.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: do autor

Decorridas seis horas após a aplicação do LPS os animais submetidos ao teste de campo aberto não demonstraram alterações nos cruzamentos periféricos (Figura 4A) com exceção da dose de 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ($F_{3,23} = 3,925$; $p > 0,05$ nas doses 200 e 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $p < 0,05$ na dose de 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$), os cruzamentos centrais (Figura 4B) não apresentaram diminuição significativa entre as doses ($F_{3,23} = 0,7932$; $p > 0,05$) assim como o total de cruzamentos (Figura 4C) ($F_{3,23} = 2,433$; $p > 0,05$ para todas as doses). O número de *rearings* (Figura 4D) também não demonstrou diminuição significativa entre as doses ($F_{3,23} = 0,2921$; $p > 0,05$).

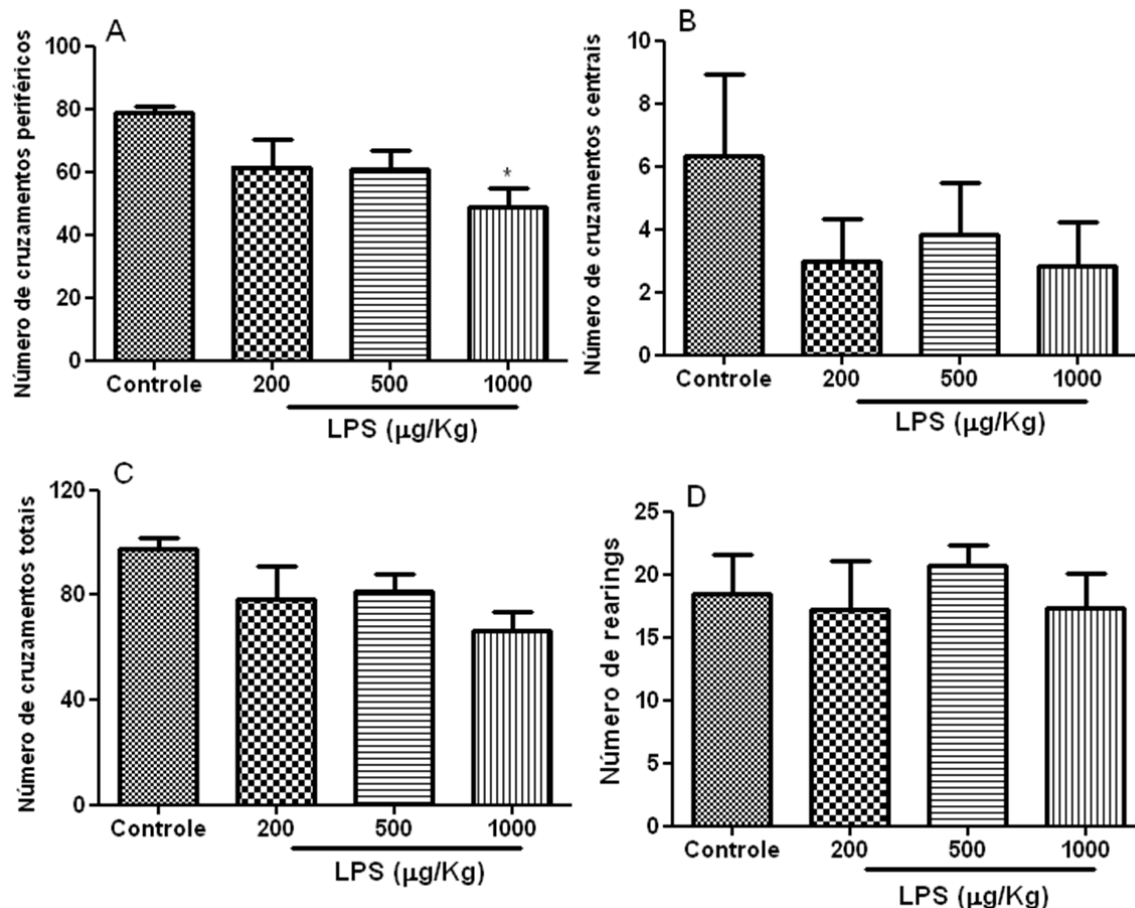


Figura 4 - Efeito de diferentes doses de LPS sobre o comportamento no campo aberto, após 6h da aplicação.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: do autor

Após 24 horas da aplicação de LPS pode-se observar que não houve diferença significativa entre as doses no número de cruzamentos periféricos (Figura 5A) no teste de campo aberto ($F_{3,23} = 2,574$; $p > 0,05$), os cruzamentos centrais (Figura 5B) ($F_{3,23} = 0,87$; $p > 0,05$), cruzamentos totais (Figura 5C) ($F_{3,23} = 2,290$; $p > 0,05$) e *rearings* (Figura 5D) ($F_{3,23} = 0,1778$; $p > 0,05$) também não apresentaram diferença significativa entre as doses.

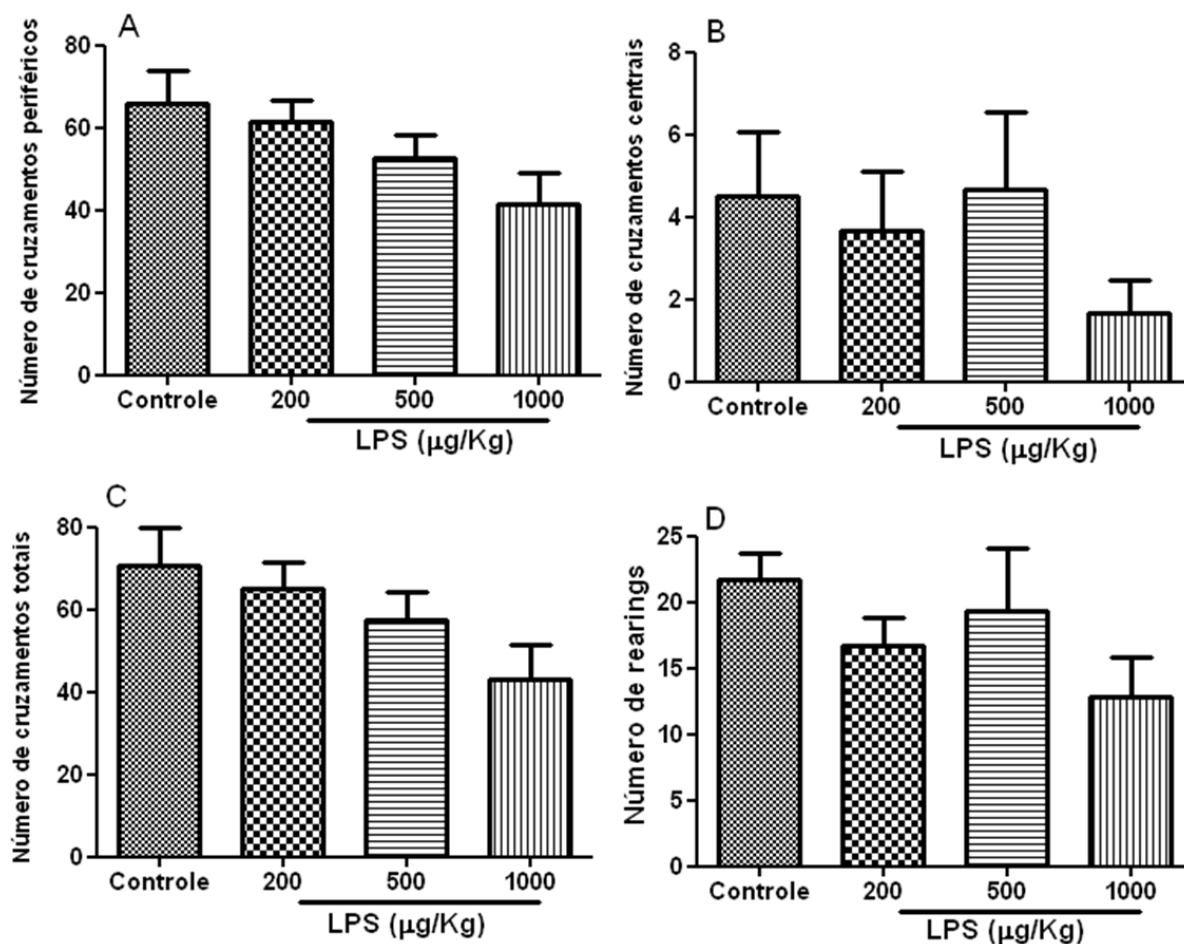


Figura 5 - Efeito de diferentes doses de LPS sobre o comportamento no aparato de campo aberto, decorridas 24h da aplicação.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM (ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: do autor

No teste de preferência a sacarose, após duas horas do tratamento com LPS pode-se observar uma redução significativa na preferência de sacarose nas doses de 200, 500 e 1000µg/Kg quando comparado com o grupo controle ($F_{3,39}= 12,68$; $p<0.0001$) (Figura 6A). Após 6 horas da aplicação de LPS somente a dose de 1000µg/Kg foi capaz de provocar uma redução na preferência de sacarose quando comparado com o tratamento com salina ($F_{3,22}= 3,463$; $p<0,05$) (Figura 6B). Decorridas 24 horas do tratamento com LPS não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos quando comparado ao grupo controle ($F_{3,23}=0,2959$; $p>0,05$) (Figura 6C).

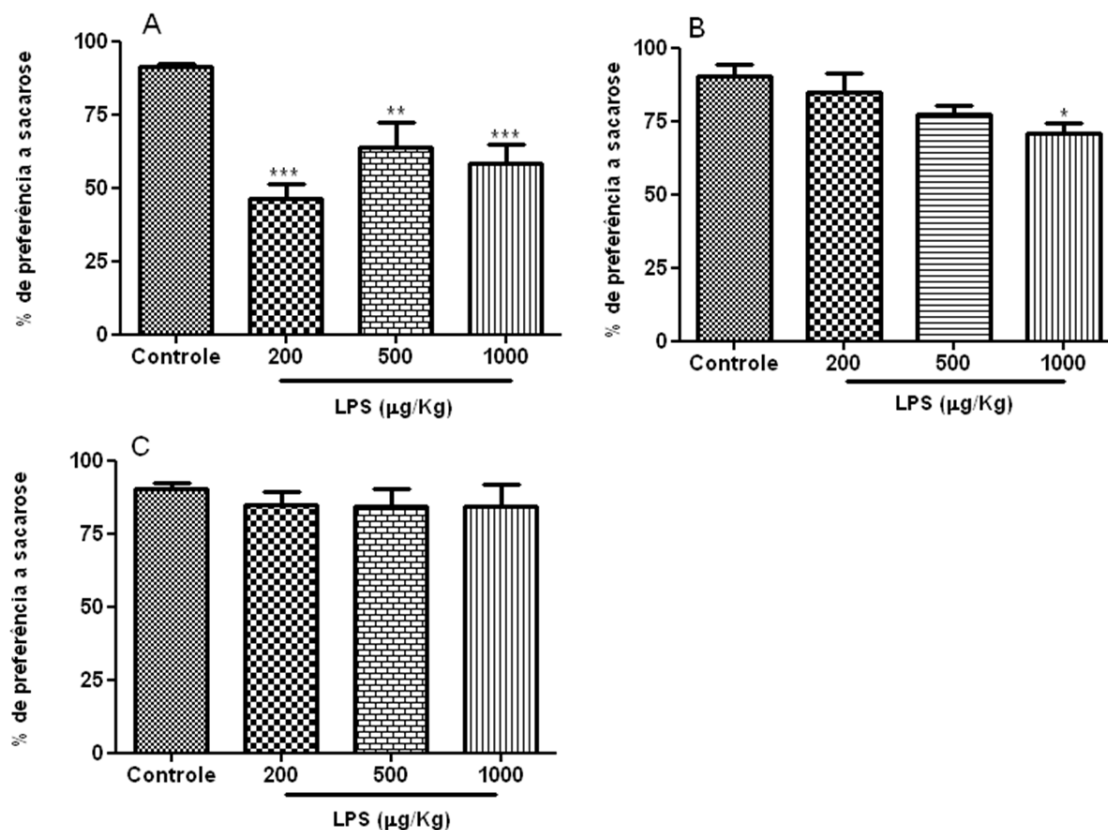


Figura 6 - Efeito de diferentes doses de LPS sobre a porcentagem de preferência à sacarose, decorridas 2h (A), 6h (B) e 24h (C) da aplicação.

Nota: Valores expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: do autor

No teste de ingestão alimentar ANOVA de duas vias indicou efeito do tratamento com LPS 200µg/Kg (Fator Desafio Imunológico: $F_{1,55}=85,38$; $p < 0.0001$) na diminuição da ingestão alimentar em todos os tempos analisados (Fator Tempo: $F_{1,55}=318,2$; $p < 0.0001$) assim como na interação entre esses dois fatores (Fator interação: $F_{1,55}=14,07$; $p < 0.0001$). A análise também indicou que o tratamento na dose de 500 µg/Kg (Fator Desafio Imunológico: $F_{1,45}= 115,54$; $p < 0.0001$) diminuiu a ingestão de alimentos nos tempos de 2, 4, 6 e 24 horas (Fator Tempo: $F_{1,45}= 217,1$; $p < 0.0001$) quando comparado com o controle havendo interação entre esses dois fatores (Fator interação: $F_{1,45}= 22,86$; $p < 0.0001$).

ANOVA de duas vias mostrou que a dose de 1000 μ g/Kg (Fator Desafio Imunológico: $F_{1,55}= 302,89$; $p<0.0001$) reduziu a ingestão alimentar em todos os tempos avaliados (Fator Tempo: $F_{4,55}= 257,6$; $p<0.0001$) e a interação entre esses dois parâmetros (Fator interação: $F_{4,55}= 91,72$; $p<0.0001$), conforme demonstrado na Figura 7.

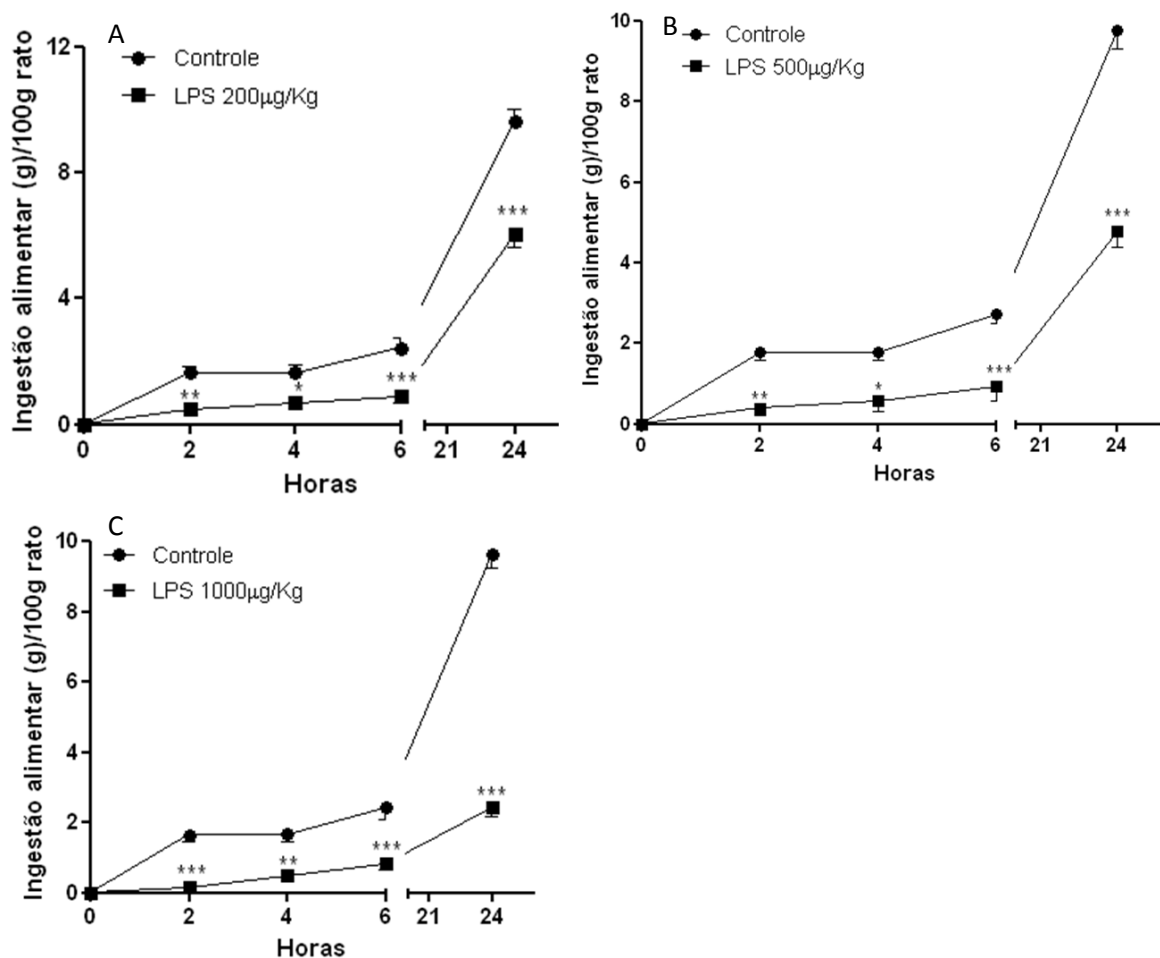


Figura 7 - Efeito do LPS nas doses de 200 μ g/Kg, 500 μ g/Kg e 1000 μ g/Kg sobre a ingestão alimentar ao longo de 24h.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni).

Fonte: do autor

No teste de interação social observou-se uma redução significativa no tempo de interação social 2 horas após o tratamento com LPS nas doses de 200, 500 e 1000 μ g/Kg quando comparado ao tratamento com salina ($F_{3,24}= 29,86$; $p<0.0001$) (Figura 8A). Na Figura 8B é possível verificar uma diminuição significativa no tempo de interação nas doses de 500 e 1000 μ g/Kg ($F_{3,25}= 13,83$; $p<0.0001$) após 6 horas do tratamento com

LPS em relação ao grupo controle. Após 24 horas do tratamento com LPS a interação social não se mostrou diferente significativamente entre as doses analisadas ($F_{3,25}=0,3335$; $p>0,05$) (Figura 8C).

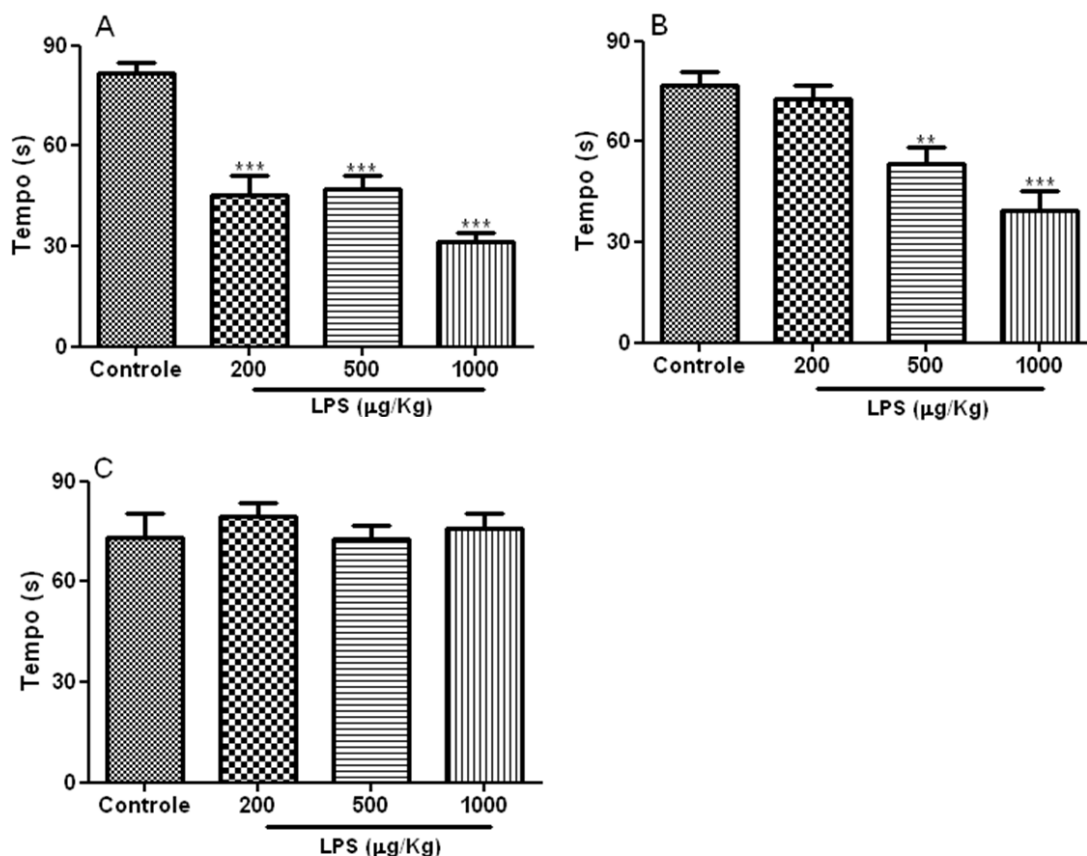


Figura 8 - Efeito de diferentes doses de LPS sobre o tempo de interação social, após 2h (A), 6h (B) e 24h (C) da aplicação.

Nota: Valores expressos como média \pm E.P.M. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ (ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: do autor.

4.2 EFEITO DO LPS SOBRE A TEMPERATURA CORPÓREA

A Figura 9 mostra a variação de temperatura ao longo das 8 horas após aplicação de LPS nas doses de 200, 500 e 1000µg/Kg, o tempo zero é o momento da injeção intraperitoneal de LPS. Trinta minutos antes do tratamento os animais tiveram suas temperaturas basais monitoradas. Cada ponto do gráfico significa a média dos animais do grupo naquele determinado tempo. Nesta figura podemos observar que a

endotoxemia desenvolvida pelo LPS provoca uma hipotermia inicial seguida por uma febre após 2 horas que se segue até a oitava hora no grupo tratado com a dose de 1000 μ g/Kg. Esse perfil é semelhante nas doses de 200, 500 μ g/Kg, porém a segunda apresenta um leve aumento comparado com as outras doses e a partir da sexta hora a temperatura se apresenta menor que o grupo tratado com o controle.

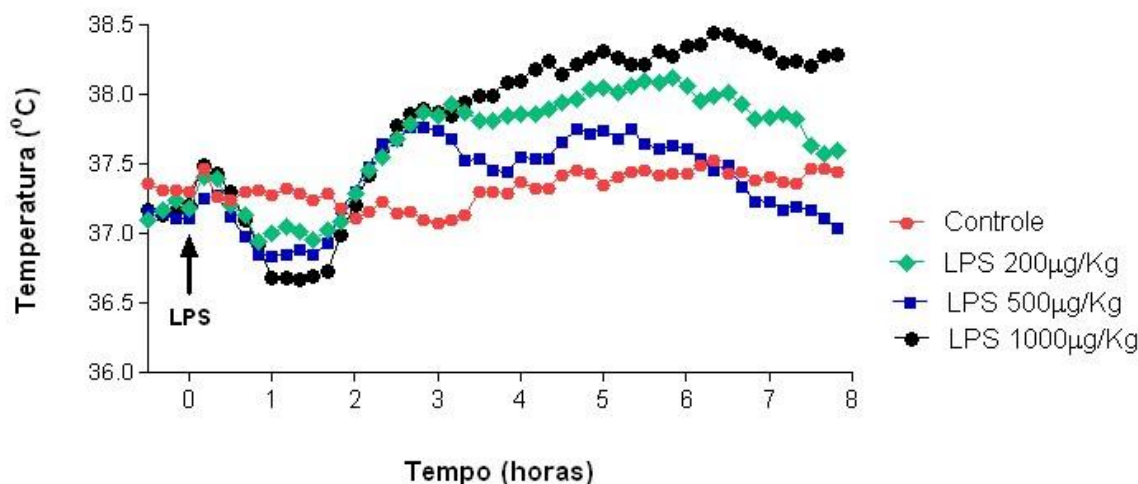


Figura 9 - Efeito da administração de LPS (i.p.) na variação da temperatura corporal bruta no decurso de 8h.

Fonte: do autor

A Figura abaixo exibe a variação de temperatura em relação temperatura basal, nos animais tratados com as doses de LPS (200, 500 e 1000 μ g/Kg). Pode-se observar que os grupos tratados com LPS apresentaram um aumento na temperatura corpórea quando comparados ao grupo controle (Figura 10).

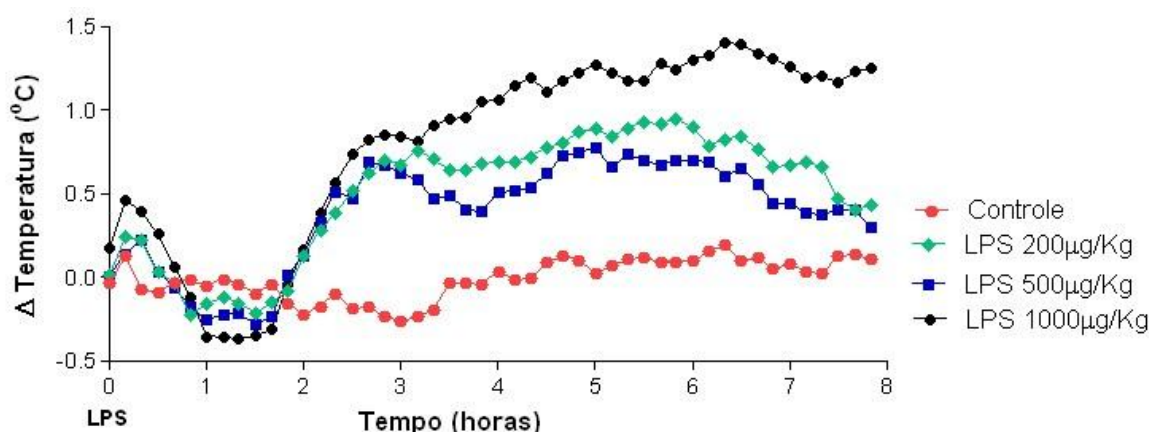


Figura 10 - Efeito da administração de LPS (i.p.) no delta de variação da temperatura corporal no decurso de 8h.

Nota: Os resultados foram expressos como sendo a diferença entre o valor bruto e o valor de temperatura basal.

Fonte: do autor

O índice térmico calculado no intervalo entre a terceira e a sétima hora demonstrou um aumento significativo da temperatura corporal dos animais tratados com as três doses de LPS (200, 500 e 1000 μ g/Kg) quando comparado com o grupo controle ($F_{3,31} = 8,096$; $p = 0,0005$).

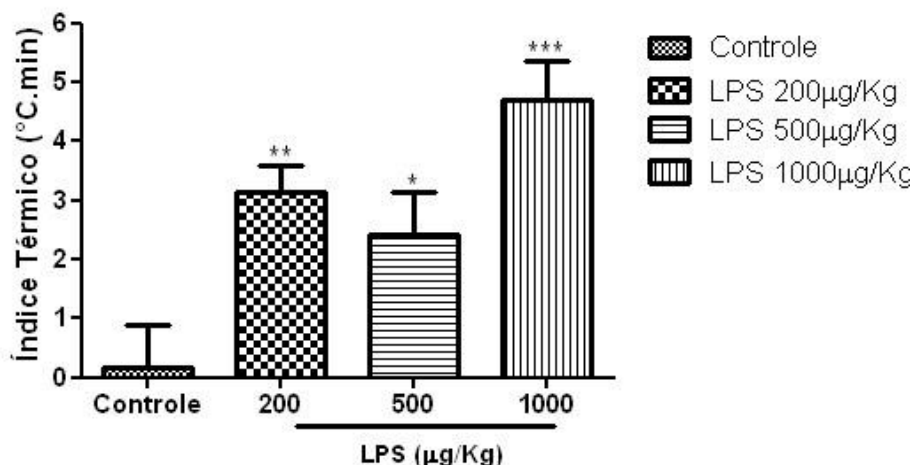


Figura 11 - Efeito de diferentes doses de LPS sobre os valores de índice térmico, calculados com base na área sobre a curva da variação de temperatura.

Nota: Valores expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman-Keuls).

Fonte: do autor.

Os resultados descritos acima mostram que qualquer uma das três doses de LPS é capaz de induzir marcadamente o aparecimento do comportamento doentio, principalmente na segunda hora, e também são capazes de produzir febre nos animais.

Diante disso, a dose e o tempo escolhido para avaliação do envolvimento da grelina no comportamento doentio e febre foram 200 μ g/Kg e 2 horas, respectivamente.

4.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO ANTAGONISTA [D-Lys³]-GHRP-6 NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DECORRENTES DA INJEÇÃO DE LPS

Os resultados estatísticos, referentes as análises comportamentais, obtidos quando usado antagonista dos receptores GHS-R1a, estão descritos nos itens que a seguir.

4.3.1 Campo aberto

Os resultados dos parâmetros avaliados para o teste de campo aberto estão demonstrados na Figura 12. Após duas horas de tratamento com LPS ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo do tratamento quando comparado com o controle (Fator Desafio Imunológico: $F_{1,36} = 8.55$, $P < 0.01$), o pré-tratamento com o antagonista (Fator pré-tratamento: $F_{1,36} = 2.85$, $P > 0.05$) não exerceu efeito, contudo houve interação (Fator interação: $F_{1,36} = 5,07$; $p < 0,05$) entre esses dois fatores nos cruzamentos periféricos (Fig. 12A). Conforme observado na Figura 12A após análise do pós-teste, os animais Veículo+LPS percorreram menos os quadrantes periféricos quando comparado com os animais Veículo+Salina ($p < 0,01$). A administração de antagonista não altera esses cruzamentos quando comparado com o controle (Veículo+Salina) ($p > 0,05$), no entanto, o pré-tratamento reverte o efeito do LPS no campo, quando comparado com o grupo Veículo+LPS ($p < 0,05$).

ANOVA de uma via indicou um efeito do tratamento com LPS (Fator Desafio Imunológico: $F_{1,36} = 5.24$, $P < 0.05$), o pré-tratamento com o antagonista do receptor de grelina (Fator pré-tratamento: $F_{1,36} = 1.09$, $P > 0.05$) não exerceu efeito, porém houve interação entre esses dois fatores (Fator interação: $F_{1,36} = 4,5$; $p < 0,05$) nos cruzamentos centrais. A análise do pós-teste demonstrou que os animais Veículo+LPS percorreram menos os quadrantes centrais quando comparado com os animais Veículo+Salina ($p < 0,05$). A administração de antagonista não altera esses cruzamentos quando comparado com o controle (Veículo+Salina) ($p > 0,05$), todavia, o pré-tratamento com antagonista reverte o efeito do LPS na diminuição dos cruzamentos centrais, quando comparado com o grupo Veículo+LPS ($p < 0,05$) (Fig. 12B).

O tratamento com LPS, assim como a interação entre este fator e o fator antagonista exerceram um efeito no número total de cruzamentos, resposta semelhante observada com o antagonista (Fator Desafio Imunológico: $F_{1,36} = 11,81$; $p < 0,001$, Fator pré-tratamento: $F_{1,36} = 5,50$; $p < 0,001$, Fator interação: $F_{1,36} = 10,43$; $p < 0,01$). O pós-teste evidenciou que os animais Veículo+LPS percorreram menos o total dos quadrantes centrais quando comparado com os animais Veículo+Salina ($p < 0,001$). O tratamento com antagonista não altera esses cruzamentos quando comparado com o controle (Veículo+Salina) ($p > 0,05$), contudo, o pré-tratamento com antagonista reverte o efeito

do LPS na diminuição dos cruzamentos totais, quando comparado com o grupo Veículo+LPS ($p<0,01$) (Fig.12C).

Por fim, o tratamento com LPS, pré-tratamento com antagonista de receptor de grelina e a interação entre esses dois fatores não demonstraram efeito nos números de *rearings*.

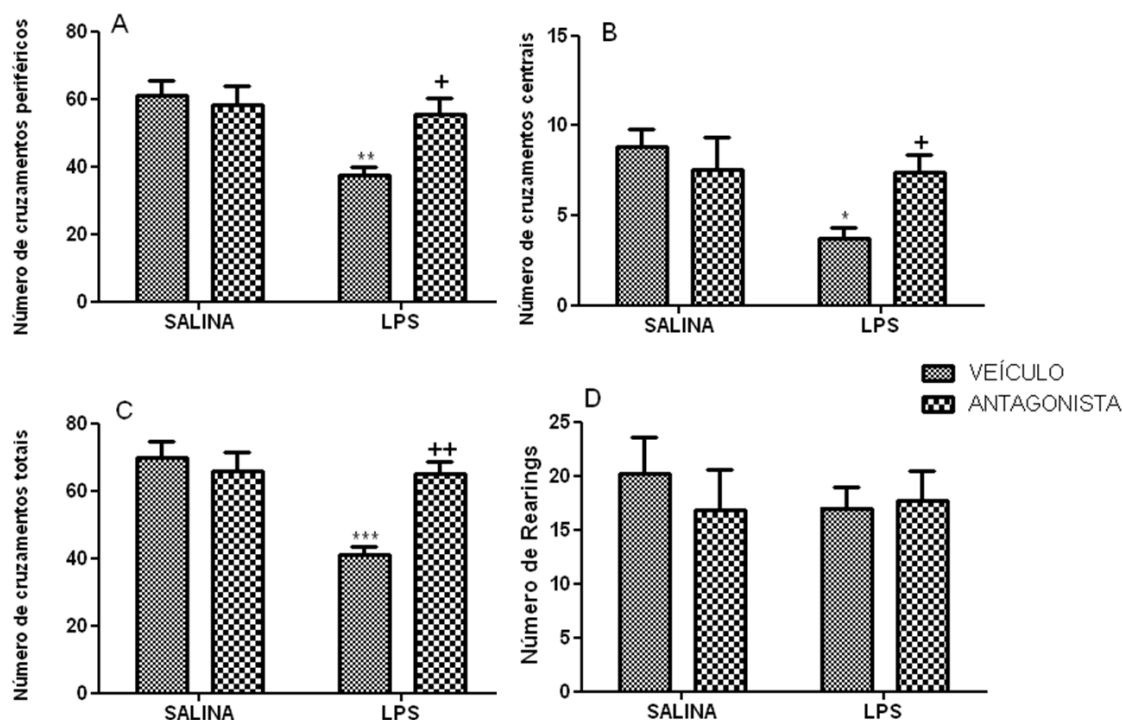


Figura 12 - Efeito do pré-tratamento com [D-Lys³]-GHRP-6 e tratamento com LPS sobre os cruzamentos periféricos (A), centrais (B), totais (C) e número de *rearings* (D) no aparato de campo aberto.

Nota: Valores expressos como média ± EPM. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ Veículo-Salina quando comparado como grupo Veículo-LPS, + $p<0,05$ e ++ $p<0,01$ Veículo-LPS quando comparado com o grupo Antagonista-LPS (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni).

Fonte: o autor

4.3.2 Preferência à sacarose

A análise ANOVA de duas vias revelou que o tratamento com LPS causou um efeito na preferência a sacarose (Fator Desafio Imunológico: $F_{1,31}= 266,28$; $p<0,001$). O pré-tratamento com antagonista também provocou um efeito (Fator pré-tratamento: $F_{1,31}=208,90$; $p<0,001$) ocasionando uma interação entre esses dois parâmetros (Fator interação: $F_{1,31}= 154,90$; $p<0,001$).

Os animais Veículo+LPS preferiram menos sacarose quando comparado com os animais Veículo+Salina ($p<0,001$). O tratamento com o antagonista não altera essa preferência quando comparado com o controle (Veículo+Salina) ($p>0,05$), porém, o pré-tratamento reverte o efeito do LPS quando comparado com o grupo Veículo+LPS ($p<0,001$), conforme visto na Figura 13.

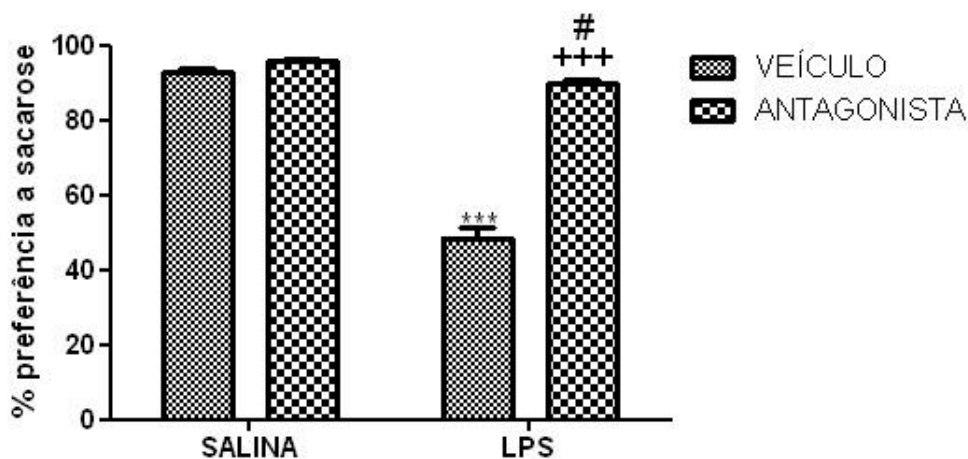


Figura 13 - Efeito do pré-tratamento com [D-Lys³]-GHRP-6 e tratamento com LPS sobre a porcentagem de preferência à sacarose.

Nota: Valores expressos como média \pm E.P.M. *** $p<0,001$; Veículo-Salina quando comparado como grupo Veículo-LPS, +++ $p<0,001$; Veículo-LPS quando comparado com o grupo Antagonista-LPS, # $p<0,05$; Antagonista-Salina quando comparado com o grupo Antagonista-LPS (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni).

Fonte: do autor.

4.3.3 Interação social

O tratamento com LPS provocou um efeito na interação social (Fator Desafio Imunológico: $F_{1,31}= 129,37$; $p<0,001$). O pré-tratamento, em animais endotóxicos, com [D-Lys³]-GHRP-6 também apresentou um efeito (Fator pré-tratamento: $F_{1,31}= 16,14$; $p<0,001$). Além do mais, houve interação entre esses dois parâmetros (Fator interação: $F_{1,31}= 36,03$; $p<0,001$) (Figura 14).

De acordo com a Figura 14, os animais Veículo+LPS diminuíram o tempo de interação social quando comparado com os animais Veículo+Salina ($p<0,001$). A administração com o antagonista não altera esse tempo de interação quando comparado com o controle (Veículo+Salina) ($p>0,05$). Já o pré-tratamento com antagonista reverte o efeito do LPS quando comparado com o grupo Veículo+LPS ($p<0,001$).

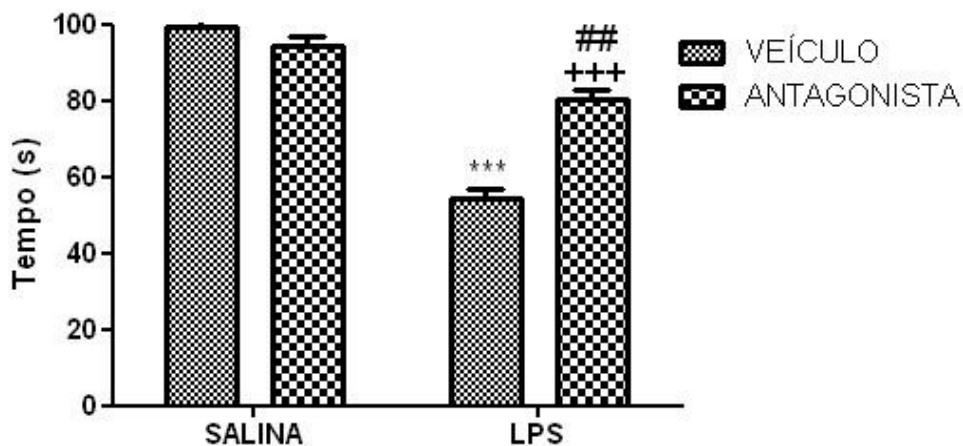


Figura 14 - Efeito do pré-tratamento com [D-Lys³]-GHRP-6 e tratamento com LPS sobre o tempo de interação social.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$; Veículo-Salina quando comparado como grupo Veículo-LPS, +++ $p < 0,001$; Veículo-LPS quando comparado com o grupo Antagonista-LPS, ## $p < 0,01$; Antagonista-Salina quando comparado com o grupo Antagonista-LPS (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni).

Fonte: do autor.

4.3.4 Ingestão alimentar

A ingestão alimentar foi monitorada durante 24 horas após os tratamentos conforme demonstrado na Figura 15. Na segunda hora de análise do teste o tratamento com LPS apresentou efeito na ingestão alimentar (Fator Desafio Imunológico: $F_{1,29} = 6,88$, $p < 0,05$), não houve efeito do pré-tratamento com antagonista (Fator pré-tratamento: $F_{1,29} = 0,52$; $p > 0,05$) nem na interação entre esses dois fatores (Fator interação: $F_{1,29} = 2,15$; $p > 0,05$). O tratamento com LPS (Fator Desafio Imunológico: $F_{1,29} = 11,21$; $p < 0,01$) e o pré-tratamento com antagonista (Fator pré-tratamento: $F_{1,29} = 4,59$; $p < 0,05$) apresentaram efeito na ingestão de alimentos na quarta hora, porém não houve efeito entre esses dois fatores (Fator interação: $F_{1,29} = 2,15$; $p > 0,05$). Na sexta hora o tratamento com LPS (Fator Desafio Imunológico: $F_{1,29} = 17,66$; $p < 0,001$) e o pré-tratamento com antagonista (Fator pré-tratamento: $F_{1,29} = 12,68$; $p < 0,01$) exibiram efeito na ingestão de alimentos, contudo não houve interação entre esses dois fatores (Fator interação: $F_{1,29} = 0,52$; $p > 0,05$). Finalmente, após 24 horas da administração do LPS e o pré-tratamento com o antagonista do receptor de grelina foi apresentado um efeito na ingestão alimentar, além da interação entre esses dois fatores (Fator Desafio

Imunológico: $F_{1,29} = 174,62$; $p < 0,001$; Fator pré-tratamento: $F_{1,29} = 12,52$; $p < 0,01$; Fator interação: $F_{1,29} = 14,79$; $p > 0,001$).

Na Figura 15 podemos observar, a partir da análise do pós-teste, que os animais Veículo+LPS reduziram a ingestão alimentar significativamente quando comparado com os animais Veículo+Salina ($p < 0,01$). A administração com o antagonista não altera a ingestão quando comparado com o controle (Veículo+Salina) ($p > 0,05$), porém, o pré-tratamento com antagonista dos receptores de grelina atenua o efeito hipofágico do LPS quando comparado com o grupo Veículo+LPS ($p < 0,001$).

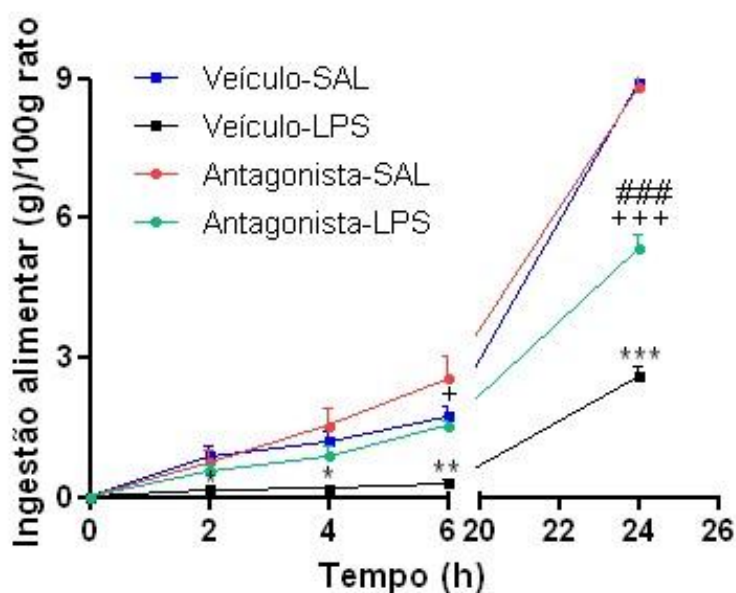


Figura 15 - Efeito do pré-tratamento com $[D-Lys^3]$ -GHRP-6 e tratamento com LPS sobre a ingestão alimentar no decorrer de 24h.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; quando comparado como grupo Veículo-Salina, + $p < 0,05$; +++ $p < 0,001$; quando comparado com o grupo Veículo-LPS, ### $p < 0,001$; quando comparado com o grupo Antagonista-Salina (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni).

Fonte: do autor.

4.3.5 Temperatura corporal

O monitoramento biotelemétrico da temperatura corporal (Figura 16) demonstra que o LPS foi capaz de induzir um aumento na temperatura corpórea dos animais. Foram coletadas três temperaturas basais antes das injeções i.c.v. de salina ou

antagonista, posteriormente foram realizadas mais três aferições e por fim, 30 minutos depois da aplicação i.c.v., foram administrados i.p. salina ou LPS.

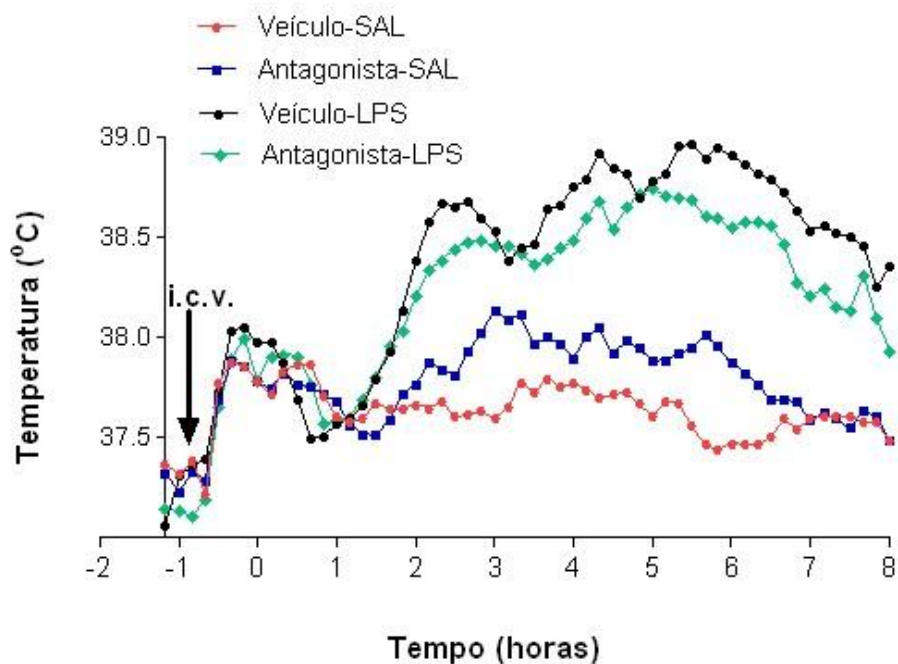


Figura 16 - Efeito do pré-tratamento com [D-Lys³]-GHRP-6 e tratamento com LPS sobre a variação da temperatura corporal bruta no decurso de 8h.

Fonte: do autor.

A Figura 17 mostra o delta de variação de temperatura dos animais pré-tratados com [D-Lys³]-GHRP-6 e tratados com LPS ao longo de oito horas após a indução da endotoxemia por tratamento com LPS. Os dados do gráfico foram obtidos subtraindo da temperatura bruta a média aritmética das três aferições basais.

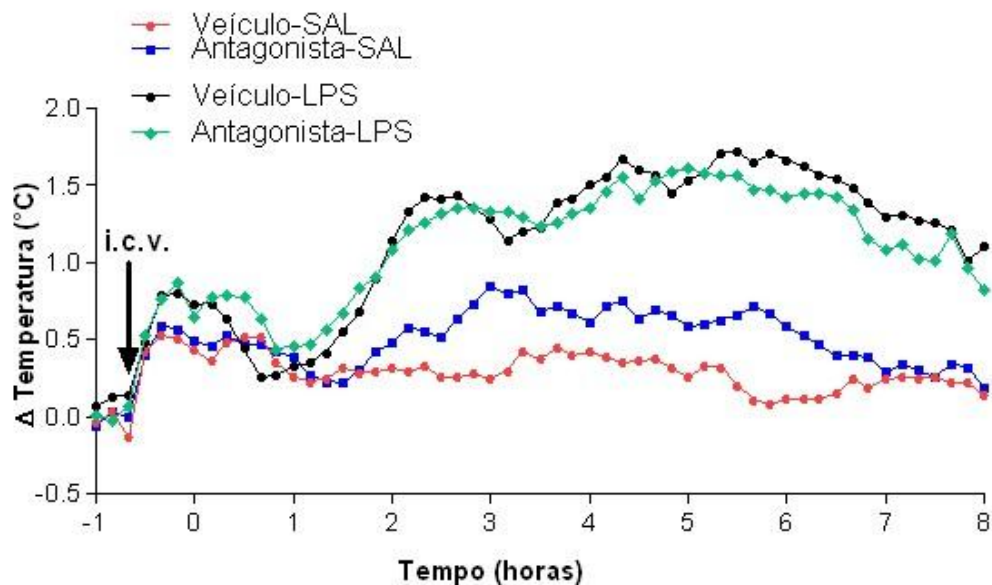


Figura 17 - Efeito do pré-tratamento com [D-Lys³]-GHRP-6 e tratamento com LPS sobre o delta de variação da temperatura corporal no decorrer de 8h.

Fonte: do autor.

Conforme demonstrado na Figura 18, índice térmico dos animais no intervalo entre a terceira e sétima hora, ANOVA de duas vias revela um efeito do LPS na temperatura corporal dos animais (Fator Desafio Imunológico: $F_{1,28} = 16,44$; $p < 0,001$), contudo não houve efeito do antagonista, nem interação entre o pré-tratamento e o tratamento (Fator pré-tratamento: $F_{1,28} = 0,00$; $p > 0,05$; Fator interação: $F_{1,28} = 2,27$; $p > 0,05$).

Os animais Veículo+LPS tiveram seu índice térmico aumentado quando comparado com os animais Veículo+Salina ($p < 0,001$). A administração com o antagonista não alterou o índice térmico quando comparado com o controle (Veículo+Salina) ($p > 0,05$). Além disso, o pré-tratamento com antagonista dos receptores de grelina não reverteu o efeito do índice térmico do LPS quando comparado com o grupo Veículo+LPS ($p > 0,05$).

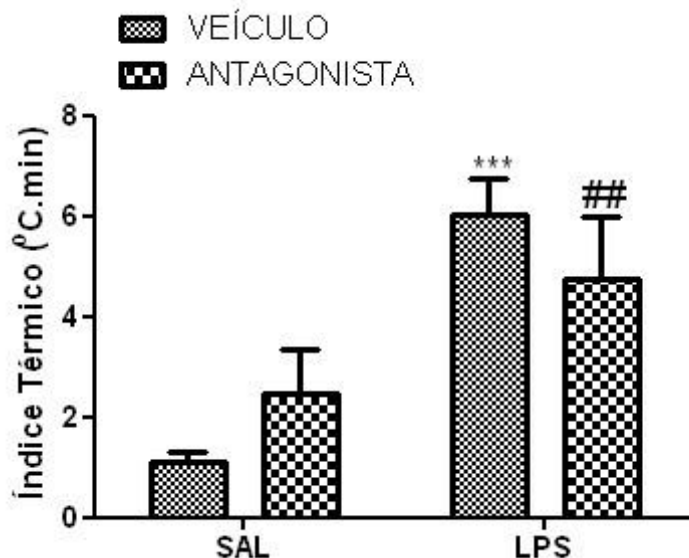


Figura 18 - Efeito do pré-tratamento com [D-Lys³]-GHRP-6 e tratamento com LPS sobre os valores de índice térmico, calculados com base na área sobre a curva da variação de temperatura.

Nota: Valores expressos como média ± EPM. *** $p < 0,001$, quando comparado com o grupo veículo-salina; ## $p < 0,01$, quando comparado com o grupo antagonista-salina (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni).

Fonte: do autor.

4.3.6 Corticosterona sérica

Na Figura 19 são representadas as concentrações de corticosterona sérica. A análise do gráfico nos permite concluir que o tratamento com LPS provoca um efeito nos níveis plasmáticos de corticosterona (Fator Desafio Imunológico: $F_{1,41} = 511,35$; $p < 0,001$). O tratamento com antagonista do receptor de grelina também foi capaz de causar um efeito nos níveis de corticosterona (Fator pré-tratamento: $F_{1,41} = 88,91$; $p < 0,001$) a interação entre esses dois fatores também pode ser observada (Fator interação: $F_{1,41} = 4,46$; $p < 0,05$).

Os animais Veículo+LPS tiveram um aumento nos níveis de corticosterona sérica quando comparado com os animais Veículo+Salina ($p < 0,001$). A administração com o antagonista diminui essa concentração quando comparado com o controle (Veículo+Salina) ($p < 0,001$), além disso, o pré-tratamento com o antagonista atenua o efeito do LPS quando comparado com o grupo Veículo+LPS ($p < 0,001$), conforme visto na Figura 19.

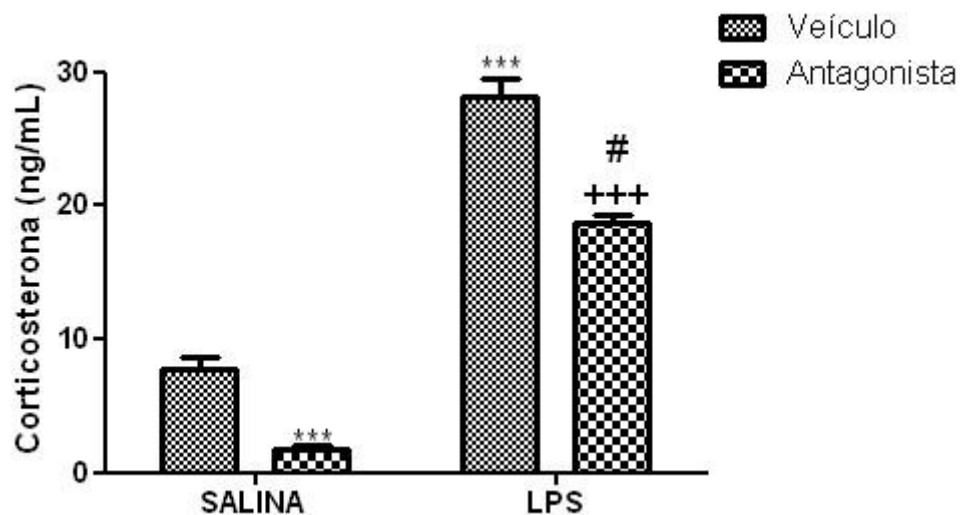


Figura 19 - Efeito do pré-tratamento com [D-Lys³]-GHRP-6 e tratamento com LPS sobre a concentrações séricas de corticosterona.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$; quando comparado como grupo Veículo-Salina, +++ $p < 0,001$; quando comparado com o grupo Veículo-LPS, # $p < 0,05$; quando comparado com o grupo Antagonista-Salina (ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni).

Fonte: do autor.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante a condução deste trabalho são discutidos abaixo com base na literatura científica.

5.1 INFLUÊNCIA DO LPS NO COMPORTAMENTO DOENTIO E NA TEMPERATURA CORPORAL

Diante dos resultados apresentados pôde-se verificar que o desafio imunológico modula o comportamento doentio dos animais, já que a administração de LPS causa um efeito negativo nos testes comportamentais. Dessa maneira, foi possível verificar uma piora no desempenho dos animais nos testes de campo aberto, preferência a sacarose, interação social, ingestão alimentar e telemetria após tratamento com esta endotoxina.

Em 1995 foi publicado; na *Brain, Behavior, and Immunity* o primeiro trabalho sobre comportamento doentio. Nele Aubert et al. (1995) injetou em ratos LPS, IL- β e Leveduras e observou o aparecimento de alterações comportamentais. Porém, o próprio Aubert et al. (1995) já referenciava autores como Kent et al. (1992) que utilizavam e davam significado ao termo comportamento doentio para designar as respostas comportamentais advindas da infecção.

Desde a década de noventa até agora centenas de novos artigos surgiram dando maior solidez a indução do comportamento doentio por meio da endotoxemia por LPS, substância utilizada neste trabalho. Aubert (1999) afirma que o tratamento com LPS é uma ferramenta valiosa para o estudo deste tipo de comportamento.

Com intuito de contribuir de forma positiva para a construção e elucidação do conhecimento na área, no presente trabalho foi analisado o efeito de diferentes doses de LPS sobre o comportamento doentio e verificamos também a influência do tempo nessas respostas comportamentais.

Ao dar-se enfoque na análise das doses de LPS é possível verificar que tanto a dose menor (200 μ g/Kg) quanto a mais alta (1000 μ g/Kg) geram alterações comportamentais acentuadas, mostrando que são efetivas no que se refere à indução do comportamento doentio, o que está de acordo com Martin et al. (2013) que demonstrou

ser o LPS efetivo em induzir o aparecimento do comportamento doentio em doses baixas como 200µg/Kg. Os resultados obtidos no presente trabalho apontam que o efeito comportamental do LPS não é dose dependente. Em contrapartida, a variação de tempo é determinante para o aparecimento do referido comportamento.

Após duas horas de tratamento foi possível observar alterações em todos os testes conduzidos neste trabalho. No campo aberto os animais diminuíram a locomoção total, as visitas ao centro, os deslocamentos na periferia e a frequência de exploração vertical. Em 2009, Kinoshita et al. reportou que camundongos tratados com LPS na dose de 200µg/Kg apresentavam, duas horas após o tratamento, menor locomoção no aparato de campo aberto bem como reduzidas visitas ao braço aberto do labirinto em cruz elevado. A redução, em função do tratamento com LPS, de todos os parâmetros analisados no campo aberto são coerentes com os dados de Ribeiro et al. (2013) que em seu trabalho mostrou que camundongos tratados com LPS 100 µg/kg diminuíram os cruzamentos na periferia, no centro e o total deles.

Durante o teste de preferência à sacarose foi revelado um estado anedônico, hipoingestão de solução adocicada, estado este bem reportado pela literatura. Soncini et al. (2012) constatou em seu trabalho que camundongos endotóxicos exibem uma menor preferência à sacarose 2 e 24h após a administração de LPS. Esta redução na preferência, relatada pelo autor, ainda visível na 24h não foi encontrada em nossos experimentos. Há indícios de que a resposta ao LPS seja mais prolongada em camundongos do que em ratos, visto que ratos tratados com LPS não mais exibem, na 13ª hora, reduzido consumo de sacarose (YIRMIYA, 1996).

Um menor tempo de interação social, na segunda hora, também foi observado nos animais endotóxicos. Resultado semelhante foi encontrado por Townsend et al. (2014), que em seu estudo observou redução neste comportamento, duas horas após aplicar LPS, tanto em ratos adultos quanto em idosos. Além do teste de interação social a ingestão alimentar foi realizada no presente estudo como um dos parâmetros para avaliação do comportamento doentio.

A anorexia é um clássico elemento da fase aguda da resposta imunológica, o LPS por ser capaz de induzir esse tipo de resposta tem a anorexia como sendo um de seus efeitos mais marcantes (KOPF et al, 2011). Os resultados aqui descritos corroboram com os achados da literatura, devido ao fato de que revelam a existência de hipofagia nos animais desde a 2ª até a 24ª hora. O efeito anorexígeno do LPS é tão

intenso que Gayle et al. (1998) demonstrou que mesmo após 39h de jejum animais tratados com LPS exibiram comportamento hipofágico.

Todas essas alterações comportamentais que ocorreram nas três doses testadas 2 horas após a administração refletem as modificações neuroimunoendócrinas que ocorrem no animal endotóxico. O LPS induz o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias bem como aumenta os níveis plasmáticos de corticosterona, fatores capazes de levar ao quadro doentio, por intermédio da modulação do sistema límbico (BEISHUIZEN; THUIS, 2003; ROCHE et. al., 2006; TURRIN et. al., 2001).

Além de análises realizadas na segunda hora após tratamento com LPS, neste trabalho também foi investigado o comportamento doentio dos animais na sexta e vigésima quarta hora após a administração do agente endotóxico. Na sexta hora apenas a dose de 1000µg/Kg foi capaz de influenciar a locomoção na periferia no teste de campo aberto em relação ao controle. Entretanto, somente este parâmetro não permite escolher esta dose para pesquisar a influência do antagonista do receptor de grelina no comportamento doentio.

O perfil comportamental dos animais tratados com as três diferentes doses de LPS em relação aos outros testes comportamentais não diferiu do perfil dos animais controle na sexta e vigésima quarta hora. As análises nestes tempos não mostram mais diferenças comportamentais entre os animais endotóxicos e os sadios, vão de encontro a dados já publicados. Pesquisas recentes evidenciaram o aparecimento de alteração no teste de suspensão pela cauda em camundongos decorridas 24h da administração de LPS (JANGRA et al., 2014; MELLO et al., 2013; OHGI et al., 2013), porém o mesmo parece não acontecer no modelo experimental utilizado neste trabalho, isso porque, principalmente na 24^a hora nossos animais já não apresentam mais as alterações clássicas da endotoxemia, pelo menos no que tange as alterações comportamentais. Thomas et al. (2014) afirma que a letargia produzida por altas doses de LPS aparece antes de 24h da administração, em sintonia com ele está Wang et al. que publicou em 2011 um artigo no qual há relato de que ratos tratados com LPS não exibem diferenças na ingestão de sacarose e nem na locomoção no campo após 24h, o que nos faz concluir que essa resposta tardia ao LPS largamente mencionada na literatura está em dependência do modelo animal.

Os resultados obtidos neste estudo complementam e dão uma visão temporal da resposta comportamental ao LPS. Com base neles pode-se afirmar que o ápice da resposta se dá às 2h, igualmente descrito por NOLDNER e SCHOTZ (2007), e com o

passar do tempo essas respostas se atenuam sendo que às 6h quase todas elas se tornam imperceptíveis, por fim, às 24h os animais tratados não se diferem em nenhum dos parâmetros analisados em relação ao grupo controle.

O aparecimento da febre iniciou duas horas após a administração da endotoxina, assim como esperado, uma vez que dados de monitoramento biotelemétrico da temperatura antecedido por injeção intraperitoneal de LPS leva a um estado febril duradouro depois de 2h do tratamento (NAVARRO et al., 2007). O monitoramento revelou ainda que a resposta térmica ao LPS é bifásica, existe uma hipotermia inicial que é seguida de febre, o que também foi observado por Yirmiya et al. (2001). Essa resposta febril tem como causa a liberação de citocinas por células inflamatórias na periferia, devido a uma ativação promovida pelo LPS, via receptores *Toll like 4* presentes nestas células. Estes mediadores da inflamação, em última instância, levam a um aumento na produção de PGE₂ no sistema nervoso central, sendo esta, o mediador final da febre ao atuar na POA. A produção central de PGE₂ pode ser estimulada pela entrada de citocinas periféricas através de órgão circunventriculares, ou estas podem ainda, estimular células perivasculares a produzir citocinas e PGE₂ centralmente.

Portanto, diante do exposto os experimentos utilizando o antagonista dos receptores de grelina foram conduzidos duas horas após administração de 200µg/Kg de LPS.

5.2 INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES GHSR-1a NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E TÉRMICAS FRENTE A ENDOTOXEMIA POR LPS

Os resultados encontrados com o uso do antagonista demonstraram que ele foi capaz atenuar o comportamento doentio induzido pelo LPS. Deste modo, pôde ser observado uma melhora no desempenho dos animais nos testes de campo aberto, preferência à sacarose, interação social. Entretanto não houve influência do antagonista dos receptores de grelina sobre o desenvolvimento da febre induzida pelo LPS.

Uma gama de estudos demonstra o papel da grelina na regulação da inflamação e expressão de citocinas inflamatórias em humanos e também roedores, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BAATAR et al., 2011). Esse papel imunossupressor nos faz pensar que haja um envolvimento da grelina no comportamento doentio que surge após ativação do

sistema imune. É nesse contexto que surge nossa idéia de pesquisar a participação dos receptores de grelina sobre o comportamento doentio desencadeado pela administração periférica de LPS. Os resultados citados e discutidos a seguir demonstram um claro envolvimento dos receptores GHS-R1a nas respostas comportamentais, mas não térmicas, derivadas da endotoxemia por LPS.

No aparato de campo aberto, ao analisar o efeito da administração central do antagonista dos receptores de grelina, previamente à administração intraperitoneal de LPS, constata-se que houve uma reversão do comportamento doentio. Hansson et al. (2011) já havia demonstrado que a infusão central de grelina faz com que ratos diminuam os cruzamentos centrais no teste de campo aberto. Em 2009, Carvajal et al. também demonstraram que a infusão intracerebroventricular de grelina gerava um comportamento tipo-ansioso quando os animais eram submetidos a este teste. Artigos publicados por Carlini et al. em 2002 e 2008 apresentaram resultados semelhantes aos que obtivemos. Ratos tratados com grelina i.c.v. apresentaram menor número de entradas e menor tempo de permanência nos braços abertos, quando submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado.

Os resultados encontrados em relação ao teste de preferência sacarose mostraram que o LPS foi capaz de reduzir a preferência à sacarose e esta redução foi revertida pelo uso do antagonista dos receptores GHSR-1a. Larson em 2006 administrou em ratos LPS e IL-1 β e observou uma redução no consumo de sacarose. A influência da grelina sobre o teste de preferência a sacarose ainda não foi descrita na literatura.

Há quase 37 anos atrás foi criado por File e Hyde o primeiro teste para análise de parâmetros preditivos ansiedade com bases etológicas que avaliava a motivação do animal para interagir com outro de sua espécie, a ele deu-se o nome de teste de interação social. Décadas após sua criação o teste se mostra eficaz no que tange a avaliação de comportamento semelhante à ansiedade em modelos murinos (FILE; SETH et al., 2003). Os resultados aqui descritos em relação ao teste revelam que um prejuízo na sinalização central da grelina melhora o desempenho dos animais no teste, de modo que os endotóxicospré-tratados com antagonista de grelina exibem maior tempo de interação quando comparado com seu respectivo controle.

O tratamento com LPS reduziu significativamente a ingestão de ração. Esta resposta é esperada pois, a anorexia é uma das principais alterações observadas durante a resposta imune ao LPS. Uma das vias responsáveis por essa alteração é mediada por PGE₂ que age sobre neurônios serotoninérgicos no núcleo da rafe, os quais são capazes

de ativar neurônios no núcleo arqueado (ARQ) liberadores do hormônio estimulante de melanócito que reduz a ingestão alimentar (ASARIAN; LANGHANS, 2010). Ao avaliar o efeito do antagonista sobre esse comportamento um resultado um tanto quanto peculiar foi encontrado: os animais endotóxicos que receberam infusão de [DLys³]-GHRP-6 aumentaram a ingestão de ração, o que pode parecer controverso diante do clássico efeito orexígeno da grelina. Hipotetiza-se que esta resposta, aparentemente contraditória, se deve a dose utilizada (1nmol) que é considerada baixa para induzir uma resposta anorexígena. Asakawa et al. (2003) demonstrou que doses de 2 e 20nmol são incapazes de alterar a ingestão alimentar na segunda hora posterior ao tratamento, porém a hipofagia torna-se visível quando administrados 200nmol. Os resultados deste trabalho estão de acordo com estes achados, uma vez que os animais pré-tratado com o antagonista dos receptores de grelina e tratados com salina tiveram padrão de ingestão semelhante ao do grupo pré-tratado com veículo e tratado com salina. Contudo, o pré-tratamento mostrou ser capaz de atenuar o comportamento hipofágico induzido pelo LPS.

Ao verificar as concentrações de corticosterona plasmática constatamos que o LPS foi capaz de provocar um aumento nos níveis circulantes deste hormônio. O pré-tratamento com [D-Lys³]-GHRP-6 mostrou ser capaz de reduzir os níveis de corticosterona tanto nos animais endotóxicos quanto nos animais controle. Os níveis plasmáticos de corticosterona têm sido correlacionados com aparecimento de comportamentos preditivos de um estado depressivo. Pesquisas em humanos sugerem a hipótese de que altos níveis de cortisol, análogo da corticosterona murina, estejam associados a uma maior incidência de depressão (VAMMEN et al., 2014). Reforçando esta hipótese de associação Brown et al. (2004) em seu artigo de revisão relata altos índices de depressão em pacientes com síndrome de Cushing, doença caracterizada pela presença de altos níveis de cortisol no sangue. Em ratos, o tratamento com mifepristona, potente inibidor da síntese de glicocorticoides, reduz comportamento tipo depressivo (WILSIN; HERMAN; SOLOMON, 2010). Ainda em animais, estudos demonstram que o desafio imunológico por LPS é um potente indutor da liberação de corticosterona pela adrenal, e que o tratamento com antidepressivo, como imipramina e fluoxetina, são capazes de reduzir esta liberação (YIRMIYA et al., 2001).

A grelina, assim como o LPS, parece ter efeito sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Em seu trabalho Stevanovic et al. (2007) observou que a injeção central de grelina acarretou aumento no peso da hipófise, e influenciou diretamente os

corticotrofos, fazendo com que neurônios produtores de ACTH aumentassem o volume celular e nuclear duas horas após a administração. Foram encontrados também nestes animais níveis de ACTH e corticosterona plasmática aumentados devido o tratamento com grelina. Takaya et al. (2000) ao administrar, em homens adultos, grelina por via intravenosa detectou o aumento no cortisol e ACTH sanguíneo, evidenciando que a resposta em roedores é semelhante a observado em seres humanos. Deste modo parecem coerentes os resultados encontrados neste trabalho, níveis séricos de corticosterona reduzidos nos animais tratados i.c.v com o antagonista de grelina. São vários os estudos existentes que avaliam o papel da grelina na liberação de corticosteroides, eles mostram que a maioria dos mamíferos e até peixes parecem seguir o mesmo padrão de humanos e ratos, com exceção de cães e ovelhas nos quais a grelina mostra-se incapaz de alterar o funcionamento da adrenal (KAIYA et al.2013). Cabral et al. (2012) ao administrar grelina periféricamente, i.c.v. e no PVN, revelou haver um aumento de células positivas para c-Fos no ARQ, VMN e PVN, sendo que estes neurônios ativados no PVN são positivos para CRH. Foi encontrada também, elevada expressão de RNA mensageiro para CRH no PVN após o tratamento com grelina. O autor demonstrou ainda, que a grelina não é capaz de agir diretamente nos neurônios CRH do PVN, uma vez que eles não expressam os receptores GHSR-1a, de modo que a grelina parece ativar o eixo HPA através de conexões existentes entre o PVN, ARQ e VMN.

Essa menor ativação adrenocortical induzida pelo antagonista dos receptores GHS-R1a, parece ser a chave para explicar as respostas comportamentais obtidas em nosso estudo. O LPS tem sua capacidade de promover a liberação de corticosterona comprometida pelo antagonista, e esse comprometimento pode ter sido o responsável por reduzir o aparecimento do comportamento doentio nos animais endotóxicos. Deste modo pode-se sugerir que a grelina tem papel crucial na ativação do eixo HPA, produção de corticosterona e gênese do comportamento doentio decorrente do desafio imunológico por LPS.

Pouco tempo após a descoberta da grelina, Asakawa et al. (2001) estudou o efeito, do recém descoberto hormônio, sobre comportamentos relacionados à ansiedade e constatou que tanto a injeção i.c.v. quanto a i.p. fazia com que os animais diminuíssem as entradas e o tempo de permanência no braços aberto do labirinto em cruz elevado. Por meio de um experimento adicional o pesquisador descobriu que o efeito ansiogênico da grelina era mediado por ativação do eixo HPA, tendo em vista que o antagonista dos receptores de CRH aboliu esse efeito ansiogênico. De forma complementar a utilização

da técnica de DNA *antisense* para impedir a expressão gênica de grelina centralmente mostrou-se capaz de reduzir comportamentos preditivos de ansiedade e depressão em ratos. Os animais que receberam infusão i.c.v. de DNA *antisense* para grelina diminuíram o tempo de imobilidade no teste de nado forçado, aumentaram o número de entradas e o tempo de permanência no claro no teste de claro-escuro e reduziram os eventos de *freezing* no teste de medo condicionado (KANEHISA et al, 2006).

Os testes comportamentais usados no presente estudo são clássicos na avaliação do comportamento tipo ansioso e tipo depressivo, o que é coerente uma vez que os denominados *sickness behavior* e *depressive like-behavior* apresentam inúmeros componentes em comum. Para MOREAU (2008) o comportamento doentio apresenta vários sintomas que se sobrepõem aos característicos da depressão, incluindo diminuição da atividade motora, anedonia, anorexia e ativação o eixo HPA. Os resultados que encontramos, em todos os testes conduzidos, nos permitem concluir que as alterações comportamentais acarretadas pelo LPS são atenuadas e/ou revertidos pelo pré-tratamento agudo com [D-Lys³]-GHRP-6, o que, provavelmente, se deve ao seu efeito inibitório sobre a liberação de corticosterona.

Ao analisar os resultados encontrados neste estudo não se pode deixar de ponderar a respeito do papel da citocinas no comportamento doentio e a relação delas com a grelina. Não há dúvidas de que o tratamento com LPS provoca ativação de células imunes que fazem aumentar os níveis circulantes de citocinas pró-inflamatória, vistas como peças-chave no desenvolvimento do referido comportamento (SZENTIRMAI; KRUEGER, 2014). Diante da informação de que a grelina exerce efeito imunomodulador por meio da redução da liberação de citocinas por células inflamatórias (WESEEM et al., 2008) pode surgir um questionamento: o animal tratado com antagonista não deveria exibir piora no comportamento doentio devido a um aumento na produção de citocinas?

Acredita-se veementemente que a resposta seja sim, caso seja administrado periféricamente. Ao infundir [DLys³]-GHRP-6 centralmente cre-se que ele não foi capaz de alterar a resposta imune periférica ao LPS. Deste modo provavelmente ocorreu um aumento nos níveis séricos de citocinas que induziu o aparecimento do comportamento doentio, porém de forma tênue devido a uma hiporresponsividade do eixo HHA acarretado pelo antagonista dos receptores de grelina.

O monitoramento biotelmétrico da temperatura corporal mostrou que o antagonismo dos receptores GHS-R1a foi incapaz de influenciar a resposta febril

decorrente do desafio com LPS. Este resultado também pode parecer controverso aos dados da literatura como os de Soriano (2011) que reportam a atenuação da febre endotóxica induzida pelo LPS em animais pré-tratados com grelina por via intraperitoneal. Todavia, o presente resultado é bastante coerente se levarmos em consideração que neste trabalho utilizou-se a via intracerebroventricular para a administração do antagonista. Como já citado anteriormente, levanta-se a hipótese de que o tratamento com [DLys³]-GHRP-6 não é capaz de alterar a produção periférica de citocinas estimulada pelo LPS.

Já é bem descrito na literatura que a febre surgida em virtude da endotoxemia se deve principalmente a produção de citocinas na periferia e a sinalização exercida por elas que leva a produção de PGE₂ no sistema nervoso central e alteração no *setpoint* termorregulatório. O fato de que o modelo experimental empregado neste trabalho, provavelmente, não acarrete alterações na produção de citocinas na periferia é então esperado que não haja qualquer impedimento para o desenvolvimento da febre. Sendo assim, é possível sugerir a existência uma modulação central sobre o comportamento doentio e ativação do eixo HPA, mas não sobre a termorregulação durante a endotoxemia

6 CONCLUSÃO

O primeiro conjunto de experimentos do presente trabalho nos permite ter uma visão temporal do efeito LPS sobre o comportamento animal e concluir que o efeito máximo da toxina, no tangente a indução do comportamento doentio, se dá na 2h pós-tratamento. Decorridas 6h e 24h os animais não exibem mais comportamento típicos de estados doentios. Adicionalmente chegamos à conclusão de que o aparecimento do comportamento doentio, na segunda hora, pode ser percebido mesmo lançando mão de doses relativamente baixa como é o caso da 200 μ g/Kg e que o aumento da dose não acarreta aumento proporcional do comportamento doentio o que pôde ser percebido nas análises conduzidas empregando as doses de com 500 μ g/Kg e 1000 μ g/Kg.

O segundo grupo de experimentos nos permite concluir que administração aguda e central do antagonista dos receptores de grelina é capaz de atenuar o comportamento doentio derivado da endotoxemia, sugerindo que a grelina é um dos agentes moduladores endógenos do comportamento doentio e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, porém não modula as respostas termorregulatórias diante da endotoxemia.

REFERÊNCIAS

- ANEL R.; KUMAR A. Human endotoxemia and human sepsis: limits to the model. **Critical Care** v. 9, p. 151-152, 2005.
- ASAKAWA, A. et al. A Role of Ghrelin in Neuroendocrine and Behavioral Responses to Stress in Mice. **Neuroendocrinology** v. 74, p. 143–147, 2001.
- ASAKAWA, A. et al. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. **Gut** v. 52, p. 947–952, 2003
- ASARIAN, L.; LANGHANS, W. A new look on brain mechanisms of acute illness anorexia. **Physiology & Behavior** v. 100, p. 464–471, 2010.
- ATALAYER, D. et al. Ghrelin in eating disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** v. 40, p. 70-82, 2013.
- AUBERT, A. et al. Pyrogens specifically disrupt the acquisition of a task involving cognitive processing in the rat. **Brain, Behavior, and Immunity** v. 9, p. 129-148, 1995.
- AUBERT, A. Sickness and behavior in animals: a motivational perspective. **Neuroscience and Bio behavioral Reviews** v. 23, p. 1029-1036, 1999.
- BAATAR, D.; PATEL, K.; TAUB, D.D. The effects of ghrelin on inflammation and the immune system. **Molecular and Cellular Endocrinology** v. 340, p. 44– 58, 2011.
- BANKS, W. A.; ERICKSON, M. A. The blood-brain-barrier and immune function and dysfunction. **Neurobiol Dis.** v. 37, p. 26-23, 2010.
- BEISHUIZEN, A. THIJS, L. G. Endotoxin and the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Journal of Endotoxin Research** v. 9, n. 1, p. 3-24, 2003.
- BICEGO, K.C.; BARROS, R.C.H.; BRANCO, L.G.S. Physiology of temperature regulation: Comparative aspects. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A** v. 147, p. 616–639, 2007.
- BLATTEIS, C.M. Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacology & Therapeutics** v. 111, p. 194 – 223, 2006.
- BLOM, W. A. et al. Ghrelin response to carbohydrate-enriched breakfast is related to insulin. **Am. J Clin. Nutri.** v. 81, p. 367-375, 2005.
- BOULANT, J. A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clinical Infectious Diseases** v. 31, p. 157-161, 2000.

BRIGITTE, S. K. et al. Evidence that PGE₂ in the dorsal and median raphe nuclei is involved in LPS-induced anorexia in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 99, p. 437–443, 2011.

BROWN, E. S. et al. Association of depression with medical illness: Does cortisol play a role? **Biol Psychiatry** v. 55, p. 1-9, 2004.

BROWN L. M. et al. Intraventricular (i3vt) ghrelin increases food intake in fatty Zucker rats. **Peptides** v. 28, p. 612-616, 2007.

BURNS, G.; RAMOS, A.; MUCHLINSKI, A. Fever response in North American snakes. **J. Herpetol.** v. 30, p. 133–139, 1996.

CABRAL, A. et al. Ghrelin Indirectly Activates Hypophysiotropic CRF Neurons in Rodents. **PLoS ONE** v. 7, n. 2, p. 1-10, 2012.

CAMIÑA, J.P. Cell biology of the ghrelin receptor. **Journal of Neuroendocrinology** v. 18, p. 657-666, 2006.

CARLINI, V. P. et al. Decreased memory for novel object recognition in chronically food-restricted mice is reversed by acute ghrelin administration. **Neuroscience** v. 153, n. 4, p. 929-934, 2008.

CARVAJAL, P. et al. Central ghrelin increases anxiety in the Open Field test and impairs retention memory in a passive avoidance task in neonatal chicks. **Neurobiology of Learning and Memory** v. 91, p. 402–407, 2009.

CATANIA, A.; SUFFREDINI, A.F.; LIPTON, J.M. Endotoxin causes release of alpha-melanocyte-stimulating hormone in normal human subjects. **Neuroimmunomodulation** v. 2, p. 258-262, 1995.

CHAUDRY, I.H. Sepsis: lessons learned in the last century and future directions. **Arch Surg** v. 134, p. 922-929, 1999,

COSTA, H. H. V.; VILELA, F.C., GIUSTI-PAIVA, A. Continuous central infusion of cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases maternal care in lactating rats: Consequences for fear conditioning in adulthood males. **Behavioural Brain Research** v. 257, p. 31– 38, 2013.

CRUNFLI, F. VILELA, F. C., GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of dipyrone. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 2014.

CURRIE, P. J. et al. Ghrelin is an orexigenic peptide and elicits anxiety-like behaviors following administration into discrete regions of the hypothalamus. **Behavioural Brain Research** v.226, p. 96– 105, 2012.

D'HAENEN, H. Measurement of anhedonia. **EurPsychiatry** v. 11, p. 335-343, 1996.

DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. **Immunol Allergy Clin N Am** v. 29, p. 247–264, 2009.

DANTZER, R. Cytokines sickness behavior, and depression. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 20, p. 247-264, 2009.

DANTZER, R.; KELLEY, K.W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. **Brain, Behavior, and Immunity** v. 21, p. 153–160, 2007.

DANTZER, R.; ROSE-MARIE, B; KELLEY, K.W. Androgen-dependent vasopressinergic neurotransmission attenuates interleukin-1-induced sickness behavior. **Brain Research** v. 557, p. 115-120, 1991.

DE PAIVA, V. N. et al. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. **Brain, Behavior and Immunity** v. 215, p. 146-151, 2010.

DEITCH, E. A. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. **Shock** v. 9, p. 1-11, 1998

DER-AVAKIAN, A.; MARKOU, A. Withdrawal from chronic exposure to amphetamine, but not nicotine, leads to an immediate and enduring deficit in motivated behavior without affecting social interaction in rats. **BehavPharmacol.** v. 21, n. 4, p. 359–368, 2014.

DISSE, E. et al. Peripheral ghrelin enhances sweet taste food consumption and preference, regardless of its caloric content. **Physiology & Behavior** v. 101, p. 277-281, 2010.

DIXIT, V. D.; TAUB, D. Ghrelin and immunity: A young player in an old field Experimental. **Gerontology** v. 40, p. 900–910, 2005.

DIXIT, V. D. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. **The Journal of Clinical Investigation** v. 114, p. 57-66, 2004.

ELIAS, L. L. K. et al. Effect of Plasma Osmolality on Pituitary-Adrenal Responses to Corticotropin-Releasing Hormone and Atrial Natriuretic Peptide Changes in Central Diabetes Insipidus. **The journal of clinical endocrinology & metabolism** v. 82, n. 4, p. 1243-1247, 1997

ELIAS, P. C. L. et al. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis up-regulation in rats submitted to pituitary stalk compression. **Journal of Endocrinology** v.180, p. 297–302, 2004.

ENGBLOM, D. et al. Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain barrier. *Journal of Molecular Medicine* v. 80, n. 1, p. 5-15, 2002.

ENGELAND, C. G.; KAVALIERS, M.; OSSENKOPP, K. P. Influence of the estrous cycle on tolerance development to LPS-induced sickness behaviors in rats. **Psychoneuroendocrinology** v. 31, p. 510-525, 2006.

FILE, S. E. et al. Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor. **Physiology & Behavior** v. 54, p. 1109-1111, 1993.

FILE, S. E.; HYDE, J. R. G. Can social interaction be used to measure anxiety? **Br J Pharmacol.** v. 62, p. 19-24, 1978.

FILE, S. E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **European Journal of Pharmacology** v. 463, p. 35-53, 2003.

FRENOIS, F. et al. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology** v. 32, p. 516–531, 2007.

FREUDENBERG, M.A. et al. Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to *Salmonella typhimurium* infection: LPS, a primary target for recognition of Gram-negative bacteria. **Microbes and Infection** v. 3, p. 1213–1222, 2001.

FUJINO, K. et al. Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract conscious fed rats. **J Physiol** v. 550, n. 1, p. 227-240, 2003.

GALA, R.R. Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. **Proceeding of the society for experimental biology and medicine** v. 198, n. 1, p. 513-527, 1991.

GARCÍA-GARCÍA, F. et al. Ghrelin and its interactions with growth hormone, leptin and orexins: Implications for the sleep wake cycle and metabolism. **Sleep Medicine Reviews** v. 18, p. 89-97.

GAYLE, D. et al. Lipopolysaccharide (LPS). – and muramyl dipeptide (MDP)-induced anorexia during refeeding following acute fasting: characterization of brain cytokine and neuropeptide systems mRNAs. **Brain Research** v. 795, p. 77–86, 1998.

GILBERT, S. S. et al. Thermoregulation as a sleep signaling system. **Sleep Medicine Reviews** v. 8, p. 81-93, 2004.

GILG, LUTZ. The orexigenic effect of peripheral ghrelin differs between rats of different age and with different baseline food intake and it may in part be mediated by the area postrema. **Physiology & Behavior** v. 87, p. 353-359, 2006.

GNANAPAVAN, S. et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 87, p. 2988-2991, 2002.

GORDON, C.J. The mouse: An “average” homeotherm. **Journal of Thermal Biology** v. 37, p. 286–290, 2012.

HANSSON, C. et al. Central administration of ghrelin alters emotional responses in rats: behavioural, electrophysiological and molecular evidence. **Neuroscience** v. 180, p. 201–211, 2011.

HATTORI, K. GH, GH Receptor, GH Secretagogue Receptor, and Ghrelin Expression in Human T Cells, B Cells, and Neutrophils. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** v. 86, n. 9, p. 4284–429, 2001.

HART, B. L. Biological basis of the behavior sickness animals. **Neurosc. Biobehav. Rev.** v. 12, p. 123-137, 1988.

HENNESSY, M. B. et al. Sociality and sickness: have cytokines evolved to serve social functions beyond times of pathogen exposure? **Brain Behav Immun.** v. 0, p.15-20, 2014.

HESSE, D.G. et al. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. **Surg Gynecol Obstet** v. 166, p. 147-153, 1988.

HEUMANN, D; ROGER, T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. **Clinica Chimica Acta** v. 323, p. 59–72.

HOSADA, H. et al. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. **Biochemical and Biophysical Research** v. 279, p. 909-913, 2000.

HOWARD, A. D. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. **Science** v. 273, n. 5277, p. 974-977, 1996.

HUTCHISON, V. H.; ERSKINE, D. J. Thermal selection and prostaglandin E1 fever in the salamander *Necturus maculosus*. **Herpetologia.** v. 26, p. 1-8, 1981.

JANDA, S. et al. The effect of stains on mortality from severe infections and sepsis: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Critical Care** v. 25, p. 656.e7-656.e22, 2010.

JANGRA, A. et al. Protective effect of mangiferin against lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behaviour in mice. **European Journal of Pharmacology** v. 740, p. 337–345, 2014.

JOHNSON, R. W. et al. Sickness behavior in birds caused by peripheral or central injection of endotoxin. **Physiology & Behavior** v. 53, p. 334-348, 1993.

JOHNSON, S.A. et al. Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. **Behavioural Brain Research** v. 168, p. 280–288, 2006

JUNIOR, J. A. L. S. et al. Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepsis em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva** v. 18, n. 1, p. 9-17, 2006.

KAIYA, H. et al. Ghrelin: A multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A** v. 149, p. 109-128, 2008

KANEHISA, M. et al. Administration of antisense DNA for ghrelin causes an antidepressant and anxiolytic response in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** v. 30, p. 1403–1407, 2006.

KENT, S. et al. Sickness behavior as a new target for drug development. **Tips** v. 13, p. 2428, 1992.

KELLY, K.W. et al. Broussard Cytokine induced sickness behavior. **Brain, Behavior and Immunity** v. 17, p. 112-118, 2003.

KELLY, K.W. The role of growth hormone in modulation of the immune response. **Annals of the New York academy sciences** v. 594, p. 95-103, 1990.

KELMER, G. Update on treatments for endotoxemia. **Vet Clin Equine** v. 25, p. 259-270, 2009.

KING, J. A. et al. Exercise and ghrelin. A narrative overview of research. **Appetite** v. 68, p. 83–91, 2013.

KINOSHITA D. et al. Behavioral effects of LPS in adult, middle-aged and aged mice. **Physiology & Behavior** v. 96, p. 328–332, 2009.

KLUGER, M.J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiol. Rev.** v. 71, p.93–127, 1991.

KLUGER, M.J. Fever in the frog *Hyalacnerea*. **J. Therm. Biol.** v. 2, p. 79–88, 1977.

KLUGER, M.J. Is fever beneficial? **The Yale Journal of biology and medicine.** v. 59, p. 89-95, 1986.

KOJIMA, M. et al. Ghrelin is a growth-hormone releasing acylated peptide from stomach. **Nature** v. 402, p. 656-660, 1999.

KOJIMA, M. et al. Ghrelin: Discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. **TRENDS in Endocrinology & Metabolism** v. 12, p. 118122, 2001.

KOJIMA, M. et al. Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. **Horm. Res.** 56(suppl) v. 1, p. S93-97, 2001.

KOPF, B. S. et al. Evidence that PGE₂ in the dorsal and median raphe nuclei is involved in LPS-induced anorexia in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 99, p. 437-443, 2011.

KUHT, J.; FARMERY, A.D. Body temperature and its Regulation. **Anaesthesia and intensive care medicine** v. 15, n. 6, 273-278, 2014.

KUMAR, A. Experimental human endotoxemia is associated with depression of load-independent contractility indices: prevention by the lipid analogue E5531. **Chest** v. 126, p. 860-867, 2004.

LAGOA, C. E. et al. Effects of volume resuscitation on splanchnic perfusion in canine model of severe sepsis induced by live *Escherichia coli* infusion. **Crit Care** v. 8, p. 221-228, 2004.

LANG, J. W. Crocodylian thermal selection. *Wildlife Management: Crocodiles and Alligators*. **Surrey Beatty** v. 1, p. 301–337, 1987.

LARSON, S. J. Lipopolysaccharide and interleukin-1 β decrease sucrose intake but do not affect expression of place preference in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 84, p. 429–435, 2006.

LI, J et al. Increased sucrose intake and corresponding c-Fos in amygdala and parabrachial nucleus of dietary obese rats. **Neuroscience Letters** v. 525, p. 111–116, 2012.

LIU, B.; GARCIA, E. A.; KORBONITS, M. Genetic studies on the ghrelin, growth hormone secretagogue receptor (GHSR) and ghrelin O-acetyl transferase (GOAT) genes. **Peptides** v. 32, p. 2191-2207, 2011.

LUTTER, M. The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. **Nat Neurosci.** v. 11, n. 7, p. 752-753, 2009.

MACARI, M. et al. Effects of endotoxin, interleukin-1 β and prostaglandin injections on fever response in broilers. **Br. Poult. Sci.** v. 34, p. 1035–1042, 1993.

MACCARTHY, O. D. et al. The role of fever in appetite suppression after endotoxin administration. **The American journal of clinical nutrition** v. 40, p. 310-316, 1984.

MAFRA, D. et al. Relationship between total ghrelin and inflammation in hemodialysis patients. **Peptides** v. 32, p. 358-361, 2011.

MARTIN, S. A. et al. Effects of voluntary Wheel running on LPS-induced sickness behavior in aged mice. **Brain, Behavior, and Immunity** v. 29, p. 113-123, 2013.

MARTIN, S.A. et al. Effects of voluntary wheel running on LPS-induced sickness behavior in aged mice. **Brain, Behavior, and Immunity** v. 29, p. 113–123, 2013.

MARTYNHAK, B. J. et al. Neonatal exposure to Constant light prevents anhedonia-like behavior induced by Constant light exposure in adulthood. **Behavioural Brain Research** v. 22, p. 10-14, 2011.

MCCUSKER, R. H.; KELLY, K. W. Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. **J Exp Biol.** v. 216, p. 84-98, 2013.

MELLO, B. S. F. et al. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **Journal of Psychiatric Research** v. 47, p. 1521-1529, 2013.

MICHIE, H. R. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. **N Engl J Med** v. 318, p. 1481-1486, 1988.

MOLTZ, H. Fever: causes and consequences. **Neuroscience and BioBehavioral reviews** v. 17, p. 237-269, 1993.

MONAGAS, W. R.; GATTEN JR., R.E. Behavioural fever in the turtles *Terrapene Carolina* and *Chrysemys picta*. **Journal of thermal biology** v. 8, n. 3, p. 285-288, 1983.

MOREAU, M. et al. Inoculation of Bacillus Calmette-Guerin to mice induces an acute episode of sickness behavior followed by chronic depressive-like behavior. **Brain, Behavior, and Immunity** v. 22, p. 1087-1095, 2008.

MURRAY, M. J.; MURRAY, A. B. Anorexia of infection as a mechanism of host defense. **Am J Clin Nutr.** v. 32, p. 593-596, 1979.

MYHRE, K. et al. Fever and behavioral temperature regulation in the frog *Rana sculentata*. **Acta Physiol Scand.** v. 101, p. 219-229, 1977.

NAKASHIMA, K. Ghrelin gene polymorphism is associated with depression, but not panic disorder. **Psychiatr Genet** 8: 257, 2008.

NAVARRO, V. P.; ROCHA, M. J. A.; BRANCO, L. G. S. Reduced central c-fos expression and febrile response to repeated LPS injection into periodontal tissue of rats. **Brain Research** v. 1152, p. 57-63, 2007.

NISHIO, K. et al. Attenuation of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytotoxicity by tocopherols and tocotrienols. **Redox Biology** v. 1, p. 97-103, 2013.

NÖLDNER, M.; SCHÖTZ, K. Inhibition of lipopolysaccharid-induced sickness behavior by a dry extract from the roots of *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) in mice. **Phytomedicine** v. 14, p. 27-31, 2007.

OGOINA, D. Fever, fever patterns and diseases called "fever" – A review. **Journal of Infection and Public Health** v. 4, p. 108-124, 2011.

OHGI, Y. et al. Effects of antidepressants on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 103, p. 853–859, 2013.

O'REILLY, B., VANDER, A. J., KLUGER, M. J. Effects of chronic infusion of lipopolysaccharide on food intake and body temperature of the rat. **Physiology & Behavior** v. 42, p. 287-291, 1988.

PAJKRT, D. et al. Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. **J Exp Med** v. 184, p. 1601-1608, 1996.

PECCHI, E. et al. Prostaglandins and sickness behavior: Old story, new insights. **Physiology & Behavior** v. 97, p. 279-292, 2009.

PREAS, H. L. Effect of endotoxin on ventilation and breath variability: role of cyclooxygenase pathway. **Am J Respir Crit Care Med** v. 164, n. 4, p. 620-626, 2001.

PRUT, L.; BELGUNZ, C. The open Field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology** v. 463, p. 3-33, 2003.

RAMACHANDRAN, G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis. **Virulence** v. 5, n. 1, p. 213-218, 2014.

REINHART, K. et al. O ônus da sepse: uma chamada em apoio ao Dia Mundial da Sepse 2013. **Rev Bras TerIntensiva** v. 25, n. 1, p. 3-5, 2013.

RIBEIRO D. E. et al. Inhibition of nitric oxide synthase accentuates endotoxin - induced sickness behavior in mice. **PharmacolBiochem Behav.** v. 103, n. 3, p. 535-40, 2013.

RIBEIRO D. E. et al. Inhibition of nitric oxide synthase accentuates edotoxin-induced sickness behavior in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 103, p. 535-540, 2013.

ROCHE, M. et al. In vivo modulation of LPS-induced alterations in brain and peripheral cytokines and HPA axis activity by cannabinoids. **Journal of Neuroimmunology** v. 181, p. 57–67, 2006.

RORATO R., et al. Cannabinoid CB1 receptor restrains accentuated activity of hypothalamic corticotropin-releasing factor and brainstem tyrosine hydroxylase neurons in endotoxemia-induced hypophagia in rats. **Neuropharmacology** v. 63, p. 154-160, 2012.

ROTH, J.; SOUZA, G. E. P. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Braz J Med Res.** v. 34, n. 3, p. 301-314, 2001.

SALLES, M. J. C. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepsis - revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. **Ver Ass Med Brasil** v. 45, n. 1, p. 86-92, 1999.

SERRATS, J.; SAWCHENKO, P. E. How T-cell-dependent and independent challenges access the brain: vascular and neural responses to bacterial lipopolysaccharide and staphylococcal enterotoxin B. **Brain Behav Immun.** v. 23, p.1038-1052, 2009.

SHANKMAN, S. A. et al. Does physical anhedonia play a role in depression? A 20-year longitudinal study. **Journal Affective Disorders** v. 120, p. 170-176, 2010.

SHOUSA, S. et al. Different effects of peripheral and central ghrelin on regulation of food intake in the Japanese quail. **General and Comparative Endocrinology** v. 141, p. 178-183, 2005.

SMITH, R. G. et al. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. **Endocrine Reviews** v. 18, n. 5, p. 621-645, 1997.

SONCINI, R. et al. Dipyron attenuates acute sickness response to lipopolysaccharide in mice. **Neuroscience Letters** v. 516, p. 114-118, 2012.

SORIANO, R. N. et al. Exogenous ghrelin attenuates endotoxin fever in rats. **Peptides** v. 32, p. 2372-2376, 2011.

STEVANOVIĆ, D. et al. The effect of centrally administered ghrelin on pituitary ACTH cells and circulating ACTH and corticosterone in rats. **Life Sciences** v. 80, p. 867-872, 2007.

SUFFREDINI A. F. et al. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. **N Engl J Med** v. 321, p. 280-287, 1989.

SUFFREDINI A. F.; HARPEL, P. C.; PARRILLO, J. E. Promotion and subsequent inhibition of plasminogen activation after administration of intravenous endotoxin to normal subjects. **N Engl J Med** v. 320, p. 1165-1172, 1989.

SUFFREDINI, A. F. et al. Pulmonary and oxygen transport effects of intravenously administered endotoxin in normal humans. **Am Rev Resp Dis** v. 145, p. 1398-1403, 1992.

SUFFREDINI, A. F.; HARPEL, P. C.; PARRILLO, J. E. Promotion and subsequent inhibition of plasminogen activation after administration of intravenous endotoxin to normal subjects. **N Engl J Med** v. 320, p. 1165-1172, 1989.

SWIERGIEL, A. H.; DUNN, A. J. Effects of interleukin-1 β and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 86, p. 651-659, 2007.

SZENTIRMAI, É.; KRUEGER, J.M. Sickness behaviour after lipopolysaccharide treatment in ghrelin deficient mice. **Brain, Behavior, and Immunity** v. 36, p. 200-206, 2014.

TAKAYA, K. et al. Ghrelin strongly stimulates growth hormone (GH) release in humans. **The journal of clinical endocrinology & metabolism** v. 85, n. 12, p. 4908-4911, 2000.

TEELING, J. L. et al. The effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: implications for role of COX-1. **Brain, Behavior and Immunity** v. 24, p. 409-419, 2010.

THOMAS, R. C. et al. Exploring LPS-induced sepsis in rats and mice as a model to study potential protective effects of the nociceptin/orphanin FQ system. **Peptides** v. 61, p. 56–60, 2014.

TÓTH, K. et al. Effects of intraamygdaloid microinjections of acylated-ghrelin on liquid food intake of rats. **Brain Research Bulletin** v. 77, p. 105-111, 2008.

TOWNSEND, B. E. et al. Dietary broccoli mildly improves neuroinflammation in aged mice but does not reduce lipopolysaccharide-induced sickness behavior. **Nutrition Research** v. 34, p. 990-999, 2014.

TURRIN, N. P. et al. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine Mrna induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide. **Brain Research Bulletin** v. 54, n. 4, p. 443-453, 2001.

UKKOLA, O. Endocrinological activities of ghrelin: new insights. **European Journal Internal Medicine** v. 14, p. 351-356, 2003.

VAMMEN, M. A. et al. Salivary cortisol and depression in public sector employees: Cross-sectional and short term follow-up findings. **Psychoneuroendocrinology** v. 41, p. 6374, 2014.

VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid receptor agonist disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. **Behavioural Brain Research** v. 263, p. 190197, 2014.

VLASOVA, M. A.; JÄRVINEN, K.; HERZIG, K. H. Cardiovascular effects of ghrelin antagonist in conscious rats. **Regulatory Peptides** v. 156, p. 72-76, 2009.

VON DER MOHLEN, M.A et al. Inhibition of endotoxin-induced cytokine release and neutrophil activation in humans by use of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein. **J Infect Dis** v. 172, p. 144-151, 1995.

WANG, D. et al. Chronic blockade of glucocorticoid receptors by RU486 enhances lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour and cytokine production in rats. **Brain, Behavior, and Immunity** v. 25, p. 706–714, 2011.

WANG, W. et al. Ghrelin protects mice against endotoxemia-induced acute kidney injury. **Am J Physiol Renal Physiol** v. 297, p. 1032-1037, 2009.

WASEEM, T. et al. Exogenous ghrelin modulates release of pro- and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. **Surgery** v. 143, p. 334-342, 2008.

WHEELER, D. Temperature regulation. **Surgery**. v. 24, 12, p. 446-451, 2006.

WULSIN, A. C.; HERMAN, J. P.; SOLOMON, M. B. Mifepristone decreases depression-like behavior and modulates neuroendocrine and central hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responsiveness to stress. **Psychoneuroendocrinology** v. 35, p. 1100-1112, 2010.

YANG, J. et al. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite stimulating peptide hormone. **Cell** v. 132, n. 3, p. 387-396, 2008.

YIRMIYA, R. et al. Effects of Antidepressant Drugs on the Behavioral and Physiological Responses to Lipopolysaccharide (LPS) in Rodents. **Neuropsychopharmacology** v. 24, n. 5, p. 532-544, 2001.

YIRMYA, R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. **Brain Research** v. 711, p. 163-174, 1996.

ZARDI, E. M. et al. Prostacyclin in sepsis: a systematic review. **Prostaglandins & other Lipid Mediators** v. 83, p. 1-24, 2007.

ZEISBERGER, E. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. **Journal of Thermal Biology** v. 24, p. 287-326, 1999.