

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

VANESSA CARDOSO SILVA

**INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE O COMPORTAMENTO DOENTIO
E A RESPOSTA FEBRIL DURANTE O DESAFIO IMUNOLÓGICO**

ALFENAS/MG

2015

VANESSA CARDOSO SILVA

**INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE O COMPORTAMENTO DOENTIO
E A RESPOSTA FEBRIL DURANTE O DESAFIO IMUNOLÓGICO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG.

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

Silva, Cardoso Vanessa.

Influência do hipotireoidismo sobre o comportamento doente e a resposta febril durante o desafio imunológico / Vanessa Cardoso Silva. - Alfenas, 2015.

101 f.

Orientador: Alexandre Giusti-Paiva.

Tese (Doutorado em Fisiologia) Universidade Federal de Alfenas, 2015.

Bibliografia.

1. Hipotireoidismo. 2. Endotoxemia. 3. Comportamento Animal. 4. Febre. I. Giusti-Paiva, Alexandre. II. Título.

CDD-571

VANESSA CARDOSO SILVA

**INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE O COMPORTAMENTO DOENTIO
E A RESPOSTA FEBRIL DURANTE O DESAFIO IMUNOLÓGICO**

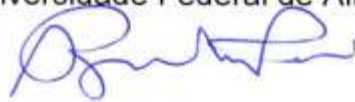
A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG.
Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia.

Aprovada em: 23/07/2015

Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



Prof. Dr. Giovane Galdino Souza

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

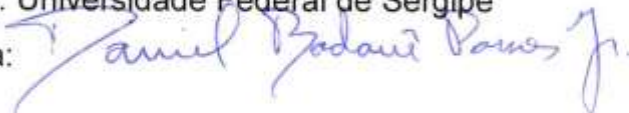
Assinatura:



Prof. Dr. Daniel Badauê Passos Júnior

Instituição: Universidade Federal de Sergipe

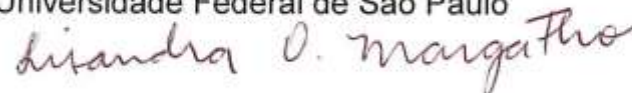
Assinatura:



Prof^ª. Dr^ª. Lisandra Oliveira Margatho

Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Assinatura:



Prof^ª. Dr^ª. Lucila Leico Kagohara Elias

Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Assinatura:



Aos meus pais, por tudo que sou, com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, que não me deixou desistir nos momentos mais difíceis. Toda honra e glória ao autor da minha história e Senhor da minha vida!

À minha mãe, que deu o primeiro passo para que este plano se realizasse, por acreditar em mim. Sem sua coragem, eu não estaria aqui!

Ao meu pai, meu exemplo de força e resiliência, pelo amor e apoio demonstrados silenciosamente!

Aos meus irmãos, Hugo e Marcelo, por torcerem de longe, mas perto do coração!

Ao meu orientador, Dr. Alexandre Giusti-Paiva, por me aceitar em seu grupo de pesquisa e pela oportunidade de aprender tantas coisas novas.

Aos professores das bancas de qualificação e defesa, por gentilmente aceitarem o convite e pelas valiosas contribuições.

Aos pós-graduandos do laboratório de Fisiologia da UNIFAL, pela convivência ao longo destes 4 anos, por compartilhar vitórias e fracassos, pelas viagens, disciplinas, cafezinhos e momentos reflexivos entre um experimento e outro!

Aos que caminharam mais de perto, participando dos momentos mais preciosos desta jornada: Ana Laura Carvalho, Délcio Júnior, Layla Cabral, Lidiane Orlandi e Sílvia Enes. Nunca se esqueçam que “as árvores somo nozes”!

Às meninas que carinhosamente cuidavam do meu saudoso cachorrinho Flick, possibilitando minhas viagens aos Congressos e para visitar meus pais em Ipatinga.

Aos graduandos Eduardo Primini, Giovana Celucci e Michele Neri, que me permitiram participar dos seus primeiros passos na caminhada científica.

À querida Maria Antonieta Nogueira, secretária do PMPGCF da UNIFAL, por fazer acontecer a “parte burocrática do negócio”, sempre com um sorriso no rosto!

Aos técnicos José Reis, Marina Venâncio, às auxiliares Marília Ramos e Maria de Fátima Silva e ao bioterista João Vitorio, pela disponibilização dos animais e o cuidado com o laboratório.

Aos colegas do “cursão” na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP (FMRP-USP) Carla Martins, Juliana Bezerra, Fernanda Verchiato, Ricardo Coletti e Priscila Rivas por me ajudarem a enfrentar as “membranas” e o “clearance”!

À Professora Dr^a Michelle Marassi e à Ma. Natália Santos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela realização das dosagens hormonais.

Aos professores do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus de Governador Valadares (UFJF-GV), do qual eu me orgulho de fazer parte, por compreenderem minha ausência nestes momentos finais “pré-defesa”.

Às doutorandas Carla Martins e Juliana Bezerra da FMRP-USP, por me ensinarem os primeiros passos no manejo com os animais de laboratório.

Aos roedores, pequeninos, fascinantes, sem os quais este trabalho não seria possível!

À UNIFAL, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

O que vocês adoram, sem conhecer, eu lhes anuncio: o Deus que fez o mundo e tudo o que nele há é o Senhor do céu e da terra, e não habita em santuários feitos por mãos humanas.

Ele não é servido por homens, como se necessitasse de algo, porque ele mesmo dá a todos a vida, o fôlego e as demais coisas.

Nele vivemos, nos movemos e existimos.

(Trecho de Atos 17)

RESUMO

Os hormônios tireoidianos são essenciais no controle de múltiplas funções envolvidas na manutenção da homeostase, incluindo os processos de produção de calor e balanço energético. As relações entre o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e a função imunológica são complexas e ainda carecem de mais investigações. Comportamento doentio é uma expressão de um estado motivacional desencadeada pela ativação do sistema imune inato periférico, pelo qual um organismo organiza suas funções para combater a infecção. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do estado tireoidiano sobre as respostas comportamentais ao desafio imunológico. O hipotireoidismo experimental foi induzido por propiltiouracil (PTU) por 30 dias (0,05%), adicionado à água de beber. As doses de 100, 200 e 500 ug/Kg de lipopolissacarídeo foram testadas para evidenciarmos o comportamento doentio. Após, camundongos controle e tratados com PTU receberam a dose de 200 ug/kg de LPS ou solução salina (ip) e as respostas comportamentais foram avaliadas durante 24 horas. Nos camundongos com hipotireoidismo induzido pelo PTU observou-se aumento do tempo de imobilidade no nado forçado (FST), maior número de esferas escondidas (MB) e comprometimento das respostas mneicas nas tarefas de reconhecimento de objetos de longa duração (LTM) e no labirinto aquático de Moris (MWM). Durante o desafio imunológico, a locomoção em campo aberto (OF) e o tempo de *floating* no nado forçado (FST) não foram modificados duas horas após a aplicação do LPS. Porém, nas análises após 24 horas, houve redução da atividade locomotora, aumento do tempo de *floating*, diminuição da ingestão de alimentos e maior perda de peso, comprometimento da memória e menor tempo de investigação social nos camundongos tratados com PTU. Além disto, observamos um menor índice térmico associado à redução da expressão de c-Fos no núcleo paraventricular (PVN) e na área pré-óptica mediana (MPOA). Estes resultados demonstram que o estado tireoidiano modifica as respostas comportamentais ao desafio imunológico, sugerindo que os hormônios tireoidianos são essenciais para a manifestação do comportamento doentio durante a endotoxemia.

Palavras-chave: Hipotireoidismo. Endotoxemia. Comportamento doentio. Febre.

ABSTRACT

Thyroid hormones are essential to control of multiple functions involved in maintaining homeostasis, including heat production and energy balance processes. Relations between the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and immune function are complex and still require further investigation. Sickness behavior is an expression of a motivational state triggered by the activation of the peripheral innate immune system, by which an organism organizes its functions to combat the infection. The aim of this study was to evaluate the influence of thyroid status on behavior responses during endotoxemia. Experimental hypothyroidism was induced by propylthiouracil (PTU) for 30 days (0.05%, added to drinking water). Different doses (100, 200 and 500 ug/Kg) of lipopolysaccharide were tested to evidence sickness behavior. Then, control and treated with PTU mice received a 200ug/Kg LPS dose or saline (ip), and behavioral responses were evaluated for 24 hours. In mice with hypothyroidism PTU-induced were observed an increase in immobility time in the forced swimming (FST), a largest number of hidden balls (MB) and an impairment of memory answers in the long term object recognition tasks (LTM) and water maze Morris (WMM). During the immune challenge, locomotion in the open field (OF) and the floating time in the FST are not modified two hours after LPS administration. However, in the analysis after 24 hours, there was a reduction in locomotor activity, increased floating time, decreased food intake and higher weight loss, learning and memory impairment and also shorter social investigation time in PTU mice. In addition, we observed a lower thermal index and reduction of c-Fos expression in the paraventricular nucleus (PVN) and medial pre-optic area (mPOA). These results demonstrate that the thyroid status modifies the behavioral responses to immune challenge, suggesting that the thyroid hormones are essential for the manifestation of sickness behavior during endotoxemia.

Keywords: Hypothyroidism. Endotoxemia. Sickness Behavior. Fever.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Efeitos do LPS no Teste Campo Aberto.....	42
Figura 02 - Efeitos do LPS no Teste do Nado Forçado.....	42
Figura 03 - Efeitos do LPS no Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos (Curta duração).	43
Figura 4 - Efeitos do LPS no Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos (Longa duração)	44
Figura 05 - Efeitos do LPS no Teste de Esconder Esferas.....	45
Figura 06 - Efeitos do LPS no Teste de Labirinto em Cruz Elevado.....	46
Figura 07 - Efeitos do hipotireoidismo no Teste Campo Aberto durante a endotoxemia	48
Figura 08 - Efeitos do hipotireoidismo no Teste do Nado Forçado durante a endotoxemia.....	50
Figura 09 - Efeitos do hipotireoidismo no Teste de Interação Social durante a endotoxemia.....	51
Figura 10 - Efeitos do hipotireoidismo na Ingestão Alimentar e Ganho de Peso durante a endotoxemia.....	52
Figura 11 - Efeitos do hipotireoidismo no Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos (Curta duração) durante a endotoxemia.....	53
Figura 12 - Efeitos do hipotireoidismo sobre o Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos (Longa duração)	54
Figura 13 - Efeitos do hipotireoidismo no Teste do Labirinto Aquático de Morris durante a endotoxemia	56
Figura 14 - Efeitos do hipotireoidismo no Teste de Esconder Esferas durante a endotoxemia.....	57

Figura 15 - Efeitos do hipotireoidismo sobre a temperatura corporal durante a endotoxemia.....	59
Figura 16 - Efeitos do hipotireoidismo sobre a expressão de Fos No PVN e SON durante a endotoxemia.....	60
Figura 17 - Efeitos do hipotireoidismo sobre a expressão de Fos no BST e mPOA..	61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Parâmetros hormonais e biométricos em camundongos controle (CON) e tratados com propiltiouracil (PTU) por 30 dias.....40
- Tabela 2** - Análises de variância dos grupos tratados com diferentes doses de LPS no teste de Campo Aberto.....85
- Tabela 3** - Análises de variância dos grupos tratados com diferentes doses de LPS nos testes de Esconder Esferas (a) e Nado Forçado (b).....85
- Tabela 4** - Análises de variância dos grupos tratados com diferentes doses de LPS no teste de Memória de Reconhecimento de Objetos – Curta Duração.....85
- Tabela 5** - Análises de variância dos grupos tratados com diferentes doses de LPS no teste de Memória de Reconhecimento de Objetos – Longa Duração.....86
- Tabela 6** - Análises de variância dos grupos tratados com diferentes doses de LPS no teste de Labirinto em Cruz Elevado.....86
- Tabela 7** - Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com propiltiouracil (PTU) adicionado à água de beber (estado tireoideano) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) no teste do Campo Aberto.....87
- Tabela 8** - Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com propiltiouracil (PTU) adicionado à água de beber (estado tireoideano) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) no teste do Nado Forçado.....88
- Tabela 9** - Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com propiltiouracil (PTU) adicionado à água de beber (estado tireoideano) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) no teste de Interação Social.....88

Tabela 10 - Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com propiltiouracil (PTU) adicionado à água de beber (estado tireoidiano) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) no teste de Memória de Reconhecimento de Objetos.....89

Tabela 11 - Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com propiltiouracil (PTU) adicionado à água de beber (estado tireoidiano) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) na expressão de Fos.....89

LISTA DE ABREVIATURAS

BST	– lâmina da estria terminal
D1	– deiodinase tipo 1
D2	– deiodinase tipo 2
D3	– deiodinase tipo 3
HHA	– hipotálamo-hipófise-adrenal
HHT	– hipotálamo-hipófise-tireoide
HT	– hormônios tireoidianos
IL1	– interleucina 1
IL6	– interleucina 6
IR	– Índice de Reconhecimento
L	– Leste
LAM	– Labirinto Aquático de Morris
LPS	– lipopolissacarídeo
MCD	– Memória de Curta Duração
MLD	– Memória de Longa Duração
MnPOd	– núcleo pré-óptico mediano dorsal
MnPOv	– núcleo pré-óptico mediano ventral
MPOA	– área pré-ótica medial
N	– Norte
NE	– Nordeste
NO	– noroeste

O – Oeste

PTU – propiltiouracil (6-propyl-2-thiouracil)

PVN – núcleo paraventricular

S – Sul

SE – sudeste

SO – Sudoeste

SON – núcleo supraóptico

T3 – triiodotironina

T4 – tiroxina

TBG – globulina ligadora de tiroxina

TEA – tempo de exploração do objeto A

TEC – tempo de exploração do objeto C

TED – tempo de exploração do objeto D

TG – tireoglobulina

TNE – tempo de não-exploração

TNF α – fator de necrose tumoral alfa

TPO – tireoperoxidase

TRH – hormônio liberador de tireotropina

TR α – receptor de hormônio tireoidiano alfa

TR β – receptor de hormônio tireoidiano beta

TSH – hormônio estimulador da tireoide

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 ANIMAIS.....	28
3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	28
3.2.1 Indução ao hipotireoidismo experimental	28
3.2.2 Parâmetros biométricos e hormonais	29
3.2.3 Doses de LPS	29
3.2.3.1 Dosagens hormonais.....	29
3.2.4 Testes comportamentais	30
3.2.4.1 Teste do Campo Aberto	30
3.2.4.2 Teste do Nado Forçado.....	30
3.2.4.3 Teste de Interação Social.....	31
3.2.4.4 Ingestão Alimentar e Ganho de Peso.....	31
3.2.4.5 Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos	31
3.2.4.6 Teste do Labirinto Aquático de Morris	32
3.2.4.7 Teste do Labirinto em Cruz Elevado	33
3.2.4.8 Teste de Esconder Esferas	33
3.2.5 Temperatura Corporal	34
3.2.6 Expressão de Fos	34
3.2.7 Drogas	36
3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	37
4.1 EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E HORMONAIIS	37
4.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO LPS SOBRE O COMPORTAMENTO EM CAMUNDONGOS.....	37
4.3 EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE AS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS À ENDOTOXEMIA.....	38
4.4 EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE A TEMPERATURA CORPORAL DURANTE A ENDOTOXEMIA	39
4.5 EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE A ATIVAÇÃO NEURONAL DURANTE A ENDOTOXEMIA	39
5.RESULTADOS	40
5.1 EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E HORMONAIIS	40
5.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO LPS SOBRE O COMPORTAMENTO EM CAMUNDONGOS	41
5.2.1 Teste do Campo Aberto	41
5.2.2 Teste do Nado Forçado	42
5.2.3 Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos	42
5.2.4 Teste Esconder Esferas	44
5.2.5 Teste do Labirinto em Cruz Elevado	45
5.3 EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE AS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS À ENDOTOXEMIA.....	46
5.3.1 Teste do Campo Aberto	46
5.3.2 Teste do Nado Forçado	49
5.3.3 Teste de Interação Social	51
5.3.4 Ingestão Alimentar e Ganho de Peso	52
5.3.5 Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos	53
5.3.6 Teste do Labirinto Aquático de Morris	55

5.3.7 Teste de Esconder Esferas.....	57
5.4 EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE A TEMPERATURA CORPORAL DURANTE A ENDOTOXEMIA	57
5.5 EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE ATIVAÇÃO NEURONAL DURANTE A ENDOTOXEMIA	59
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS	85

1 INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos (HTs) são essenciais no desenvolvimento do Sistema Nervoso Central e no controle do metabolismo, sendo necessários para regular o consumo e armazenamento de energia a longo prazo (YEN, 2001). A manutenção de níveis adequados destes hormônios é crucial para a homeostase energética, pois controlam a síntese de ATP e a taxa de fosforilação oxidativa, ocupando papel importante nas taxas de consumo de oxigênio celular e mitocondrial. Desta forma, os HTs exercem controle sobre diversas reações metabólicas, regulando o balanço energético por diferentes mecanismos (BIANCO et al., 2006; BRIX; FUHER; BIEBERMANN, 2011).

A primeira etapa na formação dos HTs consiste no transporte do iodeto do sangue para as células foliculares, onde é oxidado, e adquire a capacidade de se combinar com o aminoácido tirosina. A tirosina é inicialmente iodetada a monoiodotirosina e, em seguida, a diiodotirosina. A combinação de uma molécula de monoiodotirosina com uma de diiodotirosina forma a triiodotironina (T3), enquanto o acoplamento de duas moléculas de diiodotirosina forma a tiroxina (T4). Cerca de 93% dos hormônios são produzidos e liberados no sangue na forma de T4, enquanto 7% são produzidos na forma de T3. Entretanto, cerca de 50% da tiroxina sofre lenta desiodetação, formando quantidade adicional de triiodotironina. Assim, o hormônio que é liberado e utilizado pelos tecidos consiste em T3, que é cerca de 4 vezes mais potente que T4 (HEDGE; WRIGHT; JUDD, 1981).

A produção dos HTs é controlada pelo hormônio estimulador da tireoide (TSH) ou tireotrofina, sintetizada pela hipófise anterior, em resposta ao hormônio liberador de tireotropina (TRH), secretado pelo hipotálamo. Por sua vez, T3 e T4 não ligados (livres) exercem retroalimentação negativa sobre a síntese e liberação de TRH e TSH, objetivando manter os níveis circulantes adequados de HTs. Por outro lado, a redução nos níveis de T3 e T4 estimulam a hipófise a liberar TSH, com o intuito de evitar a redução da biodisponibilidade dos HTs para o metabolismo (KIM, 2008).

O eixo hipotálamo-pituitária-tireoide (HPT) mantém os níveis normais de HTs no plasma, através da coordenação da conversão de T4 para T3 entre tireotrófos e

tanicitos (FONSECA et al., 2013; GOTHE et al., 1999;). A desiodação dos HTs é catalisada pelas deiodinases teciduais que são expressas em três isoformas (D1, D2, D3). Estas isoenzimas apresentam diferentes padrões de expressão durante o desenvolvimento, sendo específicas para cada tecido (YEN, 2001).

Após a estimulação pelo TSH a tireoglobulina é reabsorvida nas células foliculares e as moléculas de T4 e T3 são liberadas na circulação. O T3 pode também ser formado a partir da monodeiodinação de T4. Esta reação, catalisada pela deiodinase tipo I iodotironina (D1), consiste na fonte predominante de circulação de T3. D1 encontra-se em grande parte no rim, fígado e tireoide, enquanto que o tipo II deiodinase iodotironina (D2) está presente principalmente no músculo esquelético, sistema nervoso central e na hipófise. A iodotironina deiodinase tipo III (D3), encontrada no cérebro, pele e placenta, inativa T4 e T3 por desiodinação do anel interior, produzindo T3 reverso (rT3), uma forma inativa de T3 (BIANCO; KIM, 2008; BRENT, 2012).

Estudos sugerem que a manutenção dos níveis adequados de HTs são fundamentais na mediação da resposta inflamatória e contribuem para complexa relação entre os sistemas imune e endócrino (HODKINSON, 2009). Os HTs estão envolvidos na manutenção da função imune em resposta a estímulos ambientais e na imunossupressão mediada por estresse. Estas ações dos HTs podem ser moduladas tanto através de receptores nucleares (TRs) para regular genes-alvo quanto por ações não-genômicas, independente da síntese de proteínas (YEN, 2001; HIROI, 2006).

As alterações dos níveis ideais de HTs podem impactar a habilidade do organismo para reagir às situações de estresse, uma vez que participam das mais variadas funções metabólicas. A modulação do sistema neuroendócrino sobre a atividade do sistema imune é particularmente importante nas interações mediadas pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HPT), uma vez que as células do sistema imune contribuem para a regulação da atividade deste eixo, especialmente nos períodos de estresse imunológico. Desta forma, os HTs são agentes essenciais no processamento da resposta imune, participando diretamente da ativação dos mecanismos de defesa durante a infecção aguda (KLEIN, 2006).

Na fase inicial da resposta inflamatória, os níveis de T₃ estão diminuídos e os níveis de T₃ inativos (rT₃) estão aumentados. Os níveis séricos de T₄ diminuem entre 24 a 48 horas, enquanto os níveis de TSH permanecem inalterados. Estudos em

humanos demonstraram que os mecanismos que determinam estes ajustes incluem a diminuição da conversão do T₄ e T₃ nos tecidos extra-tireoidianos, menor taxa de fixação do T₄ em proteínas através da inibição das proteínas de transporte; disfunção do feedback negativo no eixo hipotálamo-hipofisário e inibição dos receptores nucleares dos HTs pelas citocinas (PEETERS et al., 2005).

A produção local de citocinas exerce um importante *feedback* negativo na regulação da liberação do TRH pela tireotrofina na hipófise. Citocinas pró-inflamatórias produzidas periféricamente agem diretamente na tireotrofina hipofisária para diminuir a liberação do TSH, em especial a IL-6, que apresenta potente supressão do TSH no plasma. Apesar das mudanças na concentração dos hormônios tireoidianos, a infecção aguda não causa alteração direta da função tireoidiana. Tais mudanças decorrem de modificações no eixo hipotálamo-hipofisário, alteração nos hormônios tireoidianos circulantes aderidos às proteínas, modificação na captação tecidual e metabolismo dos HTs e em seus receptores TR α e TR β (PEETERS et al., 2003).

Enquanto a glândula tireoide estabelece somente a origem do T₄ para os tecidos periféricos, a fina regulação dos HTs no meio tecidual extrapiramidal é possível pela expressão tecidual diferenciada das iodotironina deiodinases, as quais são responsáveis pela metabolização do T₄ para forma biologicamente ativa do T₃ ou bio-inativa rT₃ (MEINHOLD et al., 2010). A expressão destas deiodinases é modificada durante o curso da infecção, podendo resultar em modificações teciduais específicas do estado tireoidiano (RAY et al., 2002).

A diminuição nos níveis séricos de T₃ e o aumento nos níveis de rT₃ podem ser explicados pela ativação reduzida do T₄ pelo tipo I deiodinase (D₁) ou tipo II deiodinase (D₂), mas também por um aumento na inativação do tipo III deiodinase (D₃). O T₃ plasmático está diminuído e rT₃ plasmático está aumentado durante doenças gravemente críticas, sendo que a magnitude destas variações está relacionada com a severidade da doença. O declínio no T₃ e no T₄ sérico em modelos de doenças agudas precede a falência no D₁ hepático, sugerindo que muito da falência inicial destes hormônios deve ser atribuída à resposta de fase aguda, causando a redução dos hormônios tireoidianos ligados no plasma. (HAMBLIN et al., 1986.)

As citocinas produzidas no início da resposta inflamatória modulam a produção de tireoglobulina, reduzindo os níveis de AMP cíclico nos folículos tireoidianos, com conseqüente diminuição da liberação dos HTs. Mesmo após a recuperação dos níveis de TSH, que ocorre cerca de 12 a 24 horas após o contato com o agente infeccioso, os HTs permanecem em concentrações inferiores ao estado pré-infecção (LO et al., 1998). Estas respostas sinalizam a presença de um mecanismo intrínseco de controle do sistema imune sobre o eixo HPT, indicando a participação dos HTs nos mecanismos que determinam a resposta inflamatória, tais como a modulação da atividade das células apresentadoras de antígenos e da velocidade da síntese de citocinas (VAN HAASTEREN et al., 1994).

Um dos modelos mais comumente usados para simular a evocação do sistema imune a partir de estressores biológicos consiste na aplicação de lipopolissacarídeo (LPS), componente estrutural da membrana esquelética de bactérias Gram-negativas, o qual é facilmente reconhecido por células imunes, principalmente macrófagos. Após ser reconhecido pelos receptores *Toll-like 4* (TRL4) 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); citocinas como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 β (IL1 β) e ainda é capaz de estimular a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e a cicloxigenase 2 (COX 2) (NISHIO et al., 2013).

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). As citocinas podem sinalizar sua presença na corrente sanguínea por diferentes mecanismos. Podem alcançar o sistema nervoso central por transportadores específicos localizados na barreira hematoencefálica ou passar para o cérebro através dos órgãos circunventriculares. A sinalização das citocinas pode também ser realizada pelos nervos periféricos ou induzir a produção de prostaglandinas na interface entre o cérebro e a corrente sanguínea (ENGBLOM et al., 2002).

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). Em especial, as citocinas atuam na comunicação entre os sistemas imune e neuroendócrino, regulando a proliferação celular, a secreção de hormônios, a atividade do eixo HPA e o comportamento (DANTZER, 1998).

A resposta de fase aguda produz sintomas comportamentais como mal-estar, perda de interesse em atividades próprias da espécie, redução da ingestão de alimentos, piloereção, anorexia, diminuição do comportamento exploratório, redução do comportamento social e perda do apetite sexual (AUBERT, 1999). A este conjunto de manifestações comportamentais dá-se o nome de comportamento doentio (*Sickness behavior*), caracterizando uma estratégia evocada para poupar energia (DANTZER et al., 2001). O aparecimento do comportamento doentio é uma resposta adaptativa do animal, elaborada para combater a infecção, na medida em que cria um ambiente desfavorável ao patógeno e adequado ao estabelecimento de uma resposta imune eficaz. Tais sintomas são atribuídos à realocação de recursos energéticos para combater a infecção (HART, 1988).

Estas respostas comportamentais surgem em decorrência de uma complexa interação entre os sistemas imune e endócrino, na qual diversas moléculas têm papel de destaque como PGE₂, ciclooxigenase, óxido nítrico e principalmente as citocinas (DANTZER, 2009; DE PAIVA et al.; 2010; KELLEY et al., 2003). A liberação periférica de citocinas pode alcançar diretamente o cérebro através dos órgãos circumventriculares, e 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 micróglia, capazes de produzir citocinas centralmente. A produção destas citocinas aliada à uma maior síntese de prostaglandinas leva ao aparecimento do comportamento doentio (BANKS, ERICKSON, 2010; MCCUSKER, KELLEY, 2013; SERRATS, SAWCHENKO, 2009).

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).

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) desempenha importante papel na manutenção da homeostase durante a endotoxemia. A produção de (IL) -1, IL-6 e TNF α , as principais citocinas inflamatórias produzidas, estimulam a atividade do eixo HPA, demonstrada pelo aumento do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e, por conseguinte, dos glicocorticoides. A regulação da secreção de ACTH é um processo multifatorial que envolve principalmente dois neuro-hormônios do hipotálamo, hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina-vasopressina (AVP), sendo que as citocinas podem estimular a secreção do primeiro. Os glicocorticoides, por sua vez, exercem *feedback* negativo sobre o eixo HPA, reduzindo sua atividade, ao mesmo tempo em que controlam a infecção, devido à sua potente ação antiinflamatória. Esta interação bidirecional entre os sistemas imune e neuroendócrino é crucial para a manutenção da homeostase, em especial em situações de sobrecarga para o organismo. (BEISHUIZEN; THIJS, 2003).

Como há interação entre o eixo HPA e o sistema imune, ocorre também comunicação bidirecional entre este e o eixo HPT. O eixo HPT exerce um efeito imunomodulador na maioria dos aspectos do sistema imune (KLECHA et al., 2006). Durante a inflamação, há um ligeiro aumento nos HTs nas primeiras quatro horas, resultando em rápida inibição do eixo HPT. A integração entre os eixos HPA e HPT em resposta a endotoxemia são bem conhecidos, ocorrendo aumento da ativação do eixo HPA enquanto a atividade do eixo HPT é suprimida, durante o desafio imune agudo (BOELEN et al., 2004; DI COMITÉ et al., 2007; STRAUB, 2014).

Durante a fase inicial da infecção a produção de citocinas estimula a conversão de T4 em T3 central, causando supressão na produção do TRH e, conseqüentemente, do TSH. Como resultado, ocorre redução nos hormônios tireoidianos periféricos, o que contribui para as manifestações próprias do comportamento doentio, uma vez que este estado tireoidiano reduz a atividade metabólica como parte das adaptações para a conservação de energia em momentos críticos de estresse fisiológico (KLEIN, 2006). À medida que a infecção é controlada, a diminuição do T3 central estimula a produção de TRH, que resultará no restabelecimento das concentrações periféricas dos HTs. Este reajuste no estado tireoidiano é fundamental para a recuperação do

organismo ao estado pré-infecção, quando a mobilização de recursos energéticos é decisiva (KRUGER, 1986).

Neste contexto, alterações do estado tireoidiano podem potencialmente afetar a capacidade do organismo para reagir à infecção. Tanto o aumento na síntese e liberação dos HTs (hipertireoidismo) como sua redução (hipotireoidismo) são capazes de alterar a resposta imune, modificando as respostas metabólicas ao estresse biológico (KLECHA et al., 2006). Em geral, no hipertireoidismo ocorre uma exacerbação da resposta imune, com aumento da produção de anticorpos, maior proliferação de linfócitos, migração celular e produção de espécies reativas de oxigênio, concomitante à redução da atividade anti-inflamatória, por comprometer a atividade das enzimas anti-oxidantes (DE VITO et al., 2011). Por outro lado, o hipotireoidismo produz efeitos opostos sobre os parâmetros da função imunológica, modulando negativamente as respostas humoral e celular (KLECHA et al., 2006).

O hipotireoidismo é caracterizado por um conjunto de fatores associados à redução do o metabolismo, incluindo o ganho de peso, a longo prazo, fadiga e fraqueza, intolerância ao frio e lentidão mental (*THE ENDOCRINE SOCIETY'S CLINICAL GUIDELINES*, 2007). A redução do metabolismo basal na condição de hipotireoidismo resulta em efeitos centrais e periféricos no comportamento alimentar, termogênese, ativação locomotora e regulação autonômica (LÓPEZ et al., 2013), além de associar-se à sintomas depressivos e redução das funções cognitivas, haja visto sua participação essencial no processamento nervoso e nas funções mais elevados de aquisição e consolidação de memórias. (DE VITO et al., 2011; ANNERBO; LOKK, 2013).

Diversas drogas têm habilidade de interferir direta ou indiretamente síntese de hormônios tireoidianos. As drogas antitireoidianas mais importantes são os tiourilenos, sendo o propiltiouracil (6-n-propil-2-tiouracil, PTU) e o metimazol (1-metil- mercaptoimidazole, MMI) as mais utilizadas clinicamente. Os tiourilenos atuam inibindo de maneira potente a reação de iodinação da tirosina, a qual é catalisada pela tireoperoxidase – TPO. O propiltiouracil, além dos efeitos antitireoidianos promovidos por sua ação inibidora da TPO é também um potente inibidor da iodotironina-deiodinase tipo I, que converte o hormônio T4 em seu

metabólito ativo T3, sendo um fármaco eficaz na indução do hipotireoidismo experimental (FERREIRA et al., 2007).

Os modelos comportamentais são úteis para identificar o curso e a gravidade do comprometimento imunológico (GRANGER et al., 2013) porém, não identificamos nenhum trabalho que tenha investigado o comportamento doentio em condições de redução dos hormônios tireoidianos. Partindo do pressuposto que o hipotireoidismo afeta a capacidade de resposta imunológica e que as manifestações do comportamento doentio são úteis para se estudar a resposta à infecção, o objetivo de nossa investigação foi avaliar o comportamento doentio em camundongos com hipotireoidismo.

1. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho estão descritos abaixo.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o comportamento doentio durante a endotoxemia em camundongos com hipotireoidismo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a eficácia do modelo de indução crônica do hipotireoidismo por propiltiouracil adicionado à água de beber;
- b) Estabelecer a menor dose de LPS (100, 200 ou 500 µg/Kg) que evidencie as alterações comportamentais nos testes estudados;
- c) Avaliar a influência do hipotireoidismo nas respostas comportamentais à endotoxemia;
- d) Avaliar a influência do hipotireoidismo na febre induzida por LPS;
- e) Avaliar a influência do hipotireoidismo na ativação de áreas cerebrais durante a endotoxemia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados neste estudo estão descritos a seguir.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, com peso entre 25 e 30 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfnas. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, agrupados em número de até 12 animais por gaiola. A alimentação foi oferecida na forma de ração peletizada normoproteica e água *ad libitum*. Foram mantidos à temperatura de $23 \pm 2^\circ$, umidade de $55 \pm 15\%$; em fotoperíodo definido de 12 horas, com as luzes acesas às 07:00. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Alfnas, sob o número de protocolo 395/2012.

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os procedimentos deste estudo foram realizados conforme descrição a seguir.

3.2.1 Indução ao hipotireoidismo experimental

Nesta fase, foram utilizados camundongos com 5 semanas e pesando no mínimo 35 gramas no primeiro dia de tratamento. Para a indução do hipotireoidismo nos grupos experimentais foi utilizado propiltiouracil (6-propil-2-tiouracil, Sigma Aldrich®, USA) a 0.05%, diluído na água de beber, durante 30 dias. Os grupos controle receberam água filtrada (DONG; WADE; WILLIANS et al., 2005).

3.2.2 Parâmetros biométricos e hormonais

Os animais foram pesados para avaliação do ganho de peso e sacrificados por inalação com isoflurano. Foram realizadas as medidas do comprimento naso-anal, tomando-se a medida do focinho até o início da cauda (em centímetros) e o calculado o índice de Lee, dado pela razão entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento naso-anal. O valor resultante indica a massa corporal em relação ao comprimento do animal, sendo, portanto, útil para se identificar animais com propensão ao acúmulo de gordura. Embora seja análogo ao IMC, utilizado em humanos, o índice de Lee não é classificatório e, portanto, não deve ser utilizado isoladamente. (ROGGERS; WEBB, 1980; FERREIRA et al., 2007). As gorduras epididimal e retroperitoenal e as glândulas tireoide e paratireoides foram excisadas e pesadas.

3.2.2.1 Dosagens hormonais

Após o trigésimo dia do tratamento com o PTU, os camundongos foram decapitados e amostras de sangue foram coletadas e colocadas em tubos Eppendorfs®. As amostras sanguíneas foram centrifugadas (3000 rpm, durante 20 min), o soro separado e armazenado a -20°C. Os níveis séricos de T3 e T4 foram determinados por Radioimunoensaio (RIA) em kits específicos (MP Biomedicals, LLC, EUA). Os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

3.2.3 Dose de LPS

Para a determinação da melhor dosagem de LPS para a verificação dos efeitos sobre o comportamento doentio, foram utilizadas as dosagens de 100, 200 e 500 µg/Kg de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (026: B6 – Sigma Aldrich, USA).

A administração do LPS ou do veículo foi realizada uma única vez, por via intraperitoneal.

3.2.4 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados de acordo com a descrição a seguir.

3.2.4.1 Teste do Campo Aberto

A avaliação em campo aberto permite a verificação tanto da atividade motora voluntária quanto de sinais de ansiedade. Cada animal testado foi colocado no centro de um aparato circular, com 30 cm de diâmetro, com o piso dividido em quadrantes centrais e periféricos. A avaliação da atividade locomotora foi realizada considerando-se o número de cruzamentos que o animal realiza com as quatro patas nos quadrantes centrais e periféricos, a soma dos cruzamentos totais e a exploração vertical (*rearings*) (WILCONSON et al., 2007).

3.2.4.2 Teste do Nado Forçado

O teste de nado forçado é utilizado para a verificação de sintomas depressivos em roedores. O teste foi realizado em um béquer cilíndrico de 12 cm de diâmetro, com água mantida à temperatura de $\pm 25^{\circ}$. O animal é colocado para nadar por um período de 6 minutos, registrando-se o teste através de filmagem. Para fins de avaliação, considera-se, nos 04 minutos finais do teste, o tempo em que o animal realiza apenas o mínimo de movimentos para não afundar (tempo de imobilidade) (WILCONSON et al., 2007) ou quantifica-se o número de vezes em que o animal é encontrado em um dos 3 comportamentos, a cada 5 segundos: *floating*

(considerado de maneira semelhante ao tempo de imobilidade); *swimming* (quando o animal se movimenta e realiza rotações na periferia do aparato) e *climbing* (onde se verificam tentativas de escape do aparato, escalando suas paredes). (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977).

3.2.4.3 Teste de Interação Social

A interação social reflete um estado psicofisiológico saudável, manifestado por reações próprias da espécie. O teste em Arena consiste em confrontar o animal a ser avaliado (residente) com outro desconhecido da mesma espécie de idade inferior (visitante ou intruso). São considerados como parâmetros de avaliação a exploração anogenital, seguir o visitante ou colocar as patas dianteiras sobre ele, somando-se o tempo total em que o residente interage com o visitante. A indiferença ao visitante ou comportamentos de submissão indicam a presença de sintomas depressivos no residente. (FILE; SETH, 2003).

3.2.4.4 Avaliação da Ingestão Alimentar e Ganho de Peso

Os animais foram submetidos a 12 horas de jejum previamente à administração do LPS para estimular a ingestão de alimentos. Antes do teste, foram mensurados o peso corporal e da ração a ser oferecida. Imediatamente após as injeções, o alimento foi reapresentado a cada animal e pesado nos intervalos de 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas. A ingestão alimentar foi calculada a partir da diferença entre o peso inicial e o peso obtido a cada intervalo. A variação do peso corporal foi mensurada 24 horas após os tratamentos (DE PAIVA et al., 2010).

3.2.4.5 Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos

A memória de reconhecimento de objetos foi avaliada utilizando-se o mesmo aparato utilizado no teste de Campo Aberto. Nos três dias anteriores ao teste os

animais passaram por sessões de habituação à arena, por 15 minutos. Foram apresentados ao animal 2 objetos de formas idênticas (A e B), aguardando-se a exploração dos mesmos, por 5 minutos. Logo em seguida, foi aplicado o veículo ou uma das dosagens do lipopolissacarídeo. A memória de curta duração (MCD) foi verificada após 1 hora e 30 minutos, quando se apresentou ao animal um dos objetos do treino (A ou B) e um novo objeto, de forma diferente (C). A memória de longa duração (MLD) foi verificada 24 horas após, quando se apresentou ao animal um dos objetos do treino (A ou B) e outro novo objeto, de forma diferente (D). Os animais foram filmados durante 5 minutos para análise posterior. São considerados como parâmetros de avaliação o tempo de exploração de cada um dos objetos, o tempo de não exploração e o índice de reconhecimento (IR), calculado de acordo com a equação $IR = TEC / TEA + TEC$ para MCD e $IR = TD / TEA + TED$ para MLD, sendo TEA (tempo de exploração do objeto A; TEC (tempo de exploração do objeto C) e TED (tempo de exploração do objeto D). (HABA et al., 2012; SIOPI et al., 2012).

3.2.4.6 Labirinto Aquático de Morris

O Labirinto Aquático de Morris consiste em um tanque circular com 150 cm de diâmetro, no qual se encontra uma plataforma com 10 cm de superfície. O tanque é preenchido até uma altura em que a plataforma fique cerca de 1,5 cm emersa. Utiliza-se água corada com tinta não tóxica branca para impedir a visualização da plataforma nas sessões de aprendizado (*training trials*). São estabelecidos 4 pontos de partida dos animais (N, S, L e O) e quatro quadrantes imaginários para a colocação da plataforma (NE, NO, SE, SO). Nas paredes da sala são colocados desenhos ou quadros, servindo de pistas visuais para o aprendizado espacial. O examinador e a câmera de filmagem permanecem sempre no mesmo ponto, pois também são utilizados como referência espacial. Os animais são liberados de um dos pontos da superfície do tanque, voltados para a parede, aguardando-se que encontrem a plataforma de escape e nela permaneçam por 10 segundos seguidos. Caso o animal não localize a plataforma em um período de 120 segundos, o examinador o guia gentilmente até a superfície da plataforma e permite que

ele permaneça sobre ela durante 10 segundos. O tempo para alcançar a plataforma foi registrado em segundos (latência de escape). Os animais foram submetidos a 3 dias consecutivos com 4 largadas, com intervalo de 10 segundos, totalizando 12 largadas. Após o período de treino os animais foram submetidos a uma única largada (*Probe Trial*) com a retirada da plataforma de escape do tanque de nado. O tempo em que o animal permanece no quadrante onde se encontrava a plataforma (quadrante alvo) é contabilizado para avaliação da memória espacial (WILCONSON et al., 2007).

3.2.4.7 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O teste de labirinto em cruz elevado consiste em um aparato com dois braços abertos e dois braços fechados, ligados por uma plataforma central. Os animais foram colocados no centro do aparato, de frente para um dos braços fechados. O comportamento do animal foi filmado durante 5 minutos, avaliando-se como parâmetros de ansiedade a frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e fechados. A diminuição do número de entradas nos braços abertos sugere aumento de ansiedade no animal testado. O aumento no tempo de permanência nos braços fechados indica mesmo sintoma ou ainda pode revelar alterações da atividade motora voluntária (WILCONSON et al., 2007).

3.2.4.8 Teste de Esconder Esferas

O teste de esconder esferas (*Marble Burying*) é utilizado para a verificação da ansiedade em roedores, bem como dos efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos de fármacos e condições experimentais. Utiliza-se uma caixa de dimensões 30X60 cm com cerca de 5 cm de serragem bem compactada. Nesta serragem, dispõe-se 24 esferas de vidro translúcidas, separadas equidistantes. O animal é exposto ao ambiente com esferas por 30 minutos. A análise é realizada pela contagem do

número de esferas escondidas completamente sob a serragem. (BOER; KOOLHAAS, 2002).

3.2.5 Temperatura Corporal

Para avaliação da temperatura corporal os camundongos foram submetidos a procedimento cirúrgico para a implantação de um transmissor de temperatura no interior da cavidade peritoneal. Este procedimento foi realizado sob anestesia (cetamina-xilazina (42,0 e 4,8 mg / kg, respectivamente, IP) e ao final foi aplicado antibiótico (pentabiótico, 3,75 mg / kg im). A partir de uma laparotomia mediana, foi inserido o transmissor de temperatura (série 4000 E-Mitter; Mini Mitter, Bend, OR) na cavidade peritoneal e suturados o músculo e a pele com fio de algodão. Para evitar a hipotermia pós-cirúrgica, todos os animais foram colocados à temperatura de 32 °C durante a recuperação da anestesia. (STEINER et al., 2011).

Nos dias subsequentes à cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, nas mesmas condições anteriores. Depois de um período de cinco a sete dias, as caixas foram colocadas sobre um receptor de telemetria (Data Sciences) ligado a um computador. Após aplicação do LPS ou veículo, o registro da temperatura do corpo foi realizado em intervalos de 5 minutos, durante 08 horas. Os dados foram colhidos, exibidos graficamente no monitor e armazenados em arquivo digital. A temperatura basal foi calculada pelas médias das temperaturas aferidas nos 30 minutos antes do início do experimento. A diferença entre a temperatura basal média e a temperatura obtida a cada intervalo foi calculada para obtenção do delta de temperatura. Os dados da telemetria foram demonstrados pelo gráfico linear e estatísticas foram realizadas pela área sob a curva (AUC) calculada entre o intervalo da primeira à quarta horas e da quarta à sétima horas do teste, obtendo-se o índice térmico para estes períodos (GIUSTI-PAIVA et al., 2003.)

3.2.6 Expressão de Fos

Os animais receberam as injeções de LPS ou do veículo e duas horas depois foram anestesiados (cetamina-xilazina (42,0 e 4,8 mg / kg, respectivamente, IP) e perfundidos através de punção intracardíaca com salina (40 mL) contendo 1000U/l de heparina, seguida por paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PBS 0,1 M; 500 mL). Após sua remoção, os encéfalos foram mergulhados em fixador durante 4 horas e em seguida colocados em solução de sacarose a 30% em PBS (0,1 M) a 4°C.

Os encéfalos foram seccionados em cortes de 30 µm de espessura utilizando-se um criostato e coletados em PBS (0,01 M) e armazenados em solução *anti-freezing* até o momento dos procedimentos imunohistoquímicos. Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena (solução de H₂O₂ ,1%) por 30 minutos e os cortes foram lavados com PBS (0,01 M) 3 vezes, por 5 minutos. Posteriormente, foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas com albumina bovina 5% em 0,1 M de PBS durante uma hora. Os cortes foram processados para imunorreatividade para c-Fos, ficando incubados durante a noite com o anticorpo primário anti-fos de coelho (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA) diluído 1:10.000 em PBS (0,1 M) contendo 2% de normal *goat serum* e 0.3% Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Após lavagem, os cortes foram incubados com segundo anticorpo biotilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA, diluído 1:200 em 1.5% de *normal goat serum* - PBS) seguido pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Elite, 1:200 em PBS), ambos por 1 hora a temperatura ambiente.

Para coloração, foi empregado diaminobenzidina (DAB, Sigma - Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) intensificado com cloreto de cobalto 1% e sulfato de níquel 1%. O produto da reação conferiu uma coloração violeta escuro – preto ao núcleo (FLEMING; WALSH, 1994). Por último, os cortes foram montados utilizando Gelatina de Albrecht (1,5% gelatina/álcool 80%). As lâminas foram secas à temperatura ambiente, desidratadas com xileno e cobertas com Entellan.

As células imunorreativas para Fos foram contadas no PVN, SON, BST e mPOA, com auxílio de um microscópio Nikon modelo H55L. As imagens foram capturadas e o número de cortes representativos para cada grupo experimental foi de 4 a 7.

3.2.7 Drogas

Durante a execução deste trabalho foram utilizadas as seguintes drogas: Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* sorotipo 026:B6 e Propiltiouracil (6-propyl-2-thiouracil), ambos adquiridos da Sigma-AldrichCo (EUA); Pentabiótico (Fort Dodge Saúde Animal LTDA), Ketamina (Dopalen) e Xilazina (Dopaser). Todas as drogas administradas ip foram solubilizadas em soro fisiológico livre de pirógeno (NaCl; 0,9%; Isofarma).

3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados utilizando-se o programa do software GraphPad versão 5.0 e expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Nas análises dos parâmetros biométricos e hormonais, foi utilizado o teste T. Para a comparação dos efeitos das diferentes doses de LPS foi utilizada análise de variância ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. Nos demais experimentos, o estado tireoidiano (pré-tratamento com ou sem PTU em água) e o desafio imunológico (tratamento com solução salina ou com LPS) foram utilizados como fatores para análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância foi baseado em valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$).

4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram realizados conforme descrição a seguir.

4.1 EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E HORMONAIS

Após o trigésimo dia de tratamento com o PTU os animais (n=7 a 12) foram sacrificados para a avaliação dos parâmetros biométricos e hormonais.

4.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO LPS SOBRE O COMPORTAMENTO EM CAMUNDONGOS

Para avaliar os efeitos do LPS nos testes comportamentais os animais foram divididos em 4 grupos, sendo 1 controle, que recebeu injeção de salina (veículo) e 3 que receberam uma das doses de LPS (100, 200 ou 500 µg/Kg, por via intraperitoneal). Duas horas após os animais foram submetidos aos testes de campo aberto (n = 8 animais por grupo), nado forçado (n = 8 a 12 dose animais por grupo); esconder esferas (n = 8 animais por grupo) ou labirinto em cruz elevado (n = 8 animais por grupo). Para o teste de memória de reconhecimento de objetos, após a fase de treino, os animais (n= 8 por grupo) receberam as injeções do veículo ou uma das doses do LPS e foram filmados por 5 minutos 01 hora e 30 minutos depois para memória de curta duração e 24 horas depois para memória de longa duração.

4.3 EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE AS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS DURANTE A ENDOTOXEMIA

Para avaliar os efeitos do hipotireoidismo sobre as respostas durante a endotoxemia os animais foram divididos em quatro grupos, sendo 2 controles e 2 tratados com PTU. Cada um dos grupos recebeu as injeções do veículo ou de LPS (200 µg/kg) e foram testados nos intervalos descritos a seguir. Nos testes de campo aberto e nado forçado (n=8 a 10 animais por grupo) ou interação social (n=9 animais por grupo) as análises foram realizadas 02, 06 e 24 horas após as injeções. No teste de esconder esferas (n = 8 animais por grupo) os animais foram filmados 02 horas após as injeções. Para o teste de memória de reconhecimento de objetos, após a fase de treino, os animais (n= 8 por grupo) receberam as injeções do veículo ou uma das doses do LPS e foram filmados por 5 minutos 01 hora e 30 minutos depois para memória de curta duração e 24 horas depois para memória de longa duração. No Labirinto Aquático de Morris foram testados os intervalos de 24 horas antes do primeiro dia de treino (Pré 1T), logo após o primeiro dia de treino (Pós 1T) e logo após o 3º dia de treino (Pós 3T) em animais controle (n=9) controle para se avaliar a melhor fase para aplicação do LPS, definindo-se o intervalo Pré 1T como o mais adequado. 24 horas antes do primeiro dia receberam as injeções de veículo ou LPS (n=8 a 12 animais por grupo) foram submetidos às fases de treino. 24 horas depois do último dia de treino, os animais foram avaliados no *Probe Trial*.

4.4 EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE A TEMPERATURA CORPORAL DURANTE A ENDOTOXEMIA

Após o trigésimo dia de tratamento com o PTU os animais (n= 6 a 9) receberam as injeções do veículo ou de LPS (200 µg/kg) e foram monitorados por biotelemetria durante 08 horas para avaliação da temperatura corporal.

4.5 EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE A ATIVAÇÃO NEURONAL DURANTE A ENDOTOXEMIA

Após o trigésimo dia de tratamento com o PTU os animais (n= 4 a 7) receberam as injeções do veículo ou de LPS (200 µg/kg) e duas horas após foram perfundidos para os procedimentos imunohistoquímicos.

5 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão apresentados a seguir.

5.1 EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E HORMONAIIS

A Tabela 1 mostra os resultados dos parâmetros biométricos e hormonais dos animais controle (CON) e tratados com propiltiouracil (PTU) durante 30 dias. Os camundongos do grupo PTU apresentaram maior Índice de Lee, comprimento naso-anal inferior e diminuição no ganho de peso durante os 30 dias de tratamento. As gorduras epididimal e retroperitoneal foram maiores no grupo PTU e o peso da glândula da tireoide aumentou significativamente. Os níveis séricos dos hormônios tireoidianos foram menores no grupo PTU quando comparados ao grupo controle.

Tabela 1: Parâmetros biométricos e hormonais em camundongos controle (CON) e tratados com propiltiouracil (PTU) por 30 dias.

	CON	PTU
Índice de Lee	3.01 ± 0.02	3.09 ± 0.02 **
Comprimento naso-anal (cm)	11.63 ± 0.12	10.97 ± 0.09 ***
Ganho de peso (g)	11.82 ± 1.04	6.67 ± 0.71***
Gordura Epidimal (g/10g)	0.21 ± 0.01	0.29 ± 0.02 **
Gordura Retroperitoneal (g/10g)	0.07± 0.01	0.11±0.01*
T3 sérico (ng/dL)	55.65 ± 2.07	45.39 ± 1.53**
T4 sérico (µg/dL)	3.93 ± 0.46	1.43 ± 0.06 ***
Peso glandular (mg)	4.17± 0.15	10.78 ±0.29***

Nota: Valores expressos como média (±EPM) *P<0,05; **p<0,01 *** P<0,001

Fonte: Da autora

5.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO LPS SOBRE O COMPORTAMENTO EM CAMUNDONGOS

Os resultados das avaliações comportamentais, de temperatura e expressão neuronal estão descritos a seguir. Detalhes das análises estatísticas podem ser consultados no Anexo A, nas tabelas indicadas ao final de cada descrição.

5.2.1 Teste de Campo Aberto

A aplicação do LPS causou redução do número de entradas no centro (Figura 1A) e na periferia (Figura 1B) nas doses de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0,001$) e de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0,01$), no número total de entradas (Figura 1C) nas doses de 200 e 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0,001$) e no número de *rearings* (Figura 1D) nas doses de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0,001$) e de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0,01$), comparados ao controle. Não foram observadas diferenças na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em nenhum dos parâmetros avaliados. (Anexos – Tabela 2).

5.2.2 Teste do Nado Forçado

No teste do Nado Forçado observamos que as três doses utilizadas produzem aumento do tempo de imobilidade (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ – $p < 0,05$; 200 e 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ – $p < 0,001$). (Figura 2) (Anexos – Tabela 3b).

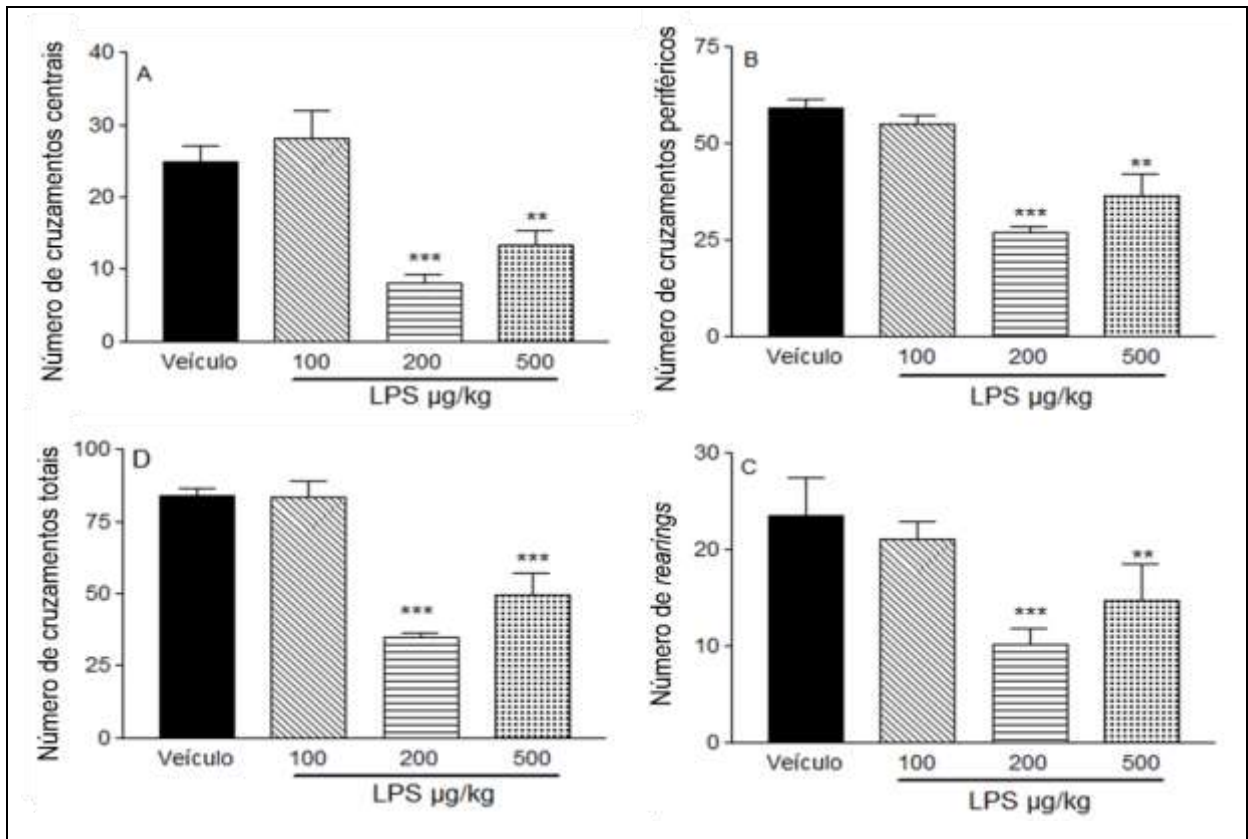


Figura 1: Efeitos do LPS no Teste Campo Aberto. (A) número de cruzamentos centrais; (B) número de cruzamentos na periferia; (C) número de cruzamentos totais; (D) número de *rearings*. Valores expressos como média \pm EPM. ** p < 0.01 e *** p < 0.001 quando comparado com veículo. ANOVA *One Way*, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora

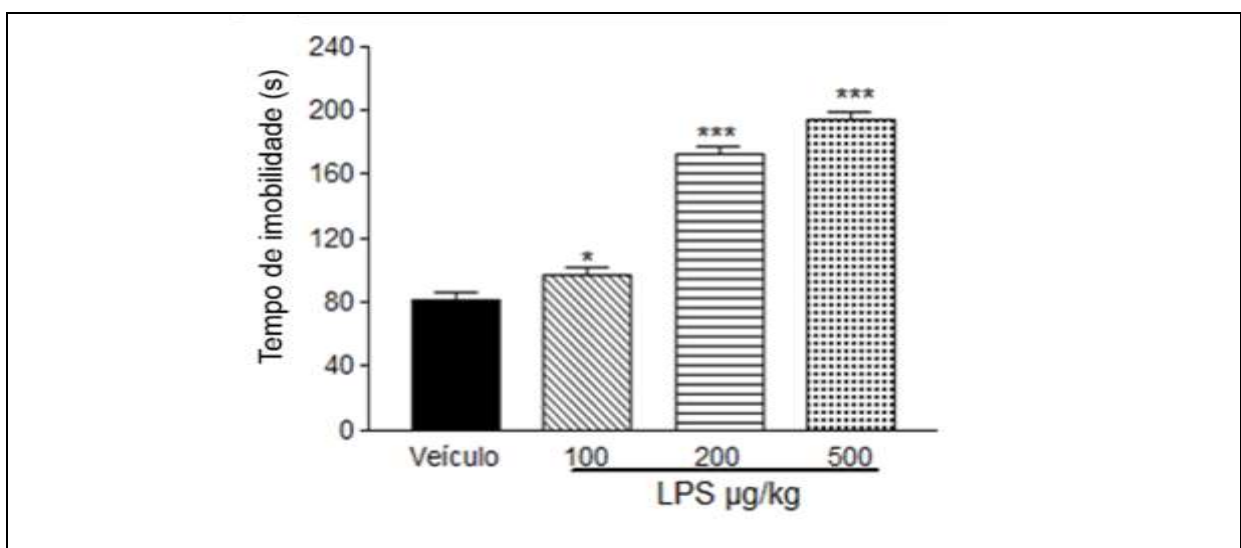


Figura 02: Efeitos do LPS no Teste do Nado Forçado. Valores expressos como média \pm EPM. * p < 0.05, *** p < 0.001 quando comparado com veículo. ANOVA *One Way*, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora

5.2.3 Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos

Nas análises da memória de curta duração observamos que as doses de 200 e 500 μkg produziram um menor tempo de exploração tanto do objeto A ($p < 0,01$) (Figura 3A) quanto do objeto C ($p < 0,05$) (Figura 3B). Apenas a dose de 500 μkg produziu aumento do tempo de não exploração (Figura 3C) e não foram observadas diferenças entre as doses utilizadas para o índice de reconhecimento. (Figura 3D) (Anexos –Tabela 4).

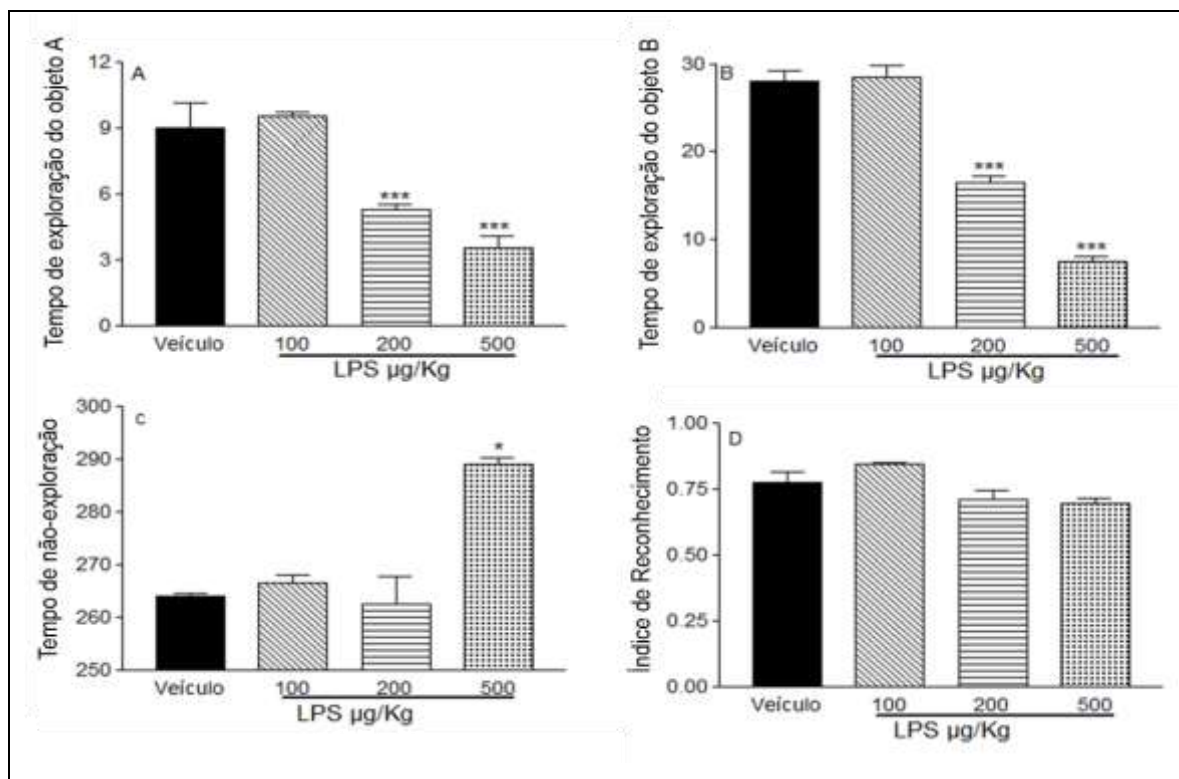


Figura 03: Efeitos do LPS no Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos (Curta duração). (A) tempo de exploração do objeto A em segundos; (B) tempo de exploração do objeto B em segundos; (C) tempo de não-exploração em segundos; (D) índice de reconhecimento. Valores expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$ e *** $p < 0.001$ quando comparado com veículo. ANOVA One Way, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora

Nas análises da memória de longa duração identificamos que apenas a dose de 500 $\mu\text{g/kg}$ ($p < 0,001$) resultou em diminuição significativa da exploração do objeto D (Figura 4B), 24 horas após a fase de treino. Aplicação do LPS reduziu o índice de reconhecimento (Figura 4D) nas três doses utilizadas ($p < 0,05$). Não se observaram

mudanças no tempo de exploração do objeto familiar ou do tempo de não exploração em nenhuma das doses utilizadas. (Anexos – Tabela 5).

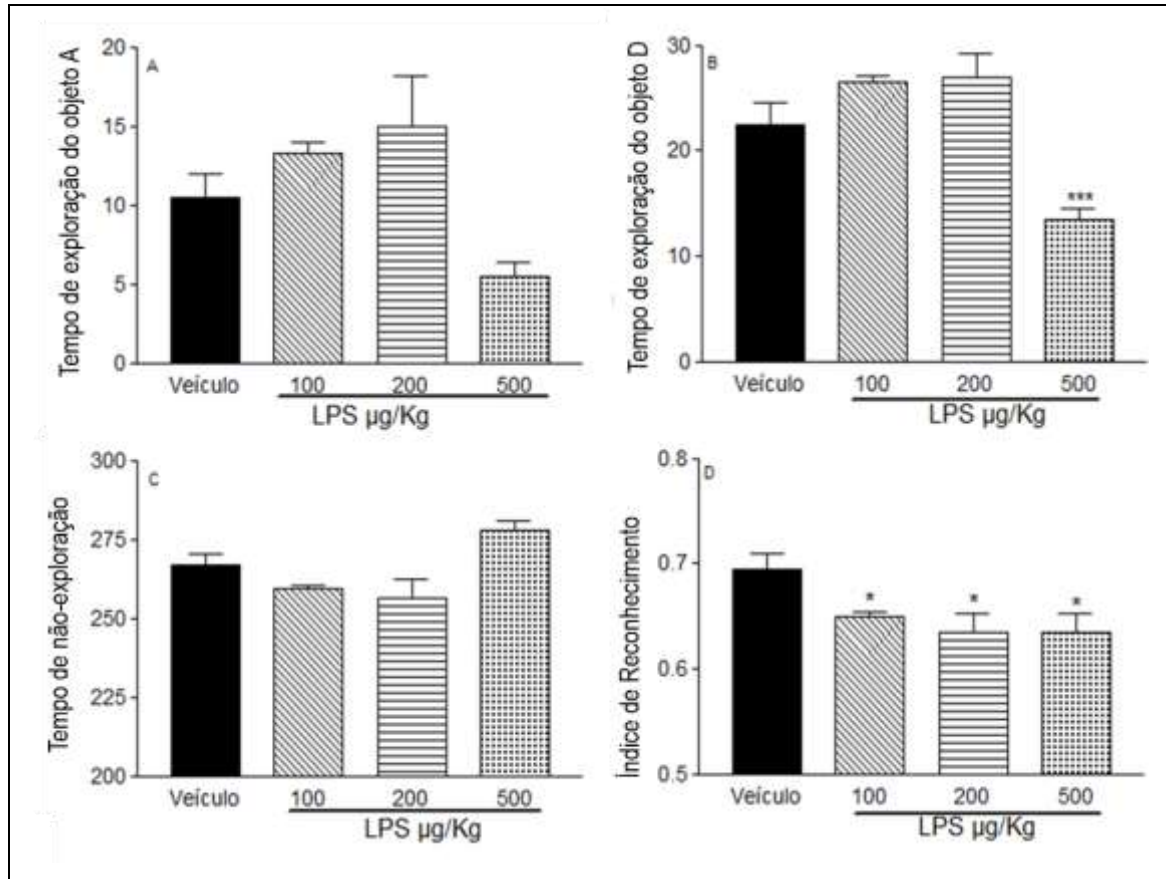


Figura 4: Efeitos do LPS no Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos (Longa duração). (A) tempo de exploração do objeto A em segundos; (B) tempo de exploração do objeto D em segundos; (C) tempo de não-exploração em segundos; (D) índice de reconhecimento. Valores expressos como média ± EPM. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ quando comparado com veículo. ANOVA *One Way*, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora

5.2.4 Teste de Esconder Esferas

No teste de esconder esferas a aplicação do LPS causou redução no número de esferas escondidas nas 3 doses utilizadas (100 µg/kg – $p < 0,05$; 200 µg/kg – $p < 0,01$; e 500 µg/kg – $p < 0,001$). (Figura 5) (Anexos – Tabela 2a).

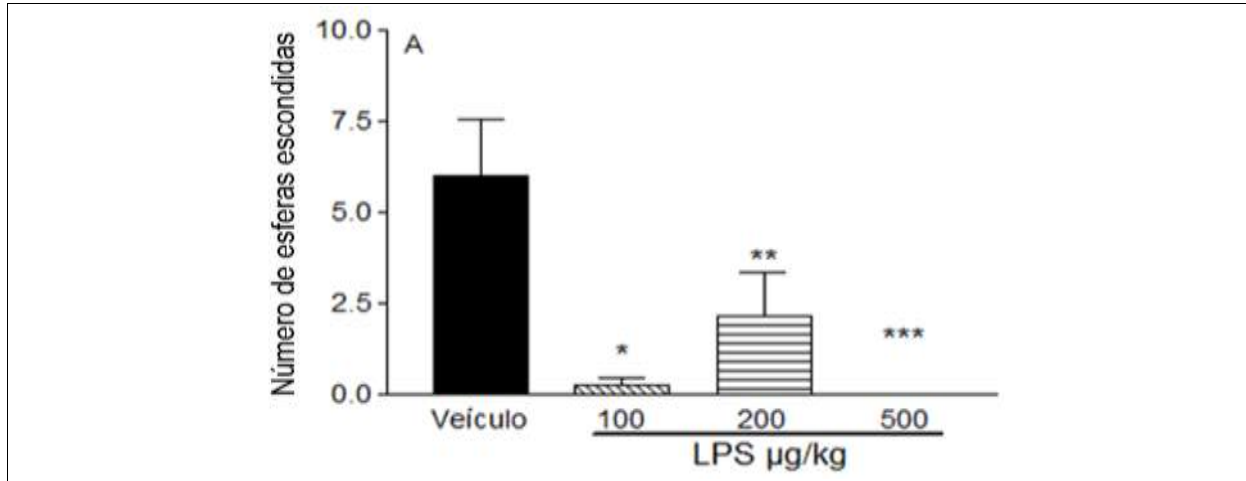


Figura 05: Efeitos do LPS no Teste de Esconder Esferas. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com veículo. ANOVA *One Way*, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora

5.2.5 Teste de Labirinto em Cruz Elevado

Após administração do LPS, houve redução do número de entradas nos braços abertos (Figura 6A) nas doses de 200 e 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0,01$) e no tempo de permanência nos braços abertos (Figura 6C) nas doses de 200 e 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0,05$). O tempo de permanência nos braços fechados (Figura 6D) aumentou nas doses de 200 e 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0,05$). Não foram encontradas diferenças na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em nenhum dos parâmetros (Anexos – Tabela 6).

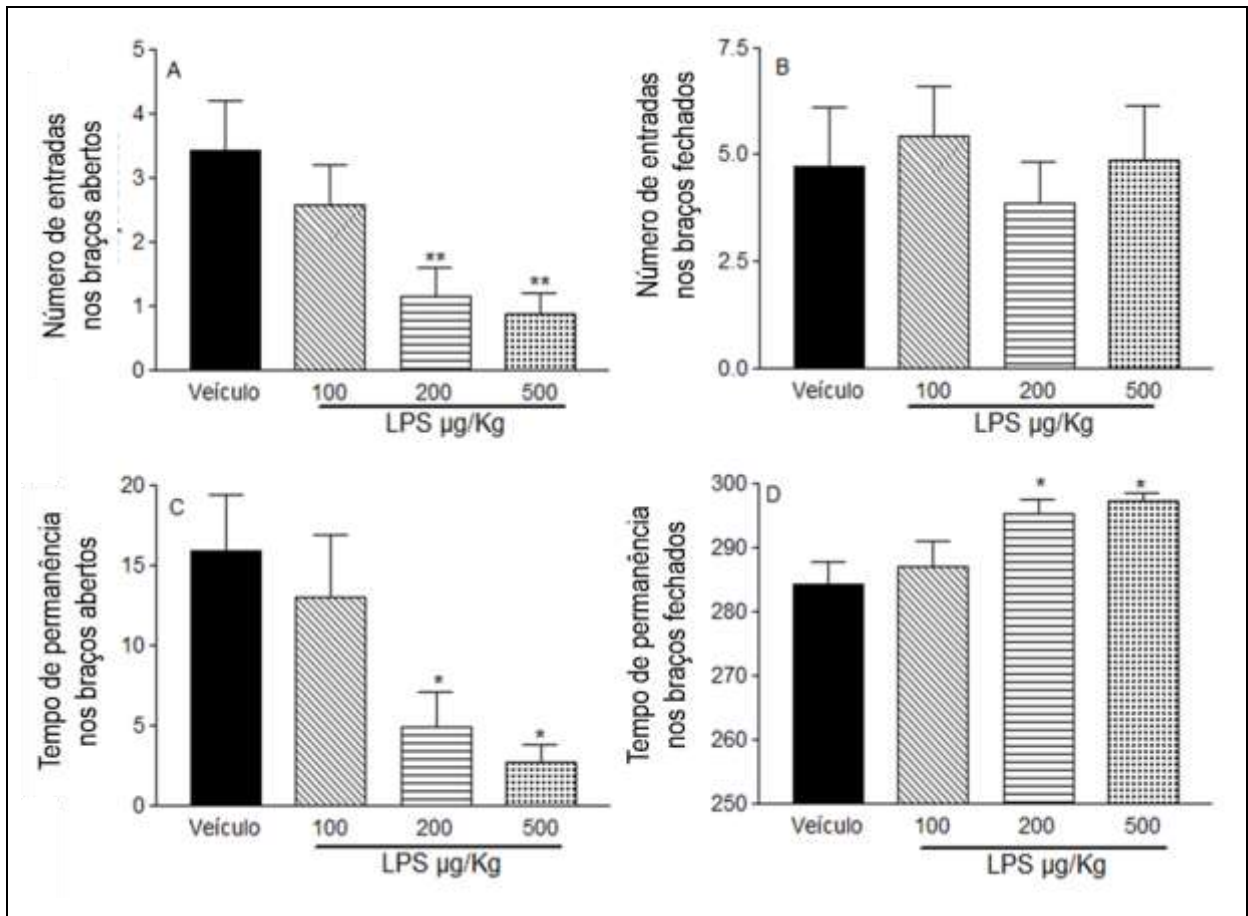


Figura 06: Efeitos do LPS no Teste de Labirinto em Cruz Elevado. (A) número entradas nos braços abertos; (B) número de entradas nos braços fechados; (C) tempo de permanência nos braços abertos em segundos; (D) tempo de permanência nos braços fechados em segundos. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ quando comparado com veículo; ANOVA *One Way*, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Fonte: Da autora

5.3 EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE AS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS DURANTE A ENDOTOXEMIA

5.3.1 Teste de Campo Aberto

Análises realizadas 02 horas após a aplicação do LPS revelaram a diminuição no número de entradas no centro (Figura 7A), número de entradas na periferia (Figura 7B), número de entradas centrais (Figura 7C) e número de *rearings* (Figura 7D). Não se observaram diferenças em nenhum dos parâmetros nos animais com hipotireoidismo induzido por PTU (Anexos – Tabela 7 – 02 horas).

06 horas após aplicação do LPS, todos os parâmetros avaliados ainda exibiram redução nos animais controle (Figura 7 A, B e C). Adicionalmente, os animais do grupo PTU também apresentaram redução no número de entradas no centro (Figura 7A), entradas totais, (Figura 7C) e *rearings* (Figura 7D). O número de entradas na periferia não foi modificado (Figura 14B). (Anexos – Tabela 7 – 06 horas).

Após 24 horas da aplicação do lipopolissacarídeo os animais controle não mais apresentaram diferenças em nenhum dos parâmetros avaliados (Figura 7 A, B e C). Por outro lado, animais do grupo PTU exibiram redução significativa do número de entradas no centro, entradas na periferia, entradas totais e *rearings* ($p < 0,001$; Figura 7 A, B e C respectivamente). Houve ainda redução do número de entradas na periferia ($p < 0,05$; Figura 7B) e das entradas totais ($p < 0,05$; Figura 7C) nos animais do grupo PTU que receberam veículo. (Anexos – Tabela 7 – 24 horas).

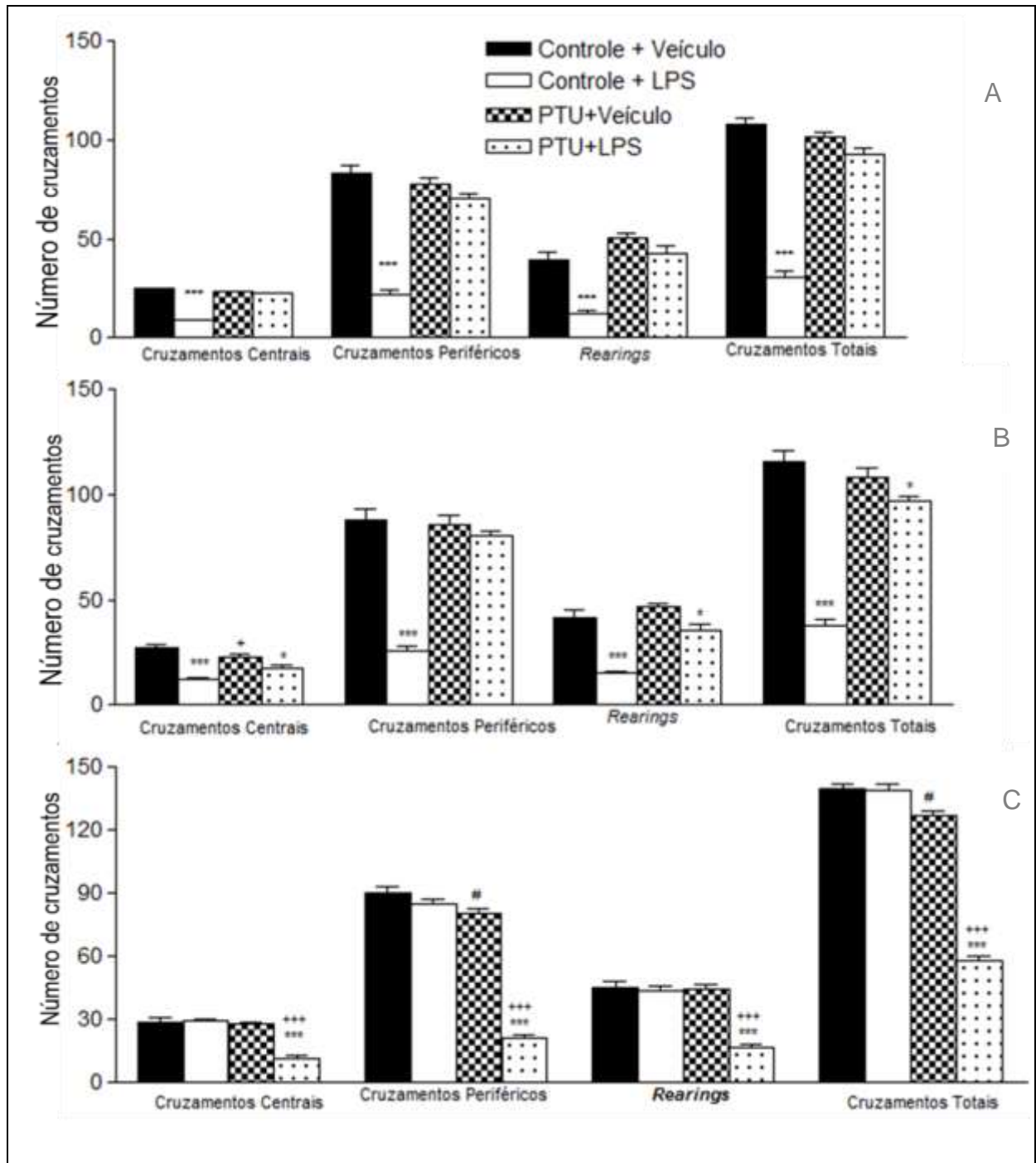


Figura 07: Efeitos do hipotireoidismo no Teste Campo Aberto durante a endotoxemia. (A) análises após 02 horas; (B) análises após 06 horas; (C) análises após 24 horas. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com controle \pm veículo; *** $P < 0,0001$ quando comparado com controle + LPS; # $P < 0,05$ quando comparado com PTU + LPS. ANOVA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora

5.3.2 Teste do Nado Forçado

Nas análises do nado forçado 02 horas a aplicação do LPS houve aumento do tempo de *floating* ($p < 0,001$; Figura A) e diminuição de *swimming* ($p < 0,001$; Figura 8B) e *climbing* ($p < 0,001$; Figura 8C) nos animais controle. Não foram observadas diferenças nestes parâmetros no grupo tratado com PTU. Este grupo também apresentou maior tempo de *floating* ($p < 0,001$; Figura 8A) e menor tempo de *swimming* ($p < 0,001$; Figura 8B) e *climbing* ($p < 0,001$; Figura 8C) quando receberam salina, comparados aos controles. (Anexos -Tabela 8 – 02 horas).

Resultados semelhantes foram encontrados na sexta hora após aplicação do LPS ($p < 0,001$; Figura 8A, B e C). O grupo PTU apresentou aumento do tempo de *floating* ($p < 0,001$; Figura 8A) após receberem a injeção do LPS, neste intervalo de tempo. (Anexos -Tabela 8 – 06 horas).

Na avaliação do nado forçado após 24 horas do desafio imunológico, enquanto os animais do grupo controle não mais apresentaram diferenças quando comparados aos tratados com salina (Figura 8A, B e C) o grupo tratado com PTU exibiu aumento no tempo de *floating* (Figura 8A) e redução do tempo de *swimming* (Figura 8B) e *climbing* (Figura 8C). As diferenças apresentadas pelo grupo PTU tratado com salina foram semelhantes às avaliações anteriores. (Anexos -Tabela 8 – 24 horas).

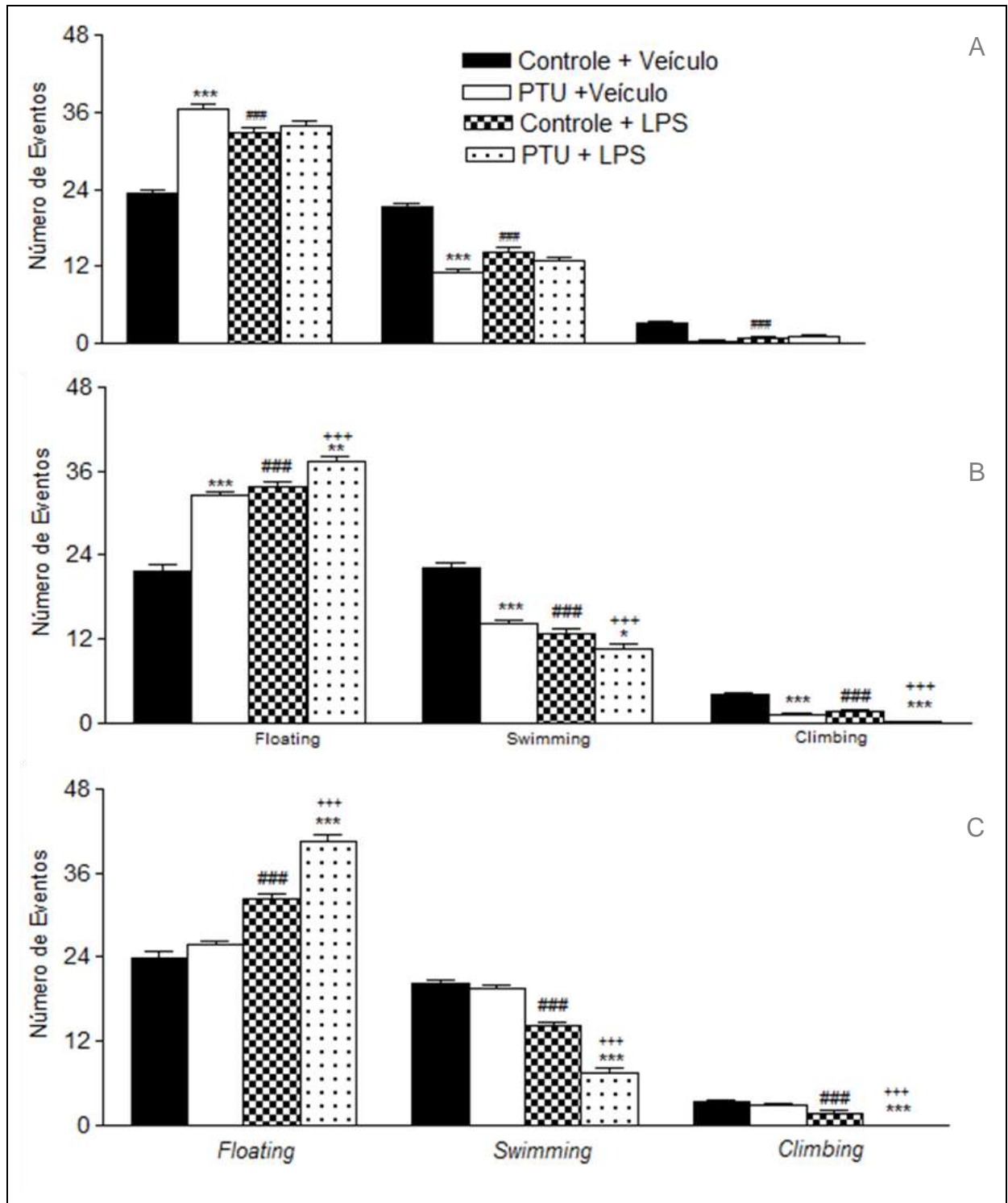


Figura 08: Efeitos do hipotireoidismo no Teste do Nado Forçado durante a endotoxemia. (A) análises após 02 horas; (B) análises após 06 horas; (C) análises após 24 horas. Valores expressos como média ± EPM. *p < 0,05 e *** p < 0.001 quando comparado com controle + veículo; +++ P < 0,0001 quando comparado com controle + LPS; ### P < 0,0001 quando comparado com PTU + LPS. ANOVA Two Way, seguido pelo pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora

5.3.3 Teste de Interação Social

A avaliação do comportamento social revelou que tanto animais controle quanto tratados com PTU apresentam diminuição do tempo total de investigação após 02 horas de aplicação do LPS. Além disto, os animais do grupo PTU exibiram comportamento social reduzido quando tratados com salina, comparados ao grupo controle (Figura 9A). Resultados semelhantes foram encontrados nas análises realizadas após 06 horas (Figura 9B). Contudo, 24 horas após o desafio imunológico os animais do grupo PTU apresentavam tempo de investigação social reduzido enquanto os animais controle não exibiam mais diferenças em relação ao grupo salina (Figura 9C) (Anexos – Tabela 9).

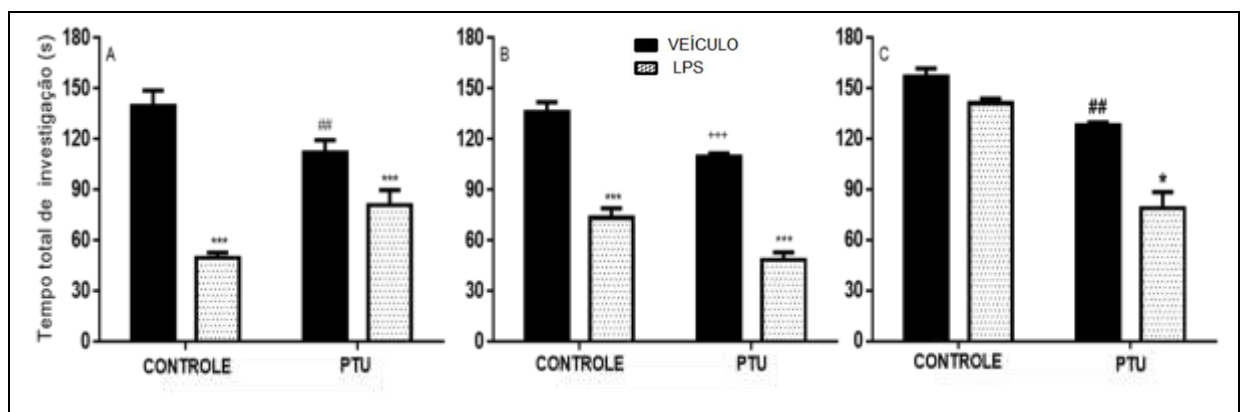


Figura 09: Efeitos do hipotireoidismo no Teste de Interação Social durante a endotoxemia. (A) análises após 02 horas; (B) análises após 06 horas; (C) análises após 24 horas. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com controle + veículo; +++ $P < 0,0001$ quando comparado com controle + LPS; ## $P < 0,001$ quando comparado com PTU + LPS. ANOVA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora

5.3.4 Ingestão Alimentar e Ganho de Peso

Os dados da ingestão alimentar avaliada durante 24 horas após a aplicação da solução salina ou LPS são mostrados na Figura 10A. O tratamento com LPS reduziu a ingestão de alimentos tanto nos animais controle quanto do grupo PTU em comparação aos tratados com solução salina. Ao fim de 24 horas após o LPS o grupo PTU apresentou um comportamento hipofágico acentuado em comparação com o grupo controle (fator desafio imunológico: $F_{1,34} = 203,4$, $P < 0,001$; fator estado tireoideano: $F_{1,34} = 4,66$, $P = 0,038$; interação: $F_{1,34} = 15,94$, $P < 0,001$). Além disso, os animais que receberam LPS apresentaram acentuada perda de peso comparado aos tratados com salina, em ambos grupos (fator desafio imunológico: $F_{1,34} = 32,41$, $P < 0,001$; estado tireoideano: $F_{1,34} = 1,17$, $P > 0,05$; interação: $F_{1,34} = 0,06$, $P = 0,810$; Figura 10B).

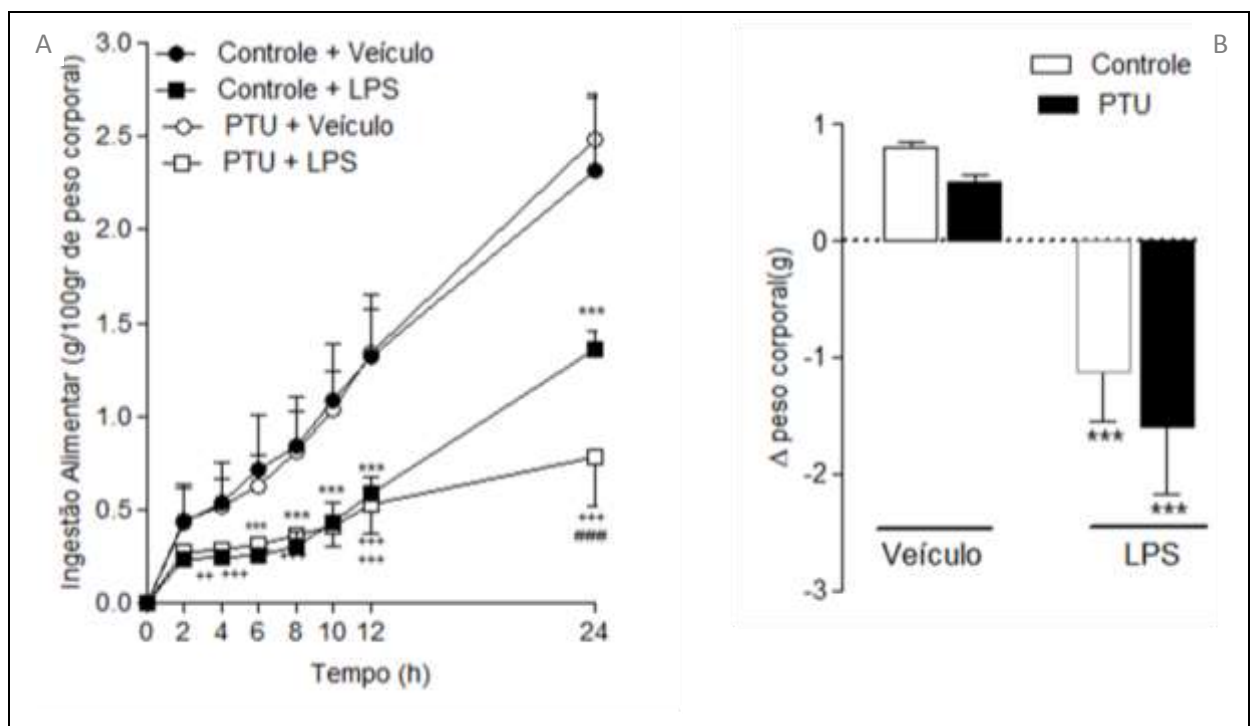


Figura 10: Efeitos do hipotireoidismo na Ingestão Alimentar e Ganho de Peso durante a endotoxemia. (A) ingestão alimentar em gramas por 10 gramas de peso corporal; (B) variação do peso corporal em gramas. Valores expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$ quando comparado com controle + veículo; ++ $p,0,01$ e +++ $P < 0,0001$ quando comparado com controle + LPS; ### $P < 0,0001$ quando comparado com PTU + veículo. ANOVA Two Way, seguido pelo pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora

5.3.5 Memória de Reconhecimento de Objetos

Na avaliação da memória de curta duração a administração do LPS reduziu os parâmetros de exploração do objeto A ($p < 0,001$; Figura 11A) e a exploração do objeto C ($p < 0,001$; Figura 11B), aumentou o tempo de não-exploração ($p < 0,001$; Figura 11C) e reduziu o índice de reconhecimento (Figura 11D) nos animais controles. Resultados semelhantes foram observados no grupo tratado com PTU, à exceção do índice de reconhecimento, que não foi modificado (Figura 11D). Além disto, o tratamento com PTU reduziu a exploração do objeto A ($p < 0,001$; Figura 11A) e do objeto B ($p < 0,001$; Figura 11B) e aumentou o tempo de não exploração ($p < 0,001$; Figura 11C) nos animais que receberam salina. (Anexos – Tabela 10 – Curta duração).

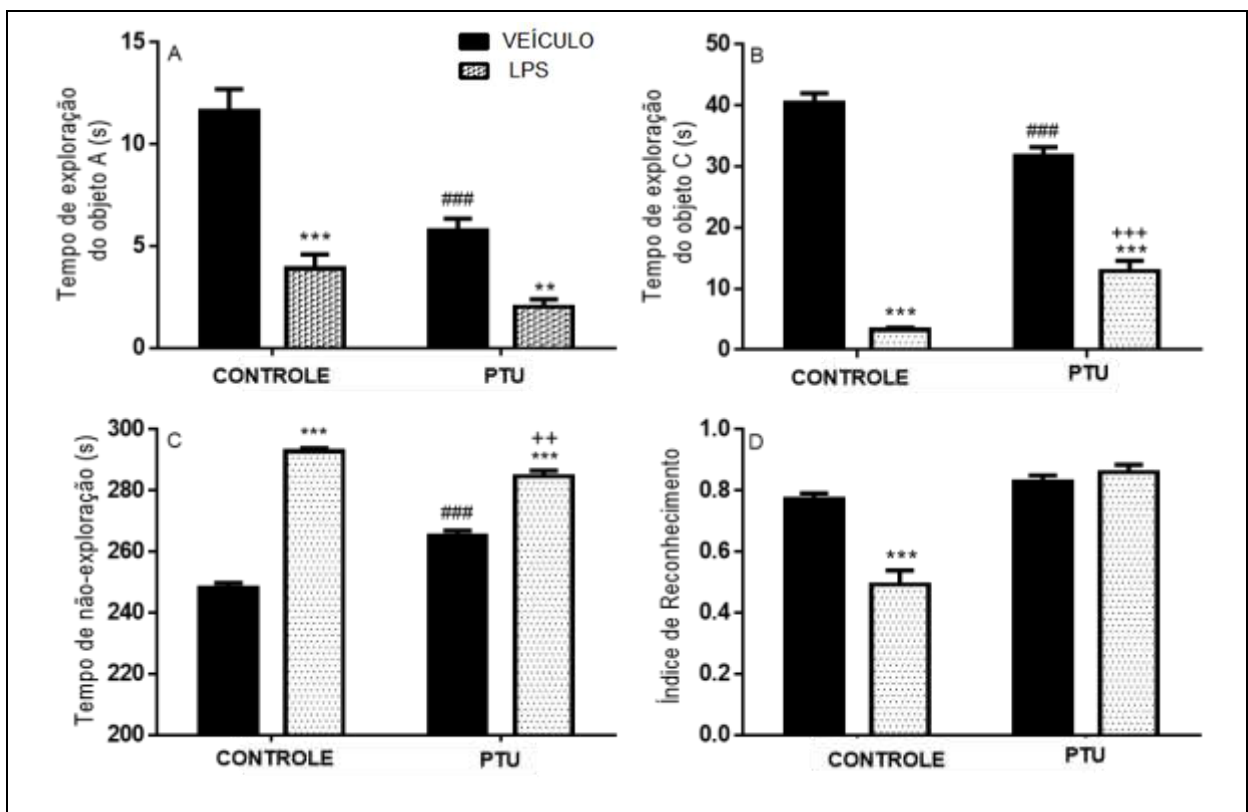


Figura 11. Efeitos do hipotireoidismo no Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos (Curta duração) durante a endotoxemia. (A) tempo de exploração do objeto A em segundos; (B) tempo de exploração do objeto C em segundos; (C) tempo de não-exploração em segundos; (D) índice de reconhecimento. Valores expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$ quando comparado com controle + veículo; +++ $P < 0,0001$ quando comparado com controle + LPS; ### $P < 0,0001$ quando comparado com PTU + veículo. ANOVA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora

As análises da memória de longa duração revelaram comportamento semelhante à memória de curta duração nos animais tratados com PTU para os parâmetros de exploração do objeto A ($p < 0,001$; Figura 12A), exploração do objeto D ($p < 0,05$; Figura 12B) e tempo de não exploração. Ao desafio imunológico, os animais controles reduziram a exploração do objeto A ($p < 0,001$; Figura 12A), exploração do objeto D (Figura 8B) e o índice de reconhecimento ($p < 0,05$; Figura 12D) e aumentaram o tempo de não-exploração (Figura 12C). Os camundongos tratados com PTU exibiram respostas semelhantes, com exceção do tempo de exploração do objeto A, que não se modificou (Figura 12A). (Anexos – Tabela 10 – Longa Duração).

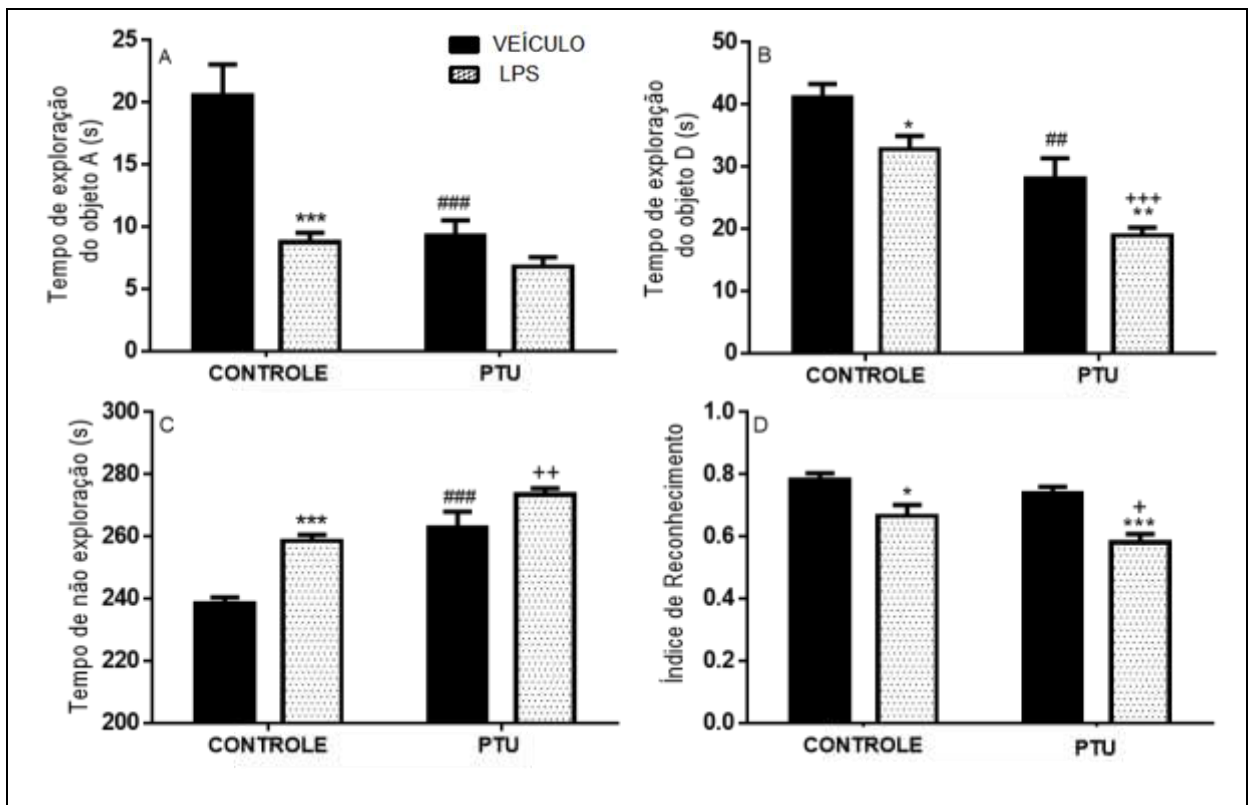


Figura 12: Efeitos do hipotireoidismo sobre o Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos (Longa duração) durante a endotoxemia. (A) tempo de exploração do objeto A em segundos; (B) tempo de exploração do objeto D em segundos; (C) tempo de não-exploração em segundos; (D) índice de reconhecimento. Valores expressos como média ± EPM. *** $p < 0,001$ quando comparado com controle + veículo; +++ $P < 0,0001$ quando comparado com controle + LPS; ### $P < 0,0001$ quando comparado com controle + veículo. ANO

VA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora

5.3.6 Labirinto Aquático de Morris

Para avaliação dos efeitos da endotoxemia na aquisição da memória espacial avaliada pelo Labirinto Aquático de Morris (LAM) procedeu-se a aplicação do LPS em três momentos distintos: antes do primeiro dia de treino (Pré 1T); após o primeiro dia de treino (Pós 1T) e após o terceiro dia de treino (Pós 3T) e (Figura 13A). A aplicação do LPS reduziu o tempo de permanência na plataforma alvo apenas no grupo Pré 1T (de 19.40 ± 1.72 para 10.90 ± 1.98 ; $p < 0,01$ – Figura 13A). Na comparação entre os diferentes estados tireoidianos, a aplicação do LPS anterior ao primeiro dia de tratamento prejudicou o aprendizado no grupo PTU, aumentando o tempo para atingir a plataforma alvo nos primeiro ($p < 0,001$) e segundo ($p < 0,01$) dias de treino (Figura 13B). Na avaliação do aprendizado espacial (*probe trial*) a aplicação do LPS diminuiu o tempo de permanência apenas nos animais controle (Figura 9C) não tendo efeito sobre o grupo pré-tratado com PTU. Por outro lado, observamos que no grupo PTU houve redução deste tempo nos animais tratados com salina, indicando que o hipotireoidismo per si foi responsável por prejudicar a resposta de aprendizagem espacial (fator desafio imunológico $F_{1,48} = 4.52$, $P = 0.0038$; fator estado tireoideano $F_{1,48} = 27.70$, $P < 0,0001$; interação $F_{1,48} = 9.834$, $P = 0.0029$).

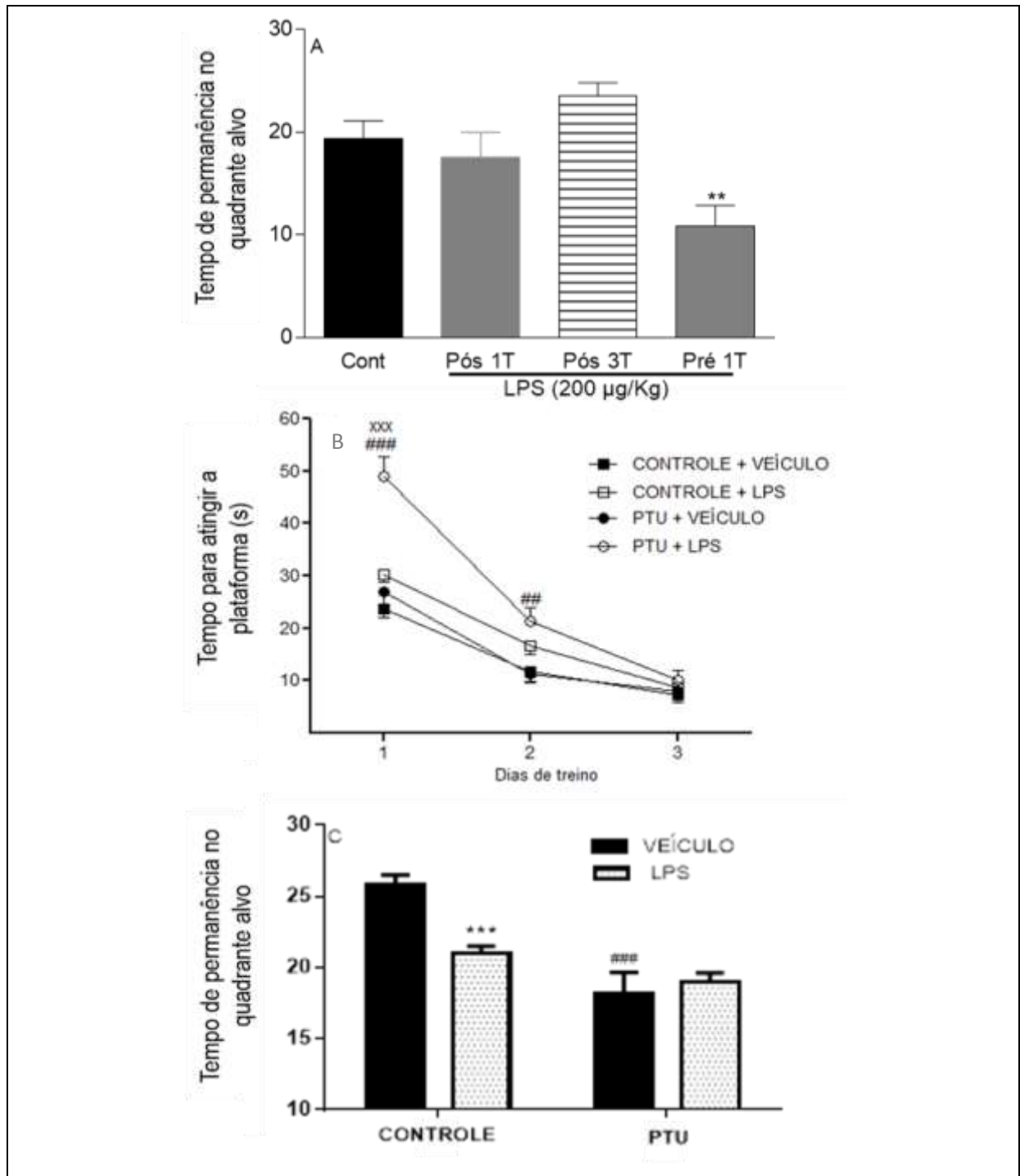


Figura 13: Efeitos do hipotireoidismo no Teste do Labirinto Aquático de Morris durante a endotoxemia. Valores expressos como média \pm EPM. (A). Diferentes pontos de administração do LPS; (B) *Trials* após administração de LPS (200 μ g/kg). (C) tempo de permanência no quadrante alvo em segundos no *Probe Trial*. Valores expressos como média \pm EPM. ** p < 0.01 quando comparado com controle; ## p < 0.01 e ### p < 0.001 quando comparado com controle+ veículo; xxx p < 0.001 quando comparado com PTU + veículo. ANOVA *One Way*, seguido pelo pós-teste de Newman Keuls. C) *Probe trial*. ***p < 0.001 quando comparado com controle \pm veículo; ### p < 0,001 quando comparado com controle \pm veículo. ANOVA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora

5.3.7 Teste de Esconder Esferas

No teste de esconder esferas, observamos que a aplicação do LPS produziu redução no número de esferas escondidas apenas no grupo controle ($p < 0,05$). Além disto, os animais tratados com PTU apresentaram maior número de esferas escondidas quando tratados com salina ($p < 0,001$), sugerindo a presença de maior ansiedade neste grupo (Figura 14). (fator desafio imunológico $F_{1,28}=5.30$, $p=0.029$; fator estado tireoidiano $F_{1,28}=36.52$ $p < 0,0001$; interação $F_{1,28}=2.070$, $p= 0.041$).

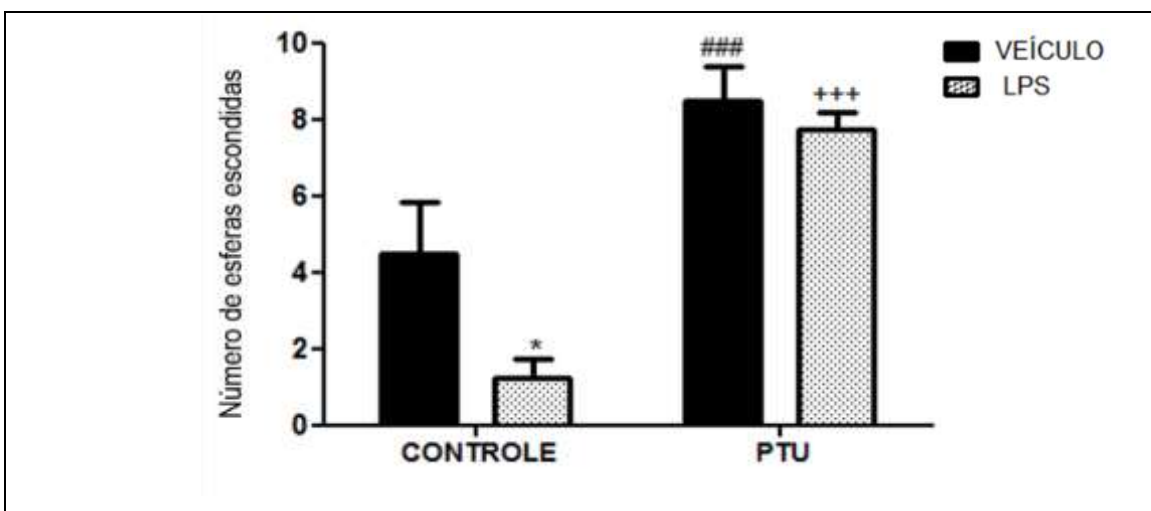


Figura 14: Efeitos do hipotireoidismo no Teste de Esconder esferas durante a endotoxemia. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado com controle + veículo; +++ $P < 0,0001$ quando comparado com controle + LPS; ### $P < 0,0001$ quando comparado com controle + veículo. ANOVA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora

5.4 EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE A FEBRE

Os resultados da avaliação da temperatura corporal por telemetria são mostrados na Figura 15. A administração do LPS induziu a um aumento da temperatura corporal em ambos grupos (Figura 15 A). O índice térmico (área sob a curva) do intervalo entre 1 e 4 horas (Figura 15 B) aumentou tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com PTU (fator de desafio imunológico: $F_{1,25} = 44,35$, $p < 0,001$; fator estado tireoidiano: $F_{1,25} = 6,28$, $p < 0,05$; interação: $F_{1,25} = 13,3$, $p <$

0,01). Entretanto, esta variação foi mais acentuada nos animais do grupo controle. O índice térmico do intervalo entre 4 e 7 horas (Figura 15 C) aumentou de maneira semelhante, independente do estado tireoidiano (fator de desafio imunológico: $F_{1,25} = 78,41$, $p < 0,001$; estado tireoideano: $F_{1,25} = 1,01$, $p > 0,05$; interação: $F_{1,25} = 1,2$, $p > 0,05$). Estes resultados revelam que a resposta febril ao LPS está atrasada no grupo pré-tratado com PTU, comparado ao grupo controle. Porém, quando o estado febril é estabelecido, a febre tem a mesma magnitude, tanto no grupo controle quanto no grupo com hipotireoidismo. Além disto, os animais pré-tratados com PTU ($36,15 \pm 0,06$) apresentaram temperatura basal inferior ao grupo controle ($36,59 \pm 0,04$; $p < 0,001$), sem, contudo, interferir na capacidade de produzir febre (Fator desafio imunológico: $F_{1,25} = 42,82$, $P < 0,001$; fator estado tireoidiano: $F_{1,25} = 13,50$, $P = 0,0011$; interação: $F_{1,25} = 13,50$, $P = 0,0011$).

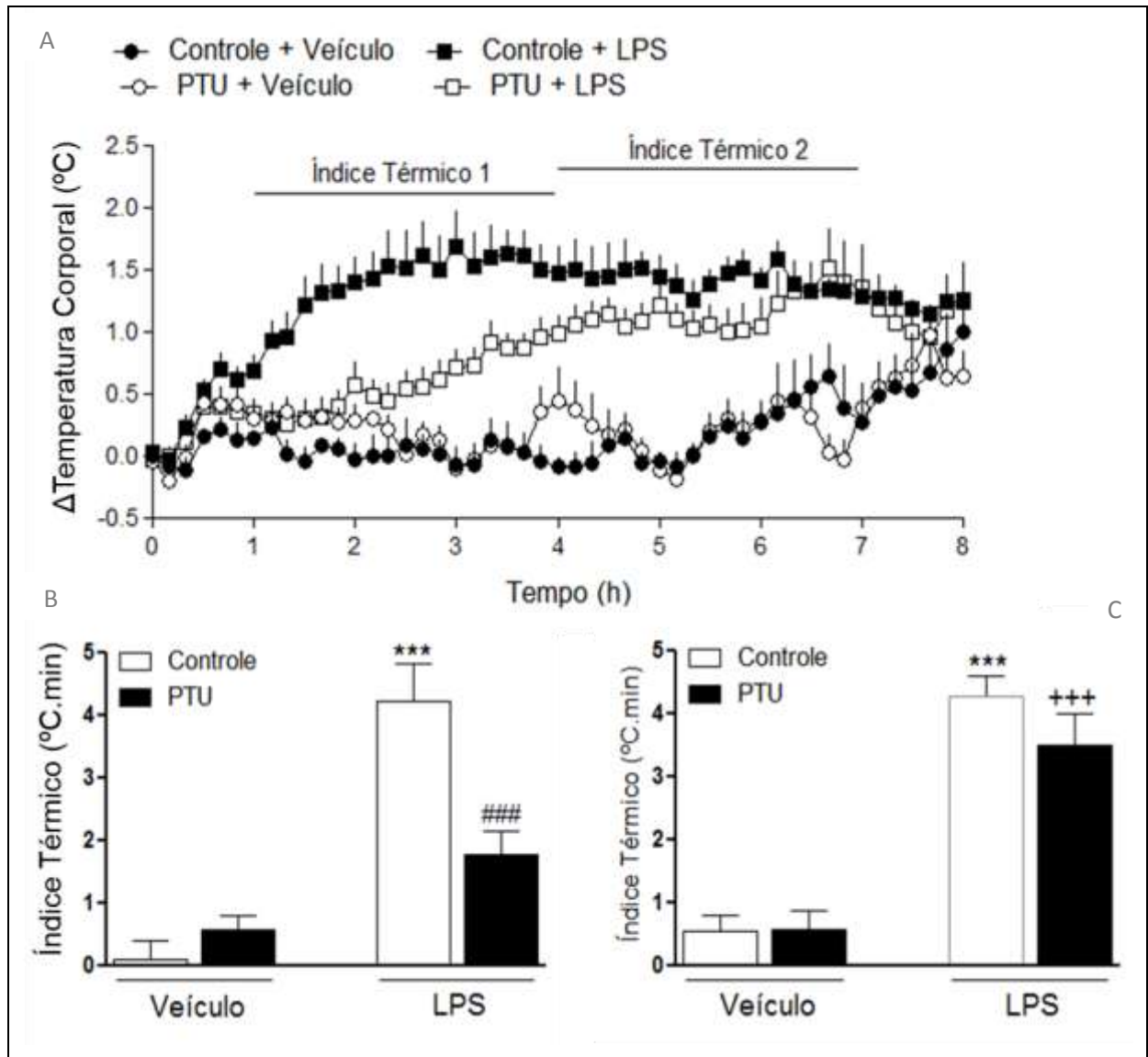


Figura 15: Efeitos do hipotireoidismo sobre a temperatura corporal durante a endotoxemia. (A) Variação da temperatura corporal; (B) Índice Térmico I; (C) Índice Térmico II. Valores expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$ quando comparado com controle + veículo; +++ $P < 0,0001$ quando comparado com controle + LPS; ### $P < 0,0001$ quando comparado com PTU + veículo. ANOVA Two Way, seguido pelo pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora

5.5 EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE A ATIVAÇÃO NEURONAL DURANTE A ENDOTOXEMIA

A aplicação do LPS produziu aumento no número de células positivas para Fos nas 4 áreas estudadas nos grupos controle (Figuras 16 e 17). Porém, no grupo tratado com PTU esta resposta foi atenuada no PVN (Figura 16 A). Não houve diferença entre

as respostas ao desafio imunológico apresentadas pelos grupos controle e tratado com PTU no SON (Figura 16 B). O grupo PTU apresentou maior número de células positivas no BST quando tratado com salina, porém o tratamento com LPS não alterou a expressão de Fos (Figura 17A). O aumento da expressão de Fos após o LPS na mPOA no grupo PTU foi atenuado em comparação ao grupo controle (Figura 17B) (Anexos – Tabela 11).

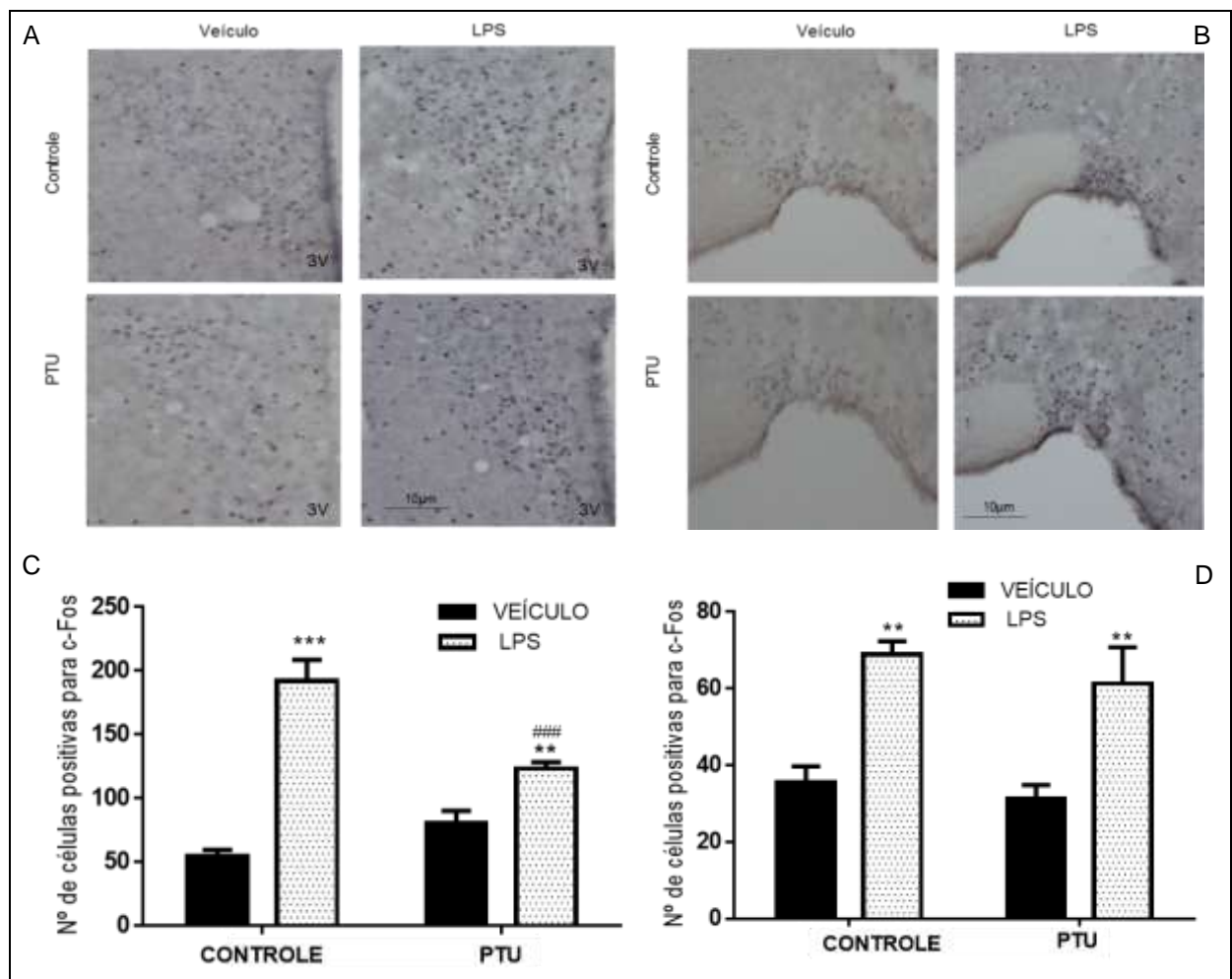


Figura 16: Efeitos do hipotireoidismo sobre a expressão de Fos no PVN e SON durante a endotoxemia. Fotomicrografias representativas de cortes de encéfalos mostrando células positivas para Fos no PVN (A) e SON (B). Abaixo, número de células positivas para Fos no PVN (C) e SON (D). Valores expressos como média \pm EPM. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ quando comparado com controle + veículo; ### $P < 0,0001$ quando comparado com PTU + veículo. ANOVA *Two Way*, seguido pelo pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora

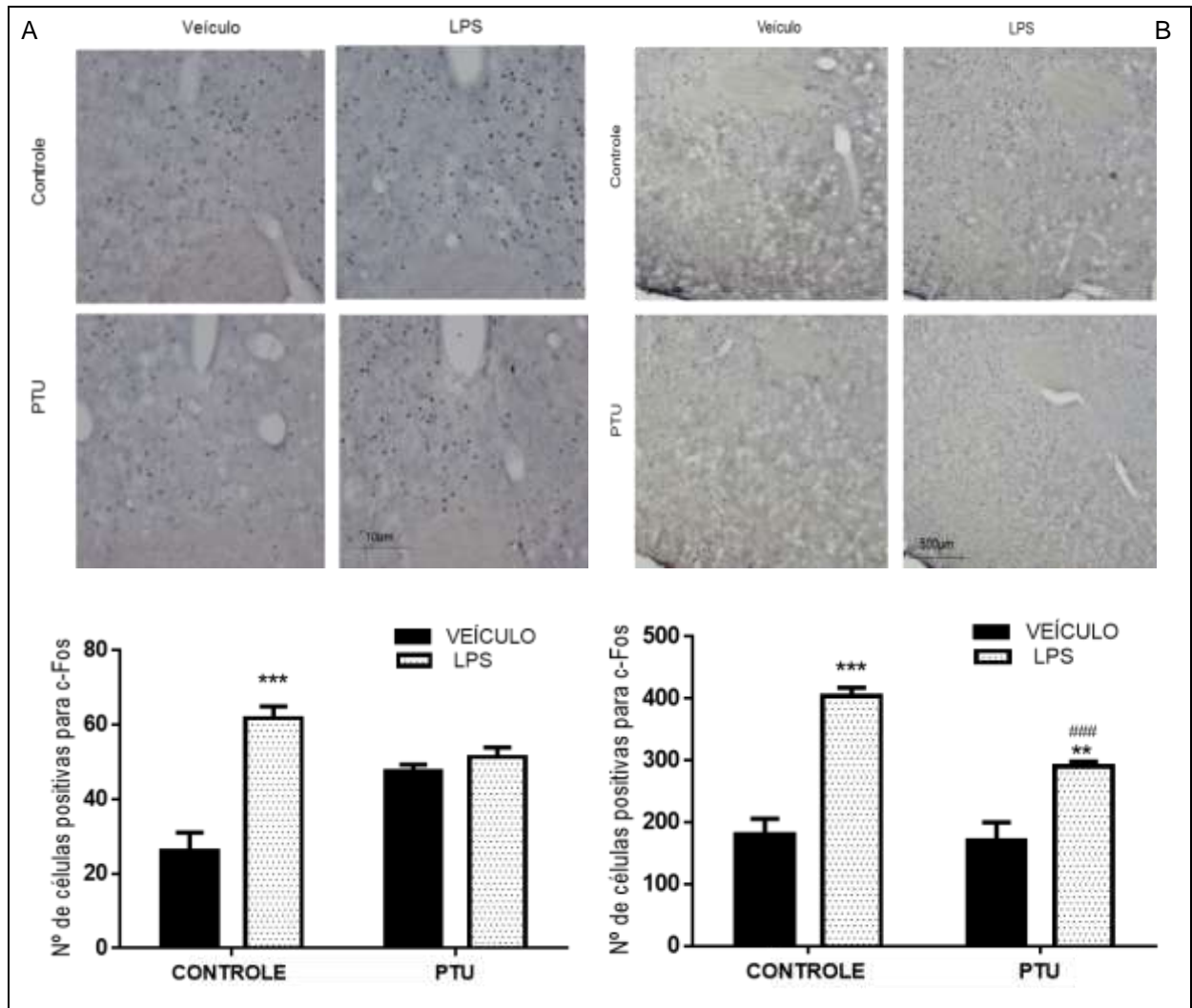


Figura 17: Efeitos do hipotireoidismo sobre a expressão de Fos no BST e mPOA durante a endotoxemia. Fotomicrografias representativas de cortes de encéfalos mostrando células positivas para Fos no BST (A) e mPOA (B). Abaixo, número de células positivas para Fos no BST (C) e mPOA (D). Nota: Valores expressos como média \pm EPM. *** $p < 0.001$ quando comparado com controle + veículo; ### $P < 0,0001$ quando comparado com controle + LPS; ++ $P < 0,01$ quando comparado com PTU + veículo. ANOVA Two Way, seguido pelo pós-teste de Tukey.

Fonte: Da autora

6 DISCUSSÃO

O tratamento com o PTU foi eficiente em estabelecer as características essenciais do hipotireoidismo, resultando em menor ganho de peso, aumento das gorduras epididimal e retroperitoneal, redução dos níveis de T3 e T4 e hipertrofia da glândula tireoide. Nos animais com hipotireoidismo, identificamos que não há alteração da atividade locomotora, porém ocorre comprometimento do comportamento social, da capacidade de aprendizado e memória, além do aumento dos comportamentos do tipo depressivo e ansioso. Nas análises das diferentes doses de LPS, identificamos que 200 µg/Kg foi a que melhor evidenciou as manifestações do comportamento doentio nos testes utilizados. Após a administração do LPS, animais hipotireoidianos apresentaram um atraso nas manifestações do comportamento doentio, porém estas foram acentuadas em momentos mais tardios da endotoxemia. Estas respostas são acompanhadas de um menor índice térmico e da redução da ativação neuronal no PVN e MPOA nas primeiras horas do desafio imunológico.

Os dados obtidos para os parâmetros biométricos e hormonais em nosso trabalho confirmam a eficácia do modelo de indução do estado de hipotireoidismo, semelhante a outros estudos (FERREIRA et al., 2007; JENA et al., 2011; WU et al., 2013). Após 30 dias de tratamento com o PTU os animais apresentaram alterações no ganho de peso e na distribuição de gordura corporal, sem, contudo, apresentarem diferenças na média de peso em relação aos controles (UETA; OLIVARES; BIANCO, 2011). Além disto, evidenciamos a redução dos níveis séricos dos hormônios tireoidianos associada à hipertrofia glandular, os quais são destacados na literatura como os principais critérios diagnósticos para a condição de hipotireoidismo (FERREIRA et al., 2007; JOHNSTONE et al., 2013; WEISSEL M, 2014). Estes resultados ratificam a propriedade do propiltiouracil em produzir o hipotireoidismo sistêmico como proposto pelo American Thyroid Association Guide to Investigating Thyroid Hormone Economy and Action in Rodent and Cell Models, nas concentrações e no tempo de administração utilizados em nosso estudo (BIANCO et al., 2014).

No tangente às respostas comportamentais, o hipotireoidismo não alterou a atividade motora voluntária, corroborando com estudos envolvendo ratos com diferentes estados tireoidianos ou com mutação dos receptores TRH, os quais

demonstraram não haver nenhuma influência da redução dos hormônios tireoidianos sobre a locomoção (SALA-ROCA et al., 2002; KLIEVERIK et al., 2009). Olivares et al. (2012) encontraram diminuição da atividade locomotora em ratos com níveis reduzidos hormônios tireoidianos; no entanto, esta redução foi mediada pelo estresse no paradigma de derrota social. Outro estudo relatou redução da atividade motora associada ao aumento da ansiedade em Campo Aberto em condições de insuficiência de hormônios tireoidianos (WILCOXON et al., 2007); no entanto, o comprometimento da locomoção foi atribuído ao hipotireoidismo ter sido experimentado na fase perinatal, o que pode ter comprometido o desenvolvimento neuromotor dos animais, levando à diminuição da neurogênese, com a consequente inibição comportamental.

Assim, sugerimos que a redução dos hormônios tireoidianos *per se*, na ausência de outros fatores, não altera a atividade motora voluntária avaliada em Campo Aberto. Embora o hipotireoidismo seja associado com a diminuição do metabolismo basal e do gasto energético (KIM, 2006), o efeito sobre a atividade motora só deve ocorrer em situações em que a força muscular e do sistema cardiovascular são comprometidas pela ausência prolongada dos hormônios tireoidianos (PILHATSCH et al., 2010) ou quando outros fatores estão associados à condição de hipotireoidismo (HELMREICH; TYLEE D, 2011).

Por outro lado, no paradigma de natação forçada, encontramos um aumento da imobilidade nos animais hipotireoideos. Estes resultados corroboram com o estudo de MONTERO-PEDRAZUELA et al. (2006) que demonstraram que ratos com hipotireoidismo ficavam mais tempo em *floating* no nado forçado apesar de apresentarem memória normal no teste de memória de reconhecimento de objetos. O comportamento do tipo depressivo nestes ratos foi atribuído à redução da neurogênese e à hipoplasia dendrítica no giro denteado, região conhecida por seu papel modulatório dos sintomas depressivos. Desta forma, o aumento da imobilidade, bem como a diminuição do comportamento social em animais com hipotireoidismo poderia ser esperado, haja vista a relação sugerida frequentemente entre insuficiência de hormônios tireoidianos e comportamentos do tipo depressivo. (ZENG et al., 2007; PILHATSCH et al., 2010; HELMREICH; TYLEE, 2011; GE ET et al., 2012).

Em contrapartida, nos animais tratados com PTU, ocorreu prejuízo cognitivo na memória de longo prazo. CORREIA et al. (2009) identificaram que pacientes com

hipotireoidismo têm prejuízo em tarefas que testam a memória por apresentarem déficits na função hipocampal, em especial na transmissão sináptica. Estas alterações, entretanto, podiam ser corrigidas com a administração de tiroxina exógena, demonstrando o papel específico dos HTs na estrutura e função hipocampais. Semelhantemente, outros estudos também relataram alterações em testes de memória em animais com insuficiência de hormônios tireoidianos. (ALZOUBI et al., 2009; GE et al., 2012; WILCONSON et al., 2007).

No teste de esconder esferas, foi possível observar que a manipulação do estado tireoidiano altera as respostas relativas à ansiedade, onde os camundongos tratados com PTU esconderam mais esferas em relação aos controles. No estudo de SUN et al (2009), camundongos nocaute para receptores TR α apresentaram redução do comportamento ansioso. Por outro lado, THOMAS et al. (2009) evidenciaram que o comportamento de enterrar esferas não se relaciona apenas a ansiedade, mas também ao comportamento repetitivo, semelhante aos transtornos compulsivos. Neste sentido, BROW, BONELLO e POLLARD (2005) relataram a associação entre o hipotireoidismo e uma variedade de transtornos psiquiátricos. A redução de hormônios tireoidianos tem repercussões sobre o humor, o comportamento e a cognição, especialmente por influenciar os sistemas adrenérgico, gabaérgico e serotoninérgico, comprometendo a transmissão sináptica nas regiões cerebrais que controlam estas funções.

Em conjunto, estes resultados indicam que a influência da redução de hormônios tireoidianos sobre o comportamento parece relacionar-se mais especificamente ao domínio cognitivo em detrimento da atividade motora. Estudos eletrofisiológicos demonstraram que o hipotireoidismo induzido por drogas antitireoidianas podem alterar a transmissão sináptica e a plasticidade na região CA1 do hipocampo de ratos neonatos (SUI, GILBERT, 2003; VARA 2002; SUI et al., 2005). Além disto, a insuficiência de hormônios tireoidianos tem sido relacionada à regulação do metabolismo glicêmico cerebral, comprometendo o processamento nervoso. Desta forma, a diminuição na disponibilidade de HTs prejudica a capacidade de processamento neural tanto pela modificação estrutural, reduzindo a neurogênese e a sinaptogênese, quanto por alterações metabólicas, com redução da disponibilidade de substratos energéticos para o metabolismo central (JAHAGIRDAR, McNAY, 2012). et al.,

Pesquisas envolvendo alteração do estado tireoidiano em animais tem demonstrado que o hipotireoidismo se associa a alterações comportamentais e cognitivas, especialmente no tocante à memória e aprendizado. (BROW, BONELLO e POLLARD, 2005; GUTIÉRREZ-MARISCAL, 2008; NILLNI, 2010; HELMREICH; TYLEE, 2011; GE et al., 2012; BIANCO et al., 2014). Por outro lado, a influência do estado tireoidiano em situações de aumento de demanda metabólica ainda carece de mais investigações. Especialmente, o comportamento doentio ainda não foi estudado.

Comportamento doentio é um estado motivacional onde o organismo prioriza algumas funções em detrimento de outras para lidar com patógenos infecciosos (DANTZER, 2009; LAWSON et al., 2013; PITYCHOUTIS et al., 2009). A administração periférica de LPS ativa o sistema imunológico, resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas (DANTZER, 2009; LOFTIS et al., 2010). Estas citocinas produzidas periféricamente atingem o cérebro e produzem os sintomas clássicos de comportamento doentio, incluindo a redução na atividade locomotora e comportamentos exploratórios e anorexia.

A manifestação da resposta imunológica de fase aguda inclui aspectos que dependem, dentre outros, do estado prévio do organismo, da temperatura ambiente e do grau de exposição ao agente infeccioso. (BIESMANS et al., 2013; BURKOVSKIY; ZHOU; LEHMANN, 2013; GRANGER et al., 2013). Nossos resultados evidenciaram que o comportamento doentio subsequente à exposição ao LPS está sujeito às variações de aparatos, ao curso temporal e ao tipo de comportamento avaliado. Estes resultados corroboram com estudos anteriores, que avaliaram a importância do emprego de múltiplas doses e diferentes testes em tratamentos sistêmicos com LPS, indicando que os efeitos atribuídos à endotoxemia são sujeitos às variações de protocolos (DOGAN; ATAUGLU; AKARSU, 2000; BASSI et al. 2012).

Identificamos que a dose de 200 µg/Kg foi a que melhor evidenciou o comportamento doentio nos testes avaliados, sendo suficiente para produzir as alterações comportamentais induzidas pela endotoxemia. A dose mais alta utilizada, 500 µg/Kg não produziu efeitos mais pronunciados sobre o comportamento doentio, não sendo, portanto, necessário o uso de concentrações maiores. A dose escolhida está em consonância com os estudos de Bassi et al. (2012) que investigaram os

efeitos de doses crescentes de LPS sobre o comportamento doentio, identificando o pico de manifestação do comportamento doentio nesta concentração.

No teste de Campo Aberto nossos resultados divergem do estudo de TARR et al (2012) que encontraram redução da atividade locomotora com doses muito baixas (10 µg/Kg). Uma possível explicação para a discrepância nestes resultados é a diferença na linhagem de animal utilizada e no tipo de cepa de LPS administrada nos experimentos. Ademais, a redução do comportamento exploratório e da atividade locomotora, associada ao aumento da imobilidade no Nado Forçado encontrados em nosso trabalho estão em consonância com os resultados de diversos trabalhos que investigaram o comportamento doentio durante a endotoxemia (DUNN; SWIERGIEL, 2005; GODBOUT et al., 2008; DEAK et al., 2005; DE PAIVA et al., 2010; BASSI et al., 2012; BURKOVSKIY, ZHOU; LEHMANN, 2013).

A resposta à endotoxemia cursa com letargia e redução de mobilidade, decorrente do efeito da mobilização de citocinas e outros mediadores no sistema nervoso central (GRANGER et al., 2013; RORATTO et al., 2013). Nossos resultados no teste de Campo Aberto divergem do estudo de O'CONNOR et al (2009) que encontraram redução da atividade locomotora 24 horas após o LPS. Porém, a dose utilizada (830 µg/kg) foi muito superior à usada em nosso estudo. Pesquisas envolvendo as respostas comportamentais à endotoxemia têm demonstrado que a magnitude do comportamento doentio se relaciona à gravidade da resposta inflamatória sistêmica desencadeada pelo agente infeccioso (TARR et al., 2012; LAWSON; MCCUSKER; KELLEY, 2013; GRANGER et al., 2013). Desta forma, tanto a dose utilizada quanto a forma de administração do patógeno são fundamentais na manifestação das alterações comportamentais características da resposta doentia.

Swiergel e Dunn (2007) demonstraram que o comportamento doentio induzido tanto por LPS quanto por IL1 é dose-dependente, sugerindo que as citocinas produzidas durante a infecção são as responsáveis por mediar as alterações comportamentais. Estas citocinas influenciam os sistemas adrenérgico e serotoninérgico, refletindo nas alterações emocionais que determinam o aumento da ansiedade durante o desafio imunológico. De fato, a ação das citocinas sobre o cérebro constituem o principal mecanismo de comunicação entre os sistema imune e

nervoso, constituindo-se em uma resposta adaptativa do organismo para lidar com a infecção (DANTZER; KELLEY, 2007).

Em relação aos aspectos concernentes à memória e aprendizado, nossos resultados apontam para um maior comprometimento das habilidades mneicas de longa duração. Pesquisas envolvendo endotoxemia e diversos tipos de memória têm encontrado resultados contraditórios no tocante ao prejuízo cognitivo (JACEWICZ et al., 2009; HABA et al., 2012; VALERO, 2014). Os efeitos da aplicação do LPS sobre os resultados dos testes de memória variam de acordo com o intervalo de aplicação e o tempo decorrido até a avaliação das habilidades mneicas.

No teste de memória de reconhecimento de objetos, a aplicação do LPS não interferiu na memória de curto prazo, apesar de influenciar o tempo de exploração dos objetos. Konsman, Parnet e Dantzer (2002) relataram a influência das citocinas durante a resposta imune como fator de interferência na motivação para os hábitos naturais de cada espécie. Desta forma, o principal aspecto envolvido em um possível prejuízo mneico durante a endotoxemia seria o menor interesse na exploração dos elementos do teste. Por outro lado, a memória de longo prazo tende a ser mais prejudicada, visto o aumento da necessidade de substratos energéticos no processo de retenção. Durante a endotoxemia, o organismo tende a economizar energia para direcioná-la ao combate à infecção (STRAUB, 2014), o que pode responder pelo prejuízo cognitivo na memória de longo prazo.

Neste mesmo sentido, a memória espacial avaliada pelo Labirinto Aquático de Morris (LAM) demonstrou ser sensível aos efeitos do LPS quando este foi aplicado 24 horas antes do início dos treinos. SPARKMAN et al. (2005) encontraram prejuízo durante a fase de aprendizado no LAM em dois protocolos distintos. Entretanto, não foram encontradas diferenças na memória espacial na fase final do teste. Os autores destacaram a dificuldade de se determinar se a alteração da performance nas fases de treino foi mediada por comprometimento cognitivo ou motor.

Em nosso trabalho, além de afetar o desempenho nas fases de treino dos animais endotoxêmicos, identificamos também o comprometimento da memória espacial na avaliação do *probe trial*, sugerindo que a endotoxemia possa comprometer a capacidade de formação de novas memórias, uma vez que o organismo prioriza a economia de energia para lidar com a infecção, além de reduzir a sinalização

serotoninérgica, essencial no processamento mneico (DANTZER; KELLEY, 2007). Estes resultados reforçam a necessidade do cuidado em se atribuir os efeitos sobre as respostas mneicas ao desafio imunológico, com especial importância para o intervalo de aplicação. (CUNNINGHAM; SANDERSON, 2008).

No teste de esferas, evidenciamos que em qualquer uma das doses utilizadas, a quantidade de esferas escondidas foi menor em relação aos controles. Entretanto, não podemos atribuir este resultado a uma redução da ansiedade nos animais endotóxicos. Possivelmente, o comportamento voltado à economia de energia pode ter levado a perda da motivação natural para o enterramento em situações de estresse (BOER; KOOLHAAS, 2002).

A avaliação do comportamento doentio nos animais hipotireoideos revelou que a manipulação do estado tireoidiano modifica as respostas ao LPS. Após a administração do LPS, animais com hipotireoidismo induzido pelo PTU apresentaram um atraso nas manifestações do comportamento doentio, porém estas foram acentuadas em momentos mais tardios da endotoxemia. A redução da atividade locomotora em campo aberto e o aumento da imobilidade no nado forçado não se manifestam na segunda hora após o desafio imunológico, sugerindo a participação dos hormônios tireoidianos nos mecanismos que determinam a resposta inflamatória aguda (VAN HAASTEREN et al., 1994). Contudo, a resposta doentia torna-se evidente em momentos mais tardios, indicando que a redução dos hormônios tireoidianos compromete o tempo das respostas ao desafio imunológico, mas não impede que estas ocorram.

Estes resultados fornecem evidências de que o estado da tireoide atua como modulador para o desenvolvimento de sintomas depressivos e comportamentos exploratórios em camundongos, porque o pré-tratamento com o PTU provoca um atraso nas mudanças comportamentais após a aplicação do LPS em relação aos animais eutireoideos. Embora alguns estudos atribuam o aumento da imobilidade no nado forçado durante a endotoxemia a uma redução da atividade locomotora (STRAUB, 2014), outros afirmam que esse sintoma resulta da presença de sintomas depressivos, que são causadas pela situação inescapável, imposta pelo teste, resultando em comportamento do tipo depressivo (GODBOUT et al., 2008; CASTAGNÉ et al., 2010). Além disto, sugere-se que o comportamento de imobilidade

decorra da adaptação do animal para poupar energia durante a infecção; neste sentido, a redução da mobilidade reflete a adequação do organismo em priorizar as funções vitais (DANTZER; KELLEY, 2007; DANTZER, 2009).

Resultados de trabalhos que investigaram a influência dos hormônios tireoidianos na resposta inflamatória são controversos (GARCIA-LEME; FARSKY, 1993). Nesta revisão, os autores destacam a multiplicidade dos efeitos dos hormônios tireoidianos sobre as vias metabólicas, as atividades enzimáticas e sobre as respostas dos tecidos alvo de outros hormônios como fatores que podem influenciar os resultados obtidos nestas investigações. Entretanto, pesquisas mais recentes enfocando as ações dos hormônios tireoidianos como moduladores da função celular e ainda suas ações não-genômicas (DE VITO et al., 2011. DE VITO et al., 2012) evidenciaram que os níveis de hormônios tireoidianos são capazes de alterar a resposta imune, funcionando como estimuladores e protetores da função imunológica.

Possivelmente, a inibição das respostas agudas ao desafio imunológico pode decorrer da modulação negativa sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal no hipotireoidismo, reduzindo assim a resposta inflamatória induzida por LPS (RODRIGUEZ et al, 2005). Por outro lado, a exacerbação do comportamento doentio mais tardiamente reforça a nossa hipótese de um atraso nas manifestações desta resposta em condições de baixa disponibilidade dos hormônios tireoidianos.

As análises da ingestão alimentar e do ganho de peso ao longo de 24 horas após o desafio imunológico demonstraram que, à princípio, os animais do grupo PTU e do grupo controle respondem igualmente à endotoxemia. LPS causou redução na ingestão de alimentos em ambos os grupos até a décima segunda hora, à semelhança de outros estudos que investigaram o comportamento ingestivo durante o desafio imunológico (AKASAKA et al., 2006; et al., 2012; RORATO et al, 2008). Porém, a partir desta hora, animais do grupo PTU permanecem ingerindo menor quantidade de alimento, tanto em relação aos grupos tratados com salina quanto aos controles tratados com LPS, com conseqüente maior perda de peso. Estes resultados apontam também para o fato que a resposta ao LPS encontra-se atrasada nos animais hipotireoideos.

O impacto dos hormônios tireoidianos no metabolismo e gasto energético está bem estabelecido (GROBA et al., 2013; CHEN et al., 2013). O peso corporal é

estritamente dependente do estado tireoidiano e sua manutenção envolve a ação direta dos hormônios tireoidianos em mecanismos distintos da ingestão alimentar. Neste sentido, o estado tireoidiano pode alterar as respostas à endotoxemia, uma vez que a manutenção de níveis adequados de hormônios tireoidianos é essencial para regular a homeostase energética, o metabolismo lipídico e a produção de calor (SILVA, 2010; NILLNI, 2010; BRIX et al., 2011; ZHU; CHENG, 2011).

Sugere-se ainda que as alterações na distribuição de gordura corporal podem diminuir ou exacerbar as respostas ao LPS (LAWRENCE; BROUGH; KNIGHT, 2012). Durante a endotoxemia, ocorre inibição direta dos neurônios orexígenos, sendo um dos mecanismos responsáveis por reduzir a exploração no comportamento doentio (DUNN; SWIERGIEL, 2001; ELANDER ET et al., 2007; GOEHLER; GAYKEMA, 2009; HARDEN et al.; 2011). Em adição, pesquisas têm demonstrado que os mecanismos responsáveis pela hipofagia na endotoxemia são diferentes dos que determinam a inibição locomotora (ELANDER et al., 2007; UETA; OLIVARES; BIANCO, 2011). Uma vez que não encontramos alteração na função locomotora, porém a ingestão alimentar foi reduzida nos animais hipotireoideos, sugerimos que a deficiência dos HTs pode ampliar os efeitos de inibição dos neurônios orexígenos durante a endotoxemia. De acordo com ALVA-SÁNCHEZ et al. (2012) o comportamento está parcialmente sujeito a uma ação direta dos hormônios tireoidianos no cérebro, e este efeito é independente do gasto energético nos órgãos periféricos.

Neste sentido, nós hipotetizamos que poderia haver um comprometimento da capacidade de produzir febre nos animais em condição de hipotireoidismo. Porém, observamos que o aumento de temperatura ocorreu no grupo PTU, mas de maneira gradativa, com picos mais tardios de temperatura. As análises da área sob a curva do período entre a 1^a e 4^a horas após o LPS, onde se espera o aparecimento rápido da febre (SOARES et al., 2012), revelaram um maior índice térmico nos animais controle. Entretanto, a redução dos hormônios tireoidianos no grupo PTU também pode ter contribuído para a demora no aparecimento da febre. Doses de LPS semelhantes à utilizada em nosso estudo produzem aumento de temperatura nas duas primeiras horas após aplicação (RUDAYA et al., 2006).

O atraso induzido pelo hipotireoidismo nas respostas fisiológicas e comportamentais ao desafio imunológico foi demonstrado pelo fato de que o pré-

tratamento com PTU alterou o início da resposta febril nos animais hipotireoidianos. O desenvolvimento da resposta febril ao lipopolissacarídeo no hipotireoidismo experimental ainda não foi estudado. Um estudo anterior relatou que a diminuição da resposta febril de coelhos com deficiência de hormônios da tireoide é devida à redução do número de receptores b-adrenérgicos ou da alteração na disponibilidade do neurotransmissor nos tecidos com atividade termogênica, tais como o tecido adiposo marrom (MACARI E et al., 1987). De fato, os hormônios tireoidianos participam ativamente nos processos de produção e conservação do calor e aumentam os efeitos metabólicos das catecolaminas nos mecanismos de regulação térmica (LITTLE et al., 2013; WARNER et al., 2013; STRAUB, 2014).

Além disto, a ativação de neurônios TRH do hipotálamo poderia representar um dos mediadores hormonais não térmicos que modulam os circuitos termorregulatórios e alteram o *set point* (KEIL et al., 1994). Embora os mecanismos que modulam o *set point* no hipotireoidismo não sejam completamente conhecidos, demonstramos que a resposta febril foi adiada nesta condição, corroborando com a demora na manifestação de comportamento doentio. Uma das possíveis causas para esse achado seria a baixa capacidade de produção de citocinas que ocorre quando os níveis periféricos dos hormônios tireoidianos diminuem (LITTLE et al., 2012). Estudos anteriores demonstraram níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com hipertireoidismo (LAKATOS et al., 1997). Ademais, o tratamento do hipertireoidismo foi associado com um aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (SIDDIQI et al., 1988).

Em adição, o aparecimento da febre durante as fases iniciais da endotoxemia está diretamente relacionado à produção de prostaglandinas, onde as temperaturas mais altas são registradas concomitante às maiores concentrações de prostaglandinas no tecido cerebral (ROMANOVSKY et al., 2008; ENGSTRÖM et al., 2012). A condição de hipotireoidismo é associada à diminuição na produção de prostaglandina por reduzir a expressão da prostaglandina sintetase em regiões específicas do cérebro (García-Fernández et al., 1997), sendo também um possível fator que contribuiu para o aparecimento tardio da febre após o desafio imunológico.

Paralelamente ao menor índice térmico encontrado nas primeiras horas da endotoxemia no grupo PTU, identificamos uma menor expressão de Fos no PVN, uma

área sensível ao LPS sistêmico tanto em baixas dosagens quanto em concentrações maiores (TARR et al., 2012). A ativação do PVN por lipopolissacarídeo resulta, dentre outros fatores, da estimulação noradrenérgica e da produção de prostaglandinas (CONDÉ et al., 1999; MATSUOKA et al., 2003). Desta forma, a reduzida capacidade de produzir prostaglandinas (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 1997) aliada à diminuta atividade adrenérgica no estado hipotireoideano (BILEZIKIAN; LOEB, 1983) podem ser sugeridos como mecanismos responsáveis por reduzir a ativação dos neurônios paraventriculares nos animais do grupo PTU.

Por outro lado, a resposta no SON foi semelhante tanto no grupo controle quanto nos animais tratados com PTU, com aumento na expressão de Fos 02 horas após aplicação do LPS (LAWRENCE; BROUGH; KNIGHT, 2012). Além disto, não encontramos diferenças no BST após o desafio imunológico nos animais com hipotireoidismo induzido por PTU. Entretanto, quando tratado com salina, os animais hipotireoideos também apresentaram aumento da expressão de Fos no BST comparado ao grupo controle. WAGNER et al. (1994) identificaram que os efeitos do PTU sobre a expressão de Fos só ocorreu na ausência de alterações na condição basal. Assim, o aumento da ativação neural nos animais tratados com PTU em nosso trabalho possa justificar a ausência de modificações na expressão após o desafio imunológico.

De particular interesse, nos animais tratados com PTU, encontramos um menor número de células positivas para Fos na mPOA, na segunda hora após o LPS. Estes resultados corroboram com nossa hipótese do aparecimento tardio da febre no grupo hipotireoideo. Sendo a mPOA a principal área responsável pelo controle termorregulatório (Boulant, 1981), a menor ativação neural nesta área demonstra que as alterações térmicas no grupo hipotireoideo são menos pronunciadas em relação aos controles. GORDON (1997) demonstrou que animais tratados com PTU exibem diminuição no *set point*. Porém, o fato do índice térmico dos grupos controle e tratado com PTU se igualar a partir da quarta hora, ratifica o aparecimento tardio da febre no grupo PTU. Em conjunto, os resultados encontrados para a ativação neural após a segunda hora de aplicação do LPS confirmam que as respostas comportamentais à endotoxemia estão atrasadas nos animais com hipotireoidismo.

A modulação das células imunitárias na distribuição do stress e na endotoxemia aguda é uma resposta adaptativa para potenciar a vigilância imunitária e aumentar a capacidade do sistema imunitário em responder a um desafio. A manipulação do estado tireoidiano pode levar ao comprometimento da imunocompetência, uma vez que os hormônios tireoidianos participam ativamente da sinalização celular e da comunicação neural (De Vito et al., 2012). A partir dos nossos resultados, sugerimos que a redução dos hormônios tireoidianos diminui a capacidade do organismo em responder ao desafio imunológico, refletindo-se no atraso das manifestações do comportamento doentio, no início tardio da febre (SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2014) e em uma menor expressão de Fos nas primeiras horas em regiões classicamente ativadas pela endotoxemia (WAN et al., 1994).

A comunicação entre os sistemas nervoso, imunológico e endócrino, constituindo um sistema psiconeuroimunoendócrino, é a base da manutenção da homeostase e, por conseguinte, da saúde. Cada um destes sistemas é complexo e as interações entre estes mostram ainda maior complexidade. A modulação do sistema neuroendócrino sobre a atividade do sistema imune é particularmente importante nas interações mediadas pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide uma vez que as células do sistema imune contribuem para a regulação da atividade deste eixo, especialmente nos períodos de estresse imunológico. (KLEIN, 2006). Desta forma, as alterações do estado tireoidiano tornam-se de especial interesse no manejo de condições que envolvem a resposta imune.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que o hipotireoidismo atrasa as respostas psiconeuroendócrinas ao desafio imunológico, sugerindo que os hormônios tireoidianos são essenciais para a regulação da temperatura corporal e para as manifestações do comportamento doente durante a endotoxemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKASAKA, S. et al. The hypothalamo-pituitary axis responses to lipopolysaccharide-induced endotoxemia in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Brain Research**. 1089(1):1-9, 2006.
- ALVA-SÁNCHEZ, C. et al. The long-term regulation of food intake and body weight depends on the availability of thyroid hormones in the brain. **Neuroendocrinology Letters**. 33(7):703-8, 2012.
- ALZOUBI, K.H. et al. Levothyroxin Restores Hypothyroidism-Induced Impairment of Hippocampus-Dependent Learning and Memory: Behavioral, Electrophysiological, and Molecular Studies. **HIPPOCAMPUS**. 19:66–78, 2009.
- ANNERBO, S.; LOKK, J. A Clinical Review of the Association of Thyroid Stimulating Hormone and Cognitive Impairment. **Endocrinology**. 2013:1-6, 2013.
- AUBERT, A. Sickness and behavior in animals: a motivational perspective. **Neuroscience and Bio behavioral Reviews**. 23:1029-1036, 1999.
- BANKS, W.A.; ERICKSON, M.A. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. **Neurobiology of Disease**. 37:26–32, 2010.
- BASSI et al. Lipopolysaccharide-Induced Sickness Behaviour Evaluated in Different Models of Anxiety and Innate Fear in Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. 110:359–369, 2012.
- BIANCO, A.C; KIM, B.W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. **The Journal of Clinical Investigation**. 116(10): 2571-79, 2006.
- BIANCO, A.C. et al. American Thyroid Association Guide to Investigating Thyroid Hormone Economy and Action in Rodent and Cell Models. **Thyroid**. 24(1):88-168, 2014.
- BEISHUIZEN, A; THIJS, L.G. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Journal of Endotoxin Research**. 9(1):3-24, 2003.
- BLATTEIS, C.M. Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacology & Therapeutics**. 111:194 – 223, 2006.
- BIESMANS S. et al. Systemic Immune Activation Leads to Neuroinflammation and Sickness Behavior in Mice. **Mediators of Inflammation**. 2013:14p, 2013.

BILEZIKIAN, J.P.; LOEB, J.N. The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on alpha- and beta-adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness. **Endocrine Reviews**. 4(4):378-88, 1983.

BOELEN, A. et al. Simultaneous changes in central and peripheral components of the hypothalamus–pituitary–thyroid axis in lipopolysaccharide-induced acute illness in mice. **Journal of Endocrinology**. 182:315–23, 2004.

BOER, S.F.; KOOLHAS, J.M. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. **European Journal of Pharmacology**. 463:145-161, 2003.

BOULANT, J. A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 29(856):108-15, 1998.

BORNER, T. et al. Lipopolysaccharide inhibits ghrelin-excited neurons of the arcuate nucleus and reduces food intake via central nitric oxide signaling. **Brain, Behavior, and Immunity**. 26:867–879, 2012.

BRENT, G.A. Mechanisms of thyroid hormone action. **Journal of Clinical Investigation**. 122(9):3035-44, 2012.

BRIX, K.; FUHER, D.; BIEBERMANN, H. Molecules important for thyroid hormone synthesis and action - known facts and future perspectives. **Thyroid Research**. 4 (Suppl 1):S9, 2011.

BROWN, B.T.; BONELLO, R.; POLLARD, H. The biopsychosocial model and hypothyroidism. **Chiropractic & Osteopathy**.13(1):5, 2005.

BURKOVSKIY, I.; ZHOU, J; LEHMANN, C. Use of *Escherichia coli* toxins in sepsis models. **Advances in Bioscience and Biotechnology**. 4:424-29, 2013.

CASTAGNÉ, V. Rodent Models of Depression: Forced Swim and Tail Suspension Behavioral Despair Tests in Rats and Mice. **Current Protocols in Pharmacology**. 8:10, 2010.

CHEN, C. et al. Biological significance of a thyroid hormone-regulated secretome. **Biophysica Acta**. 1834:2271–2284, 2013.

CONDÉ, G.L.; et al. Central LPS-induced c-fos expression in the PVN and the A1/A2 brainstem noradrenergic cell groups is altered by adrenalectomy. **Neuroendocrinology**. 70(3):175-85, 1999.

COHEN-LEHMAN, J.; DANZI, S.; KLEIN, I. Effects of amiodarone therapy on thyroid function. **Nature Reviews Endocrinology**. 6:34-41, 2010.

CORREIA, N. et al. Evidence for a Specific Defect in Hippocampal Memory in Overt and Subclinical Hypothyroidism. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 94(10):3789–3797, 2009.

- CUNNINGHAM, C.; SANDERSON, D.J. Malaise in the water maze: untangling the effects of LPS and IL-1 β on learning and memory. **Brain, Behavior, and Immunity**. 22(8):1117–1127, 2008.
- DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? **Brain, Behavior, and Immunity**. 15(1):7-24, 2001.
- DANTZER R, KELLEY KW. Twenty Years of Research on Cytokine-Induced Sickness Behavior. **Brain, Behavior, and Immunity**. 21(2):153–160, 2007.
- DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. **Immunology And Allergy Clinics of North America**. 29(2): 247–264, 2009.
- DANTZER, R. et al. Cytokines and sickness behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 840:586-90, 1998.
- DE PAIVA, V.N. et al. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. **Behavioural Brain Research**. 215:146–151, 2010.
- DE VITO, P. et al., Thyroid hormones as modulators of immune activities at the cellular level. **Thyroid**. 21(8):879-90, 2011.
- DE VITO, P.; BALDUCCI, V. et al. Nongenomic effects of thyroid hormones on the immune system cells: New targets, old players. **Steroids**. 77:988–995, 2012.
- DI COMITÉ, G. et al. Conversation galante: How the immune and the neuroendocrine systems talk to each other. **Autoimmunity Reviews**. 7:23-29, 2007.
- DOGAN, M. D.; ATAOGU, H.; AKARSU, E.S. Effects of different serotypes of Escherichia coli lipopolysaccharides on body temperature in rats. **Life Sciences**. 67:2319–29, 2000.
- DONG, H.; WADE, M.; WILLIAMS, A. Molecular insight into the effects of hypothyroidism on the developing cerebellum. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 330:1182–1193, 2005.
- DUNN, A.J.; SWIERGIEL, A.H. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 81:688 – 693, 2005.
- ENGBLOM, D. et al. Induction of microsomal prostaglandin E synthase in the brain endothelium and parenchyma in adjuvant-induced arthritis. **Journal of Comparative Neurology**. 452:205-2014, 2012.
- ELANDER, L. et al. IL-1 and LPS induce anorexia by distinct mechanisms differentially dependent on microsomal prostaglandin E synthase-1. **Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 292:258-267, 2007.

ENDO, T; KOBAYASHI, T. Thyroid-stimulating hormone receptor in brown adipose tissue is involved in the regulation of thermogenesis. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**. 295: 514–18, 2008.

ENGSTRÖM, L. et al. Lipopolysaccharide-Induced Fever Depends on Prostaglandin E2 Production Specifically in Brain Endothelial Cells. **Neuroendocrinology**. 153(10):4849-61, 2012.

FERREIRA, E. et al. SERAKIDES, R.; GOMES, A.E.S.; CASSALI, G.D. Model of induction of thyroid dysfunctions in adult female mice. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine and Animal Science**. 59(5):1245-49, 2007.

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

FONSECA, T.L. et al. Coordination of hypothalamic and pituitary T3 production regulates TSH expression. **Journal of Clinical Investigation**. 123(4):1492–1500, 2013.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, L.F. et al. Hypothyroidism alters the expression of prostaglandin D2 synthase/beta trace in specific areas of the developing rat brain. **European Journal of Neuroscience**. 9(8):1566-73, 1997.

GARCIA-LEME, J.; FARSKY, S.P. Hormonal control of inflammatory responses. **Mediators of Inflammation**. 2(3):181-198, 1993.

GE, J.F. et al. Impaired Learning and Memory Performance in a Subclinical Hypothyroidism Rat Model Induced by Hemi-Thyroid Electrocauterisation. **Journal of Neuroendocrinology**. 24:953–961, 2012.

GIUSTI-PAIVA, A.; MARTINEZ, M. R.; FELIX, J. V.; et al. Simvastatin decreases nitric oxide overproduction and reverts the impaired vascular responsiveness induced by endotoxic shock in rats. **Shock**. 21(3):271-275, 2004.

GODBOUT, J.P. et al. Aging Exacerbates Depressive-like Behavior in Mice in Response to Activation of the Peripheral Innate Immune System. **Neuropsychopharmacology**. 33(10):2341–2351, 2008.

GÖTHE, S. et al. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. **Genes & Development**. 13:1329-41, 1999.

GRANGER et al. Sepsis-induced morbidity in mice: effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain. **Psychoneuroendocrinology**. 38(7):1047–1057, 2013.

GAYKEMA, R.P.A.; GOEHLER, L.E. Lipopolysaccharide challenge-induced suppression of Fos in hypothalamic orexin neurons: Their potential role in sickness behavior. **Brain, Behavior, and Immunity**. 23:926–930, 2009.

GROBA, C. et al. Hypothyroidism Compromises Hypothalamic Leptin Signaling in Mice. **Molecular Endocrinology**. 27(4):586–597, 2013.

GUTIÉRREZ-MARISCAL, M. et al. Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdalar TRHergic neurons in anxiety. **Psychoneuroendocrinology**. 33:198–213, 2008.

GUTIÉRREZ-MARISCAL, M. et al. Acute response of hypophysiotropic thyrotropin releasing hormone neurons and thyrotropin to behavioral paradigms producing varying intensities of stress and physical activity. **Regulatory Peptides**. 179:61–70, 2012.

HABA, R. et al. Lipopolysaccharide affects exploratory behaviors toward novel objects by impairing cognition and/or motivation in mice: Possible role of activation of the central amygdala. **Behavioural Brain Research**. 228(2):423-31, 2012.

HARDEN, L.M. et al. Interleukin-10 modulates the synthesis of inflammatory mediators in the sensory circumventricular organs: implications for the regulation of fever and sickness behaviors. **Journal of Neuroinflammation**. 6(10):22, 2013.

HART. Biological basis of the behavior sickness animals. **Neuroscience & Biobehavioral Review**. 12:123-137, 1988.

HEDGE, G.A.; WRIGHT, K.C.; JUDD, A. Factors modulating the secretion of thyrotropin and other hormones of the thyroid axis. **Environmental Health Perspectives**. 38:57-63, 1981.

HELMREICH, D.L.; TYLEE D. Thyroid Hormone Regulation by Stress and Behavioral Differences in Adult Male Rats. **Hormones and Behavior**. 60(3): 284–291, 2011.

HIROI, Y. et al. Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 9:103(38):14104-9, 2006.

HODKINSON, C.F. et al., Preliminary evidence of immune function modulation by thyroid hormones in healthy men and women aged 55–70 years. **Journal of Endocrinology**. 202:55–63, 2009.

JACEWICZ, M. et al. Systemic administration of lipopolysaccharide impairs glutathione redox state and object recognition in male mice. The effect of PARP-1 inhibitor. **Folia Neuropathologica**. 47(4): 321-8, 2009.

JAHAGIRDAR, V.; McNAY, E.C. Thyroid hormones role in regulation brain glucose metabolism and potentially modulating hippocampal cognitive process. **Metabolic Brain Disease**. 27(2):101-111, 2012.

JENA, S. et al. Induction of oxidative stress and inhibition of superoxide dismutase expression in rat cerebral cortex and cerebellum by PTU-induced hypothyroidism and its reversal by curcumin. **Neurological Sciences**. 33(4):869-73, 2012.

JOHNSTONE, A.F.M. et al. Thermoregulatory deficits in adult Long Evans rat exposed perinatally to the antithyroidal drug, propylthiouracil. **Neurotoxicology and Teratology**. 39:1–8, 2013.

KEIL, R.; RIEDEL, W.; SIMON, E. Thyroid Status Modulates Hypothalamic Thermosensitivity, Vasopressin and Corticosteroid Secretion in Rabbits. **Advances in Pharmacological Sciences**. 1:321-26, 1994.

KELMER, G. Update on treatments for endotoxemia. **Veterinary Clinics of North America**. 25:259-270, 2009.

KELLEY, K.W. et al. Cytokine-induced sickness behavior. **Brain, Behavior, and Immunity**. 1(17);1-8, 2003.

KIM, B. Thyroid Hormone as a Determinant of Energy Expenditure and the Basal Metabolic Rate. **Thyroid**. 18(2):1-4, 2008.

KLECHA, et al. Integrative study of hypothalamus-pituitary-thyroid-immune system interaction: thyroid hormone-mediated modulation of lymphocyte activity through the protein kinase C signaling pathway. **Journal of endocrinological**.189(1):45-55, 2006.

KLEIN, J.R. The Immune System as a Regulator of Thyroid Hormone Activity. **Experimental biology and medicine**. 3:229-236, 2006.

KLIEVERIK, L.P et al. Thyroid Hormone Effects on Whole-Body Energy Homeostasis and Tissue-Specific Fatty Acid Uptake *in Vivo*. **Endocrinology**. 150(12):5639–5648, 2009.

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

KRUGER, T.E. et al. Thyrotropin: an endogenous regulator of the *in vitro* immune response. **Journal of Immunology**. 142(3):744–747, 1989.

KULIKOV, A.; TORRÉSANI, J.; JEANNINGROS. R. Experimental hypothyroidism increases immobility in rats in the forced swim paradigm. **Neuroscience Letters**. 234(2-3):111-4, 1997.

LAWRENCE, C.B., et al. Obese mice exhibit an altered behavioural and inflammatory response to lipopolysaccharide. **Disease Models & Mechanisms**. 5:649-659, 2012.

LAWSON, M.A.; MCCUSKER, R.H.; KELLEY, K. Interleukin-1 beta converting enzyme is necessary for development of depression-like behavior following intracerebroventricular administration of lipopolysaccharide to mice. **Journal of Neuroinflammation**.10:54, 2013.

LITTLE AG, KUNISUE T, KANNAN K, SEEBACHER F. Thyroid hormone actions are temperature-specific and regulate thermal acclimation in zebrafish (*Danio rerio*). **BMC Biology**.26:11-26, 2013.

LO, M. et al. Acute effects of thyroid hormones on the production of adrenal cAMP and corticosterone in male rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**. 274(2):238-45,1998.

LOFTIS J.M. et al. Neuroimmune mechanisms of cytokine-induced depression: current theories and novel treatment strategies. **Neurobiology of Disease**. 37(3): 519-533, 2010.

LÓPEZ, M. et al. Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. **Trends in Molecular Medicine**. 19(7):418-27, 2013.

MACARI, M.; PELÁ, M.I.R.; SILVA, C.A.A. The development of a febrile response to pyrogen in the thyroid-deficient rabbit. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 65(6):1325-28,1987.

MARTIN et al. Effectes of voluntary Wheel running on LPS-induced sickness behavior in aged mice. **Brain, Behavior, and Immunity**. 29:113-123, 2013

MATSUOKA, Y. et al. Impaired adrenocorticotrophic hormone response to bacterial endotoxin in mice deficient in prostaglandin E receptor EP1 and EP3 subtypes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 271(1):472-83, 1994.

McCUSKER, R.H.; KELLEY, K.W. Imune-neural connections: how the imune system's response to infections agentes influences behavior. **Journal of Experimental Biology**. 216:84-98, 2013.

MEINHOLD, C.L. et.al. Nonradiation risk factors for thyroid cancer in the US Radiologic Technologists Study.**American Journal of Epidemiology**. 171(2):242-52.

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

MONTERO-PEDRAZUELA, A. et al. Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior. **Journal of Molecular Psychiatry** .11(4):361-71, 2006.

- NILLNI, E.A. Regulation of the Hypothalamic Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) Neuron by Neuronal and Peripheral Inputs. **Frontiers in Neuroendocrinology**. 31(2): 134–156, 2010.
- NISHIO et al. Attenuation of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytotoxicity by tocopherols and tocotrienols. **Redox Biology**. 1: 97-103, 2013.
- O'CONNOR, J.C. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Journal of Molecular Psychiatry**. 14(5): 511–522, 2009.
- OLIVARES, E.L. et al. Social stress-induced hypothyroidism is attenuated by antidepressant treatment in rats. **Neuropharmacology**. 62:446-456,2012.
- OOTSUKA, Y. et al. Fever response to intravenous prostaglandin E2 is mediated by the brain but does not require afferent vagal signaling. **American Journal of Physiology**. 294(4):R1294-303, 2008.
- PEETERS R.P. Reduced activation and increased inactivation of thyroid hormone in tissues of critically ill patients. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. (88)3202–3211, 2003.
- PILHATSCH, M. et al. Increased depressive behaviour in mice harboring the mutant thyroid hormone receptor alpha 1. **Behavioural Brain Research**. 214:187-92, 2010.
- PITYCHOUTIS, P.M. et al. Neurochemical and behavioral alterations in an inflammatory model of depression: sex differences exposed. **Neuroscience**. 159:1216–32, 2009.
- PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**. 229(2):327-36,1977.
- PUGH, C.R. et al. The immune system and memory consolidation: a role for the cytokine IL-1 β . **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. 25(1)29-41, 2001.
- RAY, D.C. Endocrine measurements in survivors and non-survivors from critical illness. **Intensive Care Medicine**.28:1031-1308, 2002.
- RENAULT, J.; GHEUSI, G.; AUBERT, A.; Changes in social exploration of a lipopolysaccharides-treated conspecific in mice: of environmental cues. **Brain, Behavior, and Immunity**. 22:1201-7,2008.
- RODRIGUEZ, T.T. et al. Hypothyroidism attenuates stress-induced prolactin and corticosterone release in septic rats. **Experimental Physiology**. 88.6,755–760, 2003.

ROGGERS, P.; WEBB, G.P. Estimation of body fat in normal and obese mice. **British Journal of Nutrition**. 43:83-6,1980.

RORATO, R. et al. Prostaglandin mediates endotoxaemia-induced hypophagia by activation of pro-opiomelanocortin and corticotrophin-releasing factor neurons in rats. **Experimental Physiology**. 94:371–9,2009.

ROZING, M.P. et al. Serum triiodothyronine levels and inflammatory cytokine production capacity. **AGE**. 34:195–201, 2012.

RUDAYA, A.Y. et al. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. **Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 289:1244–52, 2005.

SALA-ROCAA, J. et al. Effects of chronic dysthyroidism on activity and exploration. **Physiology & Behavior**. 77:125-33, 2002.

SANTOS-SOUTO, I.J. et al. Voluntary Running in Young Adult Mice Reduces Anxiety-Like Behavior and Increases the Accumulation of Bioactive Lipids in the Cerebral Cortex. **Plos One**. 8(12):81459, 2013.

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. **Brain, Behavior, and Immunity**. 23:1038-1052, 2009.

SHIN, J. et al. α -Asarone Ameliorates Memory Deficit in Lipopolysaccharide-Treated Mice via Suppression of Pro-Inflammatory Cytokines and Microglial Activation. **Biomolecules & therapeutics**. 22:(1)17-26, 2014.

SIDDIQI, A. et al. Triiodothyronine regulates the production of interleukin-6 and interleukin-8 in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells. **Journal of Endocrinology**. 157:453–61,1998.

SILVA, V.C.; GIUSTI-PAIVA, A. Sickness Behavior is delayed in hypothyroid mice. **Brain, Behavior, and Immunity**. 45:109-117, 2015.

SILVA, J.E. Fat and Energy Economy in Hypo- and Hyperthyroidism Are Not the Mirror Image of One Another. **Endocrinology**. 151(1):4–6, 2010.

SMITH, J.W. et al. Thyroid hormones, brain function and cognition: a a brief review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. 26:45-60, 2012.

SOARES, D.M. et al. A crucial role for IL-6 in the CNS of rats during fever induced by the injection of live *E. coli*. **Medical Microbiology and Immunology**. 201:47–60, 2012.

SIOPI, E. et al. Evaluation of late cognitive impairment and anxiety states following traumatic brain injury in mice: The effect of minocycline. **Neuroscience Letters**. 511(2):110-5, 2012.

SPARKMAN, N.L. et al. Bacterial endotoxin-induced behavioral alterations in two variations of the Morris water maze. **Physiology & Behavior**. 86:244-251, 2005.

STEINER, A. A. et al. The hypothermic response to bacterial lipopolysaccharide critically depends on brain CB1, but not CB2 or TRPV1, receptors. **Journal of Physiology**. 589:2415-31, 2011.

STRAUB, R.H. Interaction of the endocrine system with inflammation: a function of energy and volume regulation. **Arthritis Research & Therapy**. 16:203, 2014.

SUI, L.; GILBER, M.E. Pre- and postnatal propylthiouracil-induced hypothyroidism impairs synaptic transmission and plasticity in area CA1 of the neonatal rat hippocampus. **Endocrinology**. 144(9):4195-203, 2003.

SUN, Y. et al. TRH Receptor Type 2 Deficient Mice are Euthyroid and Exhibit Increased Depression and Reduced Anxiety Phenotypes. **Neuropsychopharmacology**. 34(6):1601–08, 2009.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**. 404:661-71, 2000.

TARR, A.J. et al. Neural and behavioral responses to low-grade inflammation. **Behavioural Brain Research**. 235:334–41, 2012.

THOMAS, A. et al. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior. **Psychopharmacology**. 204(2): 361–73, 2009.

UETA, C.B.; OLIVARES, E.L.; BIANCO, A.C. Responsiveness to Thyroid Hormone and to Ambient Temperature Underlies Differences Between Brown Adipose Tissue and Skeletal Muscle Thermogenesis in a Mouse Model of Diet-Induced Obesity. **Endocrinology**. 152(9):3571–81, 2011.

VAN HAASTEREN, G.A. et al. Different effects of continuous infusion of interleukin-1 and interleukin-6 on the hypothalamic-hypophysial-thyroid axis. **Endocrinology**. 135(4):1336-45, 1994.

VALERO, J. Long-term effects of an acute and systemic administration of LPS on adult neurogenesis and spatial memory. **Frontiers in Neuroscience**. 21(8):83, 2014.

ZENG, H. et al. Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor 1-Deficient Mice Display Increased Depression and Anxiety-Like Behavior. **Molecular Endocrinology**. 21(11):2795–2804, 2007.

ZHU, X.; CHENG, S. New insights into regulation of lipid metabolism by thyroid hormone. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**. 17(5):408–413, 2010.

WAN, W. et al. Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain. **Brain Research Bulletin**. 34(1):7-14, 1994.

WARNER, A. et al. Inappropriate heat dissipation ignites brown fat thermogenesis in mice with a mutant thyroid hormone receptor $\alpha 1$. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 110:16241–46, 2013.

WEIL, Z.M. et al. Social interactions alter proinflammatory cytokine gene expression and behavior following endotoxin administration. **Brain, Behavior, and Immunity**. 20:72-9, 2006.

WEISSEL, M. Highlights in thyroidology: a historical vignette. **Wiener Klinische Wochenschrift**. 126:(9-10):311-9, 2014.

WILCOSON, J.S. et al. Behavioral inhibition and impaired spatial learning and memory in hypothyroid mice lacking thyroid hormone receptor α . **Behavioural Brain Research**. 177:109–116, 2007.

WU, S. et al. Metabolic Profiling Provides a System Understanding of Hypothyroidism in Rats and Its Application. **Plos One**. 8(2):55599, 2013.

YEN, P. M. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. **Physiological Reviews**. 81(3): 1097-142 , 2001.

ANEXOS A - TABELAS

Tabela 2 - Médias e erros-padrão dos grupos tratados com diferentes doses de LPS no teste de Campo Aberto.

Parâmetros	Veículo	100µg/kg	200µg/kg	500µg/kg	F
Centro	24,75±2,25	28,00±4,03	8,12±1,10	13,25±2,15	F _{3,31} = 12.98, P<0.0001
Periferia	59,25±2,31	55,13±2,25	26,75±1,67	36,25±5,76	F _{3,31} = 20.45, P<0.0001
Total	84,00±2,56	83,13±5,71	34,88±1,24	49,50±7,34	F _{3,31} = 25.60, P<0.0001
Rearings	23,50±3,94	21,00±1,90	10,13±1,73	14,75±3,76	F _{3,31} = 4.037, P=0.01

Tabela 3 - Médias e erros-padrão dos grupos tratados com diferentes doses de LPS nos testes de Esconder Esferas (a) e Nado Forçado (b).

Parâmetros	Veículo	100µg/kg	200µg/kg	500µg/kg	F
Nº de esferas escondidas (a)	6,0±1,53	0,25±0,16	2,12±1,18	0,0±0,0	F _{3,31} = 8.101, P=0.0005
Tempo de Imobilidade (b)	81,75±3,92	97,25±3,84	172,6±5,13	194,4±3,97	F _{3,31} = 169.4, P<0.0001

Tabela 4 - Médias e erros-padrão dos grupos tratados com diferentes doses de LPS no teste de Memória de Reconhecimento de Objetos – Curta Duração.

Parâmetros	Veículo	100µg/kg	200µg/kg	500µg/kg	F
TEA	9,0±1,13	9,50±0,18	5,25±0,25	3,50±0,56	F _{3,31} = 19.88, P<0.0001
TEC	28,00±1,13	28,50±1,32	16,50±0,70	7,50±0,56	F _{3,31} = 105.3, P<0.0001
TNE	264,0±0,37	266,5±1,32	262,5±5,10	289,0±1,13	F _{3,31} = 21.20, P<0.0001
IR	0,77±0,039	0,84±0,005	0,71±0,03	0,69±0,02	F _{3,31} = 5.889, P=0.003

Nota: TEA – Tempo de exploração do objeto A; TEC – Tempo de exploração do objeto C; TNE – Tempo de não-exploração; IR – Índice de Reconhecimento

Tabela 5 - Médias e erros-padrão dos grupos tratados com diferentes doses de LPS no teste de Memória de Reconhecimento de Objetos – Longa Duração.

Parâmetros	Veículo	100µg/kg	200µg/kg	500µg/kg	F
TEA	10,50±1,44	13,25±0,75	15,00±3,13	5,50±0,86	F _{3,31} = 5.195, P=0.01
TED	22,50±2,07	26,50±0,56	27,00±2,26	13,50±0,94	F _{3,31} = 14.63, P<0.0001
TNE	267,0±3,57	259,5±0,670	256,5±5,59	277,7±2,99	F _{3,31} = 6.653, P=0.0027
IR	0,69±0,01	0,65±0,003	0,63±0,01	0,63±0,01	F _{3,31} = 3.943, P=0.01

Nota: TEA – Tempo de exploração do objeto A; TED – Tempo de exploração do objeto C; TNE – Tempo de não-exploração; IR – Índice de Reconhecimento

Tabela 6 - Médias e erros-padrão dos grupos tratados com diferentes doses de LPS no teste de Labirinto em Cruz Elevado.

Parâmetros	Veículo	100µg/kg	200µg/kg	500µg/kg	F
EBF	3,42±0,75	2,57±0,61	1,14±0,45	0,85±0,34	F _{3,31} = 0.2847, ns
EBA	4,71±1,37	5,42±1,17	3,85±0,98	4,85±1,29	F _{3,31} = 4.645, P=0.01
TBF	15,86±3,55	13,00±3,89	4,85±2,20	2,71±1,06	F _{3,31} = 4.715, P=0.01
TBA	284,1±3,55	287,0±3,89	295,1±2,20	297,3±1,06	F _{3,31} = 4.715, P=0.01

Nota: EBF – Número de entradas nos braços fechados; EBA – Número de entradas nos braços abertos; TBF – tempo nos braços fechados; TBA – tempo nos braços abertos

Tabela 7 - Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com propiltiouracil (PTU) adicionado à água de beber (estado tireoidiano) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) no teste do Campo Aberto.

Parâmetros	Estado Tireoidiano	Desafio Imunológico	Interação
02 horas			
Centro	F1,32 = 2.818, P = 0.1030	F1, 32 = 1.391, P = 0.2469	F1,32 = 2.075, P = 0.1594
Periferia	F1,32 = 17.99, P = 0.0002	F1,32 = 7.145, P = 0.0117	F1,32 = 16.11, P = 0.0021
Total	F1,32 = 26.38, P < 0.0001	F1,32 = 10.98, P = 0.0023	F1,32 = 16.93, P = 0.0003
<i>Rearing</i>	F1,32 = 3.669, P = 0.0644	F1,32 = 5.175, P = 0.0297	F1,32 = 1.210, P = 0.2796
06 horas			
Centro	F1,28 = 49.34, P <0.0001	F1,28 = 0.028, P = 0.8668	F1,28 = 11:47, P = 0.0021
Periferia	F1,28 = 71.20, P <0.0001	F1,28 = 41.86, P <0.0001	F1,28 = 51.23, P < 0.0001
Total	F1,28 = 128.1, P <0.0001	F1,28 = 42.14, P <0.0001	F1,28 = 70.42, P < 0.0001
<i>Rearing</i>	F1,28 = 53.08, P <0.0001	F1,28 = 24.81, P <0.0001	F1,28 = 8.806 P = 0.0061
24 horas			
Centro	F1,28 = 17:55, P < 0.0001	F1,28 = 74.95, P < 0.0001	F1,28 = 19:14, P < 0.0001
Periferia	F1, 28 = 227.2, P < 0.0001	F1,28 = 172.7, P < 0.0001	F1,28 = 120.0, P < 0.0001
Total	F1,28 = 152.3, P < 0.0001	F1,28 = 276.1, P < 0.0001	F1,28 = 147.9, P < 0.0001
<i>Rearing</i>	F1,28 = 43.79, P < 0.0001	F1,28 = 38.64, P < 0.0001	F1,28= 35.85, P < 0.0001

Tabela 8: Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com propiltiouracil (PTU) adicionado à água de beber (estado tireoidiano) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) no teste do nado forçado.

Parâmetros	Estado Tireoidiano	Desafio Imunológico	Interação
02 horas			
<i>Floating</i>	F1,36 = 129.3, P < 0.001	F1, 36 = 30.11, P < 0.001	F1,36 = 95.6, P < 0.001
<i>Swimming</i>	F1,36 = 102.8, P < 0.0001	F1,36 = 22.28, P < 0.0001	F1,36 = 61.88, P < 0.0001
<i>Climbing</i>	F1,36 = 51.66, P < 0.001	F1,36 = 15.95, P < 0.001	F1,36 = 77.18, P < 0.0001
06 horas			
<i>Floating</i>	F1,36 = 100.2, P < 0.0001	F1,36 = 133.2, P < 0.0001	F1,36 = 25.06, P < 0.0001
<i>Swimming</i>	F1,36 = 54.49, P < 0.0001	F1,36 = 88.89, P < 0.0001	F1,36 = 17.35, P < 0.001
<i>Climbing</i>	F1,36 = 242.9, P < 0.0001	F1,36 = 146.9, P < 0.0001	F1,36 = 20.28, P < 0.0001
24 horas			
<i>Floating</i>	F1,32 = 41.81, P < 0.0001	F1,32 = 213.3, P < 0.0001	F1,32 = 16.62, P < 0.001
<i>Swimming</i>	F1, 32 = 32.73, P < 0.0001	F1,32 = 193.1, P < 0.0001	F1,32 = 22.01, P < 0.0001
<i>Climbing</i>	F1,32 = 16.79, P < 0.001	F1,32 = 70.75, P < 0.0001	F1,32 = 5.64, P < 0.05

Tabela 9 - Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com propiltiouracil (PTU) adicionado à água de beber (estado tireoidiano) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) no teste de Interação Social.

Tempo de Investigação	Estado Tireoidiano	Desafio Imunológico	Interação
02 horas	F _{1,28} = 60.98, P < 0.0001	F _{1,28} = 0.059, P = 0.808	F _{1,28} = 14.53, P = 0.0007
06 horas	F _{1,28} = 162.6, P < 0.0001	F _{1,28} = 28.16 P < 0.0001	F _{1,28} = 0.036, P = 0.849
24 horas	F _{1,28} = 32.18, P < 0.0001	F _{1,28} = 63.85, P < 0.0001	F _{1,28} = 8.396, P = 0.0072

Tabela 10 - Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com propiltiouracil (PTU) adicionado à água de beber (estado tireoidiano) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) no teste de memória de reconhecimento de objetos.

Parâmetros	Estado		Desafio	Interação
	Tireoidiano			
Curta Duração				
TEA	$F_{1,28} = 61.64, P < 0.0001$		$F_{1,28} = 28.01, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 7.470, P = 0.0107$
TEC	$F_{1,28} = 397.4, P < 0.0001$		$F_{1,28} = 0.098, P = 0.755$	$F_{1,28} = 42.99, P < 0.0001$
TNE	$F_{1,28} = 383.6, P < 0.0001$		$F_{1,28} = 7.162, P = 0.0123$	$F_{1,28} = 59.67, P < 0.0001$
IR	$F_{1,28} = 17.92, P = 0.0002$		$F_{1,28} = 51.58, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 27.50, P < 0.0001$
Longa Duração				
TEA	$F_{1,28} = 21.94, P < 0.0001$		$F_{1,28} = 18.97, P = 0.0002$	$F_{1,28} = 9.244, P = 0.0051$
TED	$F_{1,28} = 14.38, P < 0.0001$		$F_{1,28} = 33.41, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 0.035, P < 0.8529$
TNE	$F_{1,28} = 24.66, P = 0.0007$		$F_{1,28} = 40.88, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 2.427, P < 0.1305$
IR	$F_{1,28} = 25.68, P < 0.0001$		$F_{1,28} = 5.677, P < 0.0242$	$F_{1,28} = 0.513, P = 0.4796$

Nota: TEA – Tempo de exploração do objeto A; TEC – Tempo de exploração do objeto C; TNE – Tempo de não-exploração; IR – Índice de Reconhecimento

Tabela 11 - Análises de variância de duas vias dos grupos controle e pré-tratados com propiltiouracil (PTU) adicionado à água de beber (estado tireoidiano) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (desafio imunológico) na expressão de c-Fos.

Área	Estado		Desafio	Interação
	Tireoidiano			
PVN	$F_{1,20} = 22.32, P = 0.0001$		$F_{1,20} = 80.49, P < 0.0001$	$F_{1,20} = 4.44, P = 0.047$
SON	$F_{1,17} = 25.20, P = 0.0001$		$F_{1,17} = 0.86, P < 0.366$	$F_{1,17} = 0.067, P = 0.798$
BST	$F_{1,15} = 40.44, P < 0.0001$		$F_{1,15} = 2.907, P = 0.108$	$F_{1,15} = 26.33, P = 0.0001$
mPOA	$F_{1,18} = 8.263, P = 0,01$		$F_{1,18} = 65.02, P = < 0.0001$	$F_{1,18} = 5.774, P = 0.0273$

ANEXO B – APROVAÇÃO CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 Alfenas/MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3295-1000 Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 06 de março de 2012.

Prof. Alexandre Giusti Paiva

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, registrado sob o nº **395/2012**, intitulado “Respostas cognitivo-comportamentais à endotoxemia por LPS e camundongos com hipertireoidismo por propiltiuracil” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e **aprovado** por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovani de Oliveira Nascimento
Presidente do CEUA – Unifal-MG

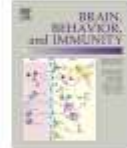
ANEXO C - ARTIGO

Brain, Behavior, and Immunity 45 (2015) 109–117



Contents lists available at ScienceDirect

Brain, Behavior, and Immunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybrbi

Sickness behavior is delayed in hypothyroid mice

Vanessa Cardoso Silva^{a,b}, Alexandre Giusti-Paiva^{a,c,*}^a Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFi), Brazil^b Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, Minas Gerais, Brazil^c Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 October 2014

Received in revised form 9 December 2014

Accepted 9 December 2014

Available online 15 December 2014

Keywords:

Hypothyroidism

Endotoxemia

Sickness behavior

Fever

Anorexia

ABSTRACT

Sickness behavior is an expression of a motivational state triggered by activation of the peripheral innate immune system, whereby an organism reprioritizes its functions to fight infection. The relationship between thyroid hormone and immune cells is complex, and additional insights are needed about the involvement of the cross-talk between thyroid hormone, the central nervous system and immune function, as demonstrated by the consequences to sickness behavior. The aim of this work was to evaluate sickness behavior in hypothyroid mice. Control mice and mice treated with propylthiouracil (PTU) for 30 days (0.05%; added to drinking water) received a single dose of LPS (200 µg/kg; i.p.) or saline, and the behavioral response was assessed for 24 h. We provide evidence that thyroid status acts a modulator for the development of depressive-like and exploratory behaviors in mice that are subjected to an immunological challenge because the PTU pretreatment delayed the LPS-induced behavioral changes observed in an open field test and in a forced swimming test. This response was observed concomitantly with a lower thermal index until 4 h after the LPS administration. This result demonstrates that thyroid status modifies behavioral responses to immune challenge and suggests that thyroid hormones are essential for the manifestation of sickness behavior during endotoxemia.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Thyroid hormones exert strong control over many functions involved in homeostasis and development. A proper thyroid status is crucial for various mechanisms, protein synthesis and the development of the central nervous system, as well as for regulating long-term energy consumption, storage and expenditure through different mechanisms (Gutiérrez-Mariscal et al., 2008; Warner and Beckett, 2010; Brix et al., 2011).

The neuroendocrine system and the immune system engage in complex cross-talk via hormones and immunomodulatory signaling molecules. Increasing evidence suggests that thyroid hormones, L-thyroxine (T4) and 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3), are modulators of the immune response (Warner and Beckett, 2010). In monocytes, macrophages, leukocytes, natural killer cells, and lymphocytes, a wide range of immune functions, such as chemotaxis, phagocytosis, the generation of reactive oxygen species (ROS), and cytokine synthesis and release, are altered under hypo- and hyperthyroid conditions (Warner and Beckett, 2010; De Vito

et al., 2011). However, systemic inflammation, such as during injury, or starvation, leads to the downregulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone (TRH); lowered secretion of thyroid-stimulating hormone (TSH), free T4, and free T3; decreased levels of circulating free T3 due to decreased peripheral conversion of T4 to T3; and increased conversion of biologically active T3 to inactive reverse T3. All mechanisms lead to the inhibition of the hypothalamic-pituitary-thyroid gland axis (HPT) (Göthe et al., 1999; De Vito et al., 2011; Fonseca et al., 2013).

Thyroid hormones exert their regulation of the HPT axis by a feedback mechanism, and its reduction is associated with reduced TSH, leading to hypothyroidism. Hypothyroidism is characterized by a set of factors that reduce metabolism, including weight gain over long periods of time, fatigue, weakness, cold intolerance and mental slowness. The reduced basal metabolism in hypothyroidism produces central and peripheral effects on feeding behavior, thermogenesis, locomotor activation and autonomic regulation (López et al., 2013). Thyroid hormones influence specific immune responses, as well as several aspects of innate and adaptive immunity. The relationship between thyroid hormone and immune cells is complex, and additional insights are needed about the cross-talk between thyroid hormone and immune function. During acute systemic infectious disease, the precisely regulated release of energy-rich substrates (glucose, free fatty acids, and amino acids)

* Corresponding author at: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas, 37130-000 MG, Brazil. Tel.: +55 (35) 3299 1303.

E-mail address: agiustipaiva@gmail.com (A. Giusti-Paiva).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2014.12.014>

0889-1591/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

and auxiliary elements, such as calcium/phosphorus from storage sites (fat tissue, muscle, liver, and bone) (Straub, 2014), are highly important because these factors are needed by the energy-consuming immune system in a situation with little or no food/water intake (sickness behavior) (Dantzer et al., 2007; Straub, 2014).

Sickness behaviors constitute an array of symptoms exhibited by animals during the course of an acute infection, including reduced activity, reduced food and water intake, and reduced social interactions (Straub, 2014). It is assumed that these symptoms enable the reallocation of finite energy resources to fighting infection.

In the present study, our aim was to explore the link between hypothyroidism and endotoxin-induced sickness behavior. To this end, the thyroid status was disrupted in mice using the antithyroid molecule propylthiouracil (PTU), and we explored the effects on behavior and thermoregulation during an immunological challenge.

2. Material and methods

2.1. Animals

Adult male Swiss mice (35–40 g) were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Alfenas. The animals were housed under controlled light (12:12 h light–dark cycle; lights on at 07:00 a.m.) and temperature conditions (23 ± 1 °C) with ad libitum access to water and food. The animals were allowed to habituate to the housing facilities for at least 1 week before the experiments began. Behavioral studies were performed in a quiet room between 08:00 a.m. and 12:00 p.m. to minimize circadian variation. All experiments were conducted with the approval of the Ethics Committee of the Federal University of Alfenas and in accordance with their guidelines (protocol 435/2012). To induce the hypothyroidism condition in the experimental groups, we administered 0.05% 6-propyl-2-thiouracil (PTU), which was diluted in the drinking water, for a period of 30 days, according to previous reports (Gordon, 1997). Control groups received filtered water. Lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* serotype 026:B6 and 6-propyl-2-thiouracil were purchased from Sigma–Aldrich (USA).

2.2. Biometrical parameters

After the 30th day of the addition of PTU to the drinking water, the animals were weighed to determine the weight gain and were sacrificed by isoflurane inhalation. The naso-anal length was assessed by measuring the length from the snout to the beginning of the tail (cm) and by calculating the Lee index (Roggers and Webb, 1980). The perigonadal and retroperitoneal fat and the thyroid and parathyroid glands were excised and weighed.

2.3. Blood samples and hormonal measurements

After the 30th day of addition of PTU to the drinking water, another set of mice were decapitated, and blood samples were collected from the control ($n = 7$) and PTU groups ($n = 8$) and placed in tubes. The blood samples were centrifuged (3000 rpm for 20 min), and the sera were separated and stored at -20 °C. Serum T3 and T4 levels were determined using specific Coated-Tube Radioimmunoassay (RIA) kits (MP Biomedicals, LLC, USA). The procedures were performed according to the recommendations of the kits. The sensitivity was 4.3 ng/dl for T3 and 0.4 µg/dl for T4. The inter- and intra-assay coefficient of variation values varied from 4.2% to

6.0% and from 5% to 6.5% for T3 and 7.1% to 7.4% and from 2.9% to 5.1% respectively for T4.

2.4. Behavioral experimental procedures

In the animal room, the mice were pretreated with or without PTU in the water for 30 days before injections of lipopolysaccharide (LPS) serotype 026:B6 (200 µg/kg; i.p.) or sterile isotonic saline (0.9% NaCl). The behavioral tests were performed 2, 6 or 24 h after the LPS treatment. These time points were chosen on the basis of previous behavioral, endocrine and neurochemical studies (Yang and Gordon, 1997; Dunn and Swiergiel, 2005; de Paiva et al., 2010). The behavioral sections were video-recorded and analyzed by an experimenter blind to the testing condition.

2.4.1. Open field test (OFT)

Locomotor activity was quantified for 5 min in an open field, which was a cylindrical box with a floor that was divided into 12 squares. Furthermore, for tests that were longer than 5 min, the mice became habituated to the apparatus, thereby decreasing the differences between groups. Four squares were defined as the center, and the eight squares along the walls were considered the periphery. Each mouse ($n = 10$ per group) was gently placed exactly in the center of the box, and the activity was considered a line crossing when a mouse removed all four paws from one square and entered another, and rearing (frequency with which the mice stood on their hind legs in the apparatus). Line crossings among the central four squares of the open field were counted separately from line crossings among the peripheral squares (Dunn and Swiergiel, 2005; de Paiva et al., 2010).

2.4.2. Forced swimming test (FST)

This test was performed according to the method developed by Porsolt et al. (1977) for mice. Mice ($n = 12$ per group) were placed in a vertical glass cylinder (26 cm in high, 12 cm in diameter) filled with 25 °C water to a depth of 16 cm. The water depth was chosen so that the animals must swim or float without their hind limbs or tail touching the bottom. For testing, each mouse was placed in the cylinder for 6 min, and the immobility (floating), swimming and climbing were assessed every 5 s. As suggested by Porsolt, only the data scored during the last 4 min were analyzed and presented.

2.5. Food intake and weight gain

Animals ($n = 10$ per group) were fasted for 12 h before receiving injections. The fasted animals exhibited increased food consumption during the first few hours after the refeeding compared with the animals fed ad libitum. Immediately after the injections, a fresh supply of pre-weighed food was provided. Food intake was calculated 2, 4, 6, 8, 12 and 24 h after the injection by measuring the difference between the pre-weighed standard chow available and the weight of chow and spilled crumbs (de Paiva et al., 2010).

2.6. Body temperature

One week prior to the immunological challenge, another set of animals were subjected to a surgical procedure for the implantation of a temperature transmitter in the peritoneal cavity. These procedures were performed under ketamine–xylazine (42.0 and 4.8 mg/kg, respectively, i.p.) anesthesia and antibiotic (penicillinic, 3.75 mg/kg im) protection. For implantation of a miniature (25 mm) temperature transmitter (series 4000 E-Mitter; Mini Mitter, Bend, OR), a midline laparotomy was performed, the probe was inserted in the peritoneal cavity, and the surgical wound was sutured. After surgery, the animals were kept in individual cages under the same conditions as mentioned above. One week after

surgery, the cages were placed on a telemetry receiver (model ER-3000; Mini-Mitter) connected to a PC, and the body temperature was recorded at 10-min intervals during the experiments. Data were collected using Vital View software (Mini-Mitter). Thermal indexes (TI, Celsius \times minutes) were used to improve the data analysis and were calculated as the area under the curve of the body temperature measurements, as previously described (Giusti-Paiva et al., 2003).

2.7. Statistical analysis

Data were analyzed using the GraphPad software program version 5.0 and were expressed as the mean \pm S.E.M. The biometric and hormonal parameters were compared using the *T* test. In other experiments, we analyzed the effect of thyroid status (pretreatment with or without PTU in water) and immunological challenge (treatment with saline or LPS) factors upon behavior, temperature, and food intake using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey post-tests. A *p*-value of less than 0.05 ($p < 0.05$) was used to establish significance.

3. Results

3.1. Biometric and hormonal measures

The mice pretreated with PTU showed a higher Lee index ($p < 0.01$), lower naso-anal length ($p < 0.0001$) and lower weight gain ($p < 0.001$) than the control group. The epididymal ($p < 0.01$) and retroperitoneal ($p < 0.05$) fat were lower in the PTU group, whereas the weight of the thyroid gland increased ($p < 0.001$). The serum levels of thyroid hormones were lower in the PTU group (T3; $p < 0.01$ and T4; $p < 0.001$) than in the control group (Table 1).

3.2. Open field test

The mice pretreated with water (control group) had reduced numbers of central, peripheral and total line crossings and a reduction in the number of rearings 2 h after LPS administration compared with the corresponding values for the saline-treated mice (Fig. 1A). No effect of LPS was observed in the open field test 2 h after administration in mice pretreated with PTU (Fig. 1A; Statistical data: Supplementary material, Table 1). Similarly, 6 h after the LPS administration (Fig. 1B), there was a reduction in the number of central, peripheral and total crossings, as well as the number of rearings, in the control group. In the mice pretreated with PTU, the central and total entries and the number of rearings after

LPS administration were lower than those in the mice treated with saline, but this response was attenuated compared with those in the mice pretreated with water and the mice treated with LPS.

However, 24 h after the administration of saline or LPS (Fig. 1C), the control group treated with LPS no showed difference compared with the group that received saline, but the PTU-treated group showed an accentuated decrease in all evaluated parameters in the open field test after the LPS administration compared with those for the saline group (Fig. 1C).

3.3. Forced swimming test (FST)

Fig. 2 shows the effect of LPS at different time points in hypothyroid and euthyroid animals on FST. In addition, the pretreatment with PTU induced an increase in floating and a reduction in swimming and climbing events compared with the corresponding activities in the control group, and this observation was similar 2, 6 and 24 h after the saline injection (Fig. 2A–C respectively; Statistical data: Supplementary material, Table 2). The LPS administration promoted an increase in floating and a reduction in swimming and climbing events in euthyroid animals at 2 and 6 h (Fig. 2A and B, respectively); however, this parameter returned to the basal level at 24 h (Fig. 2C). Furthermore, 2 h after the LPS administration in hypothyroid animals, no effect was observed compared with its control (saline; Fig. 2A), but after 6 and 24 h, LPS promoted an increase in floating and a reduction in swimming and climbing events (Fig. 2B and C).

3.4. Food intake and weight gain

The food consumption for 24 h after the application of saline or LPS is shown in Fig. 3A. The LPS treatment decreased the food intake in both of the groups pretreated with water or PTU compared with the saline-treated group. At 24 h after the LPS or saline treatment, the PTU pretreatment induced an accentuated hypophagic effect in the LPS-treated animals compared with the control group (immunological challenge factor: $F_{1,34} = 203.4$, $p < 0.001$; thyroid status factor: $F_{1,34} = 4.66$, $p = 0.038$; interaction: $F_{1,34} = 15.94$, $p < 0.001$). Furthermore, the animals that received LPS showed weight loss compared with the weight in the saline group, both for the animals pretreated with PTU and the water group (immunological challenge factor: $F_{1,34} = 32.41$, $p < 0.001$; thyroid status factor: $F_{1,34} = 1.17$, $p > 0.05$; interaction: $F_{1,34} = 0.06$, $p = 0.810$; Fig. 3B).

3.5. Body temperature

The administration of LPS induced an increase in body temperature (fever; Fig. 4A and B). The thermal index (area under curve) from 1 to 4 h after LPS or saline administration (T.I. 1; Fig. 4C) increased, showing the increment in the body temperature, in both the water and PTU pretreatment groups; however, the change was more accentuated in the control animals (immunological challenge factor: $F_{1,25} = 44.35$, $p < 0.001$; thyroid status factor: $F_{1,25} = 6.28$, $p < 0.05$; interaction: $F_{1,25} = 13.3$, $p < 0.01$). The thermal index from 4 to 7 h after LPS or saline administration (T.I. 2; Fig. 4D) suggests a similar LPS-induced increase in body temperature, independent of thyroid status (immunological challenge factor: $F_{1,25} = 78.41$, $p < 0.001$; thyroid status factor: $F_{1,25} = 1.01$, $p > 0.05$; interaction: $F_{1,25} = 1.2$, $p > 0.05$). These data show that the febrile response to LPS is delayed in the group pretreated with PTU compared with that in the control group; however, once fever state is established, the fever has the same magnitude in both the control and hypothyroid animals. The animals pretreated with PTU (36.15 ± 0.06) presented a lower basal temperature than the control group (36.59 ± 0.04 ; $p < 0.001$).

Table 1
Biometric and hormonal parameters in control mice and treated with propylthiouracil (PTU) for 30 days.

	Control	PTU
Lee index	3.01 \pm 0.02	3.09 \pm 0.02 ^{***}
Naso-anal length (cm)	11.63 \pm 0.12	10.97 \pm 0.09 ^{***}
Initial body weight (g)	36.67 \pm 0.49	36.49 \pm 0.62
Final body weight (g)	48.34 \pm 0.56	42.79 \pm 0.70 ^{***}
Body weight gain (g)	11.82 \pm 1.04	6.67 \pm 0.71 ^{***}
Epididymal adipose (g/10 g)	0.21 \pm 0.01	0.29 \pm 0.02 ^{***}
Retroperitoneal adipose (g/10 g)	0.07 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01 ^{***}
T3 serum (ng/dl)	55.65 \pm 2.07	45.39 \pm 1.53 ^{***}
T4 serum (μ g/dl)	3.93 \pm 0.46	1.43 \pm 0.06 ^{***}
Glandular weight (mg)	4.17 \pm 0.15	10.78 \pm 0.29 ^{***}

Data are presented as mean values \pm S.E.M.

^{*} $p < 0.05$ compared with the Control group.

^{**} $p < 0.01$ compared with the Control group.

^{***} $p < 0.001$ compared with the Control group.

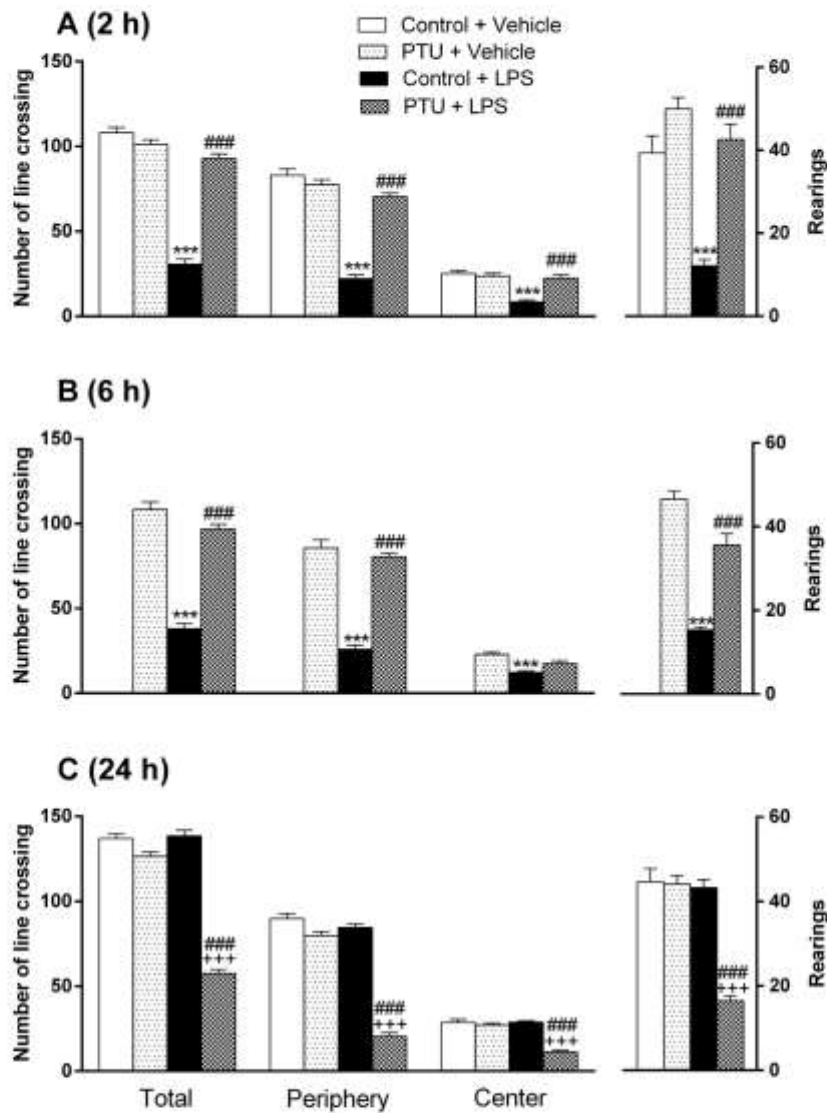


Fig. 1. Effects of pretreatment with 0.05% propylthiouracil (PTU), which was added to the drinking water, on the open field test results, which were evaluated 2 (A), 6 (B) and 24 h (C) after the administration of either lipopolysaccharide (LPS) or saline. Each column represents the mean with the S.E.M. The symbols denote the significance levels: *** $p < 0.001$ compared with the Control + Vehicle groups; ### $p < 0.001$ compared with the PTU + Vehicle group; ### $p < 0.001$ compared with the Control + LPS group.

4. Discussion

The present study shows a delay in the depressive-like, exploratory behavior and febrile response, accompanied by an accentuated hypophagic response induced by endotoxin in hypothyroid animals.

LPS can induce depressive-like behavior and a reduction in exploratory behavior in mice, as evidenced by depressed locomotor activity in the open field test and reduced swimming and

climbing, as well as an increase in immobility events, in FST. This effect was accentuated 2 h after LPS, and the amplitude of the effect decreased 6 h after the treatment in the control animals. This behavioral response depends on the thyroid status: in hypothyroid animals, the start of the behavioral response in OFT and FST was delayed. However, the behavioral response in these animals was accentuated 24 h after the immunological challenge, whereas euthyroid mice exhibited complete remission of this effect. Experimental hypothyroidism causes depressive-like behavior.

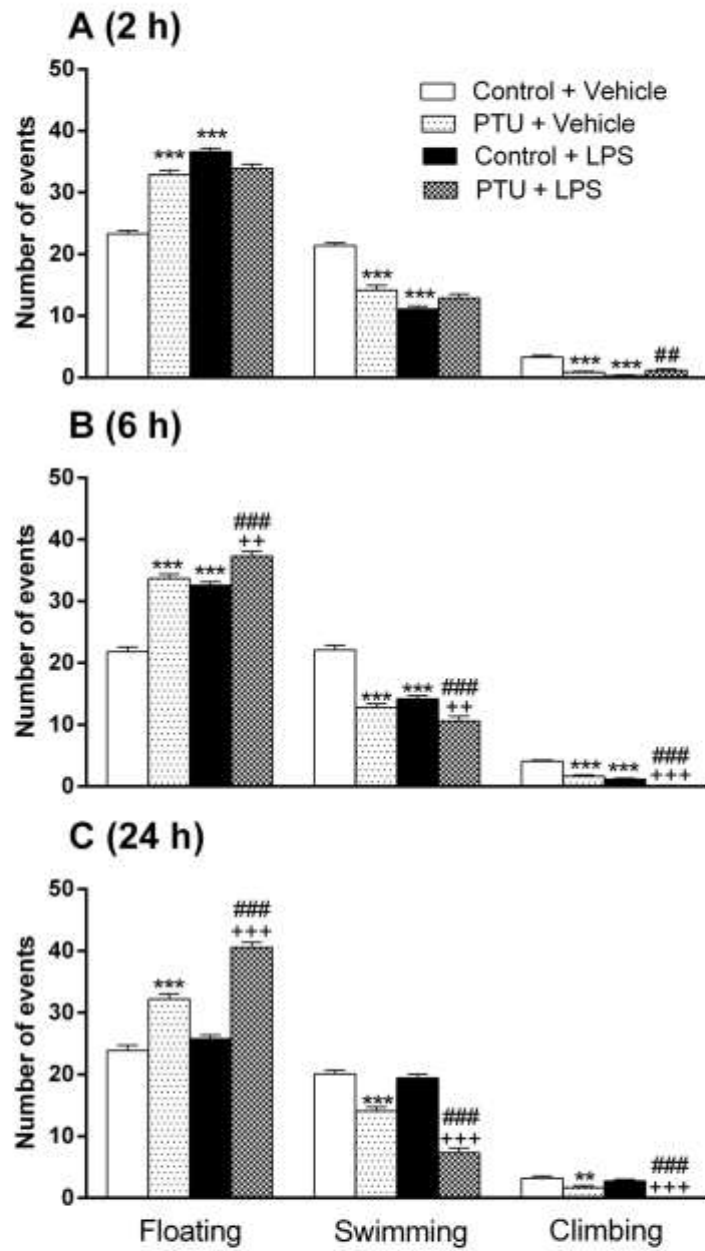


Fig. 2. Effects of pretreatment with 0.05% propylthiouracil (PTU), which was added to the drinking water, on the forced swimming test results, which were evaluated 2 (A), 6 (B) and 24 h (C) after the administration of either lipopolysaccharide (LPS) or saline. Each column represents the mean with the S.E.M. The symbols denote the significance levels: ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with the Control + Vehicle groups; † $p < 0.01$ and †† $p < 0.001$ compared with the PTU + Vehicle group; * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ compared with the Control + LPS group.

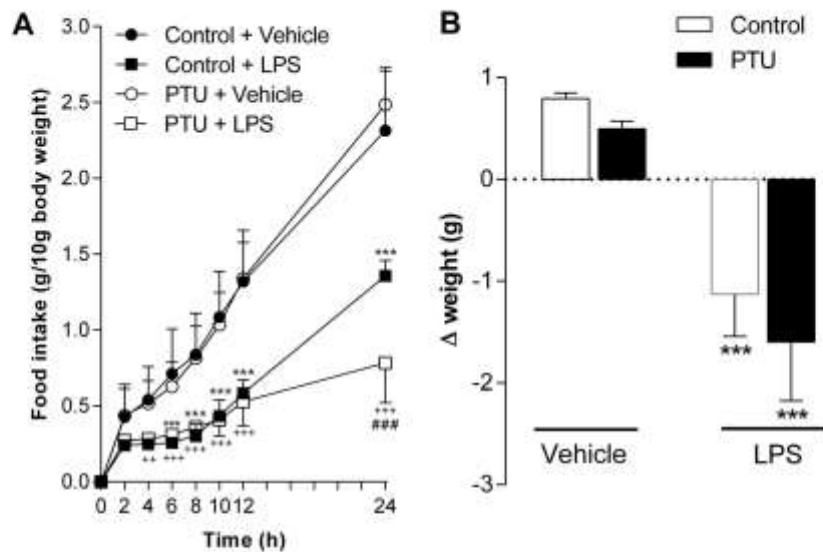


Fig. 3. Effects of pretreatment with 0.05% propylthiouracil (PTU), which was added to the drinking water, on the food intake (A) and body weight change (B), which were evaluated 24 h after the administration of either lipopolysaccharide (LPS) or saline. Each column represents the mean with the S.E.M. The symbols denote the significance levels: *** $p < 0.001$ compared with the Control + Vehicle groups; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with the PTU + Vehicle group; **** $p < 0.001$ compared with the Control + LPS group.

Kulikov and colleagues [1997] have demonstrated that the severe hypothyroidism induced by thyroidectomy or the mild hypothyroidism caused by an iodine-free diet is able to increase the immobility time of animals in the forced swimming paradigm. Similarly, our data confirm these results and also show that the hypothyroidism triggered by PTU administration may be considered a consistent model for studying this neurological disorder. In addition, the present study confirms previous observations about the model of hypothyroidism by evaluating the effect of PTU treatments on biometric parameters, thyroid hormone levels and glandular hypertrophy (Yang and Gordon, 1997; Zeng et al., 2007; Ueta et al., 2011; Jena et al., 2012; Johnstone et al., 2013).

At the behavioral level, sickness behavior is a motivational state that reprioritizes the functions of an organism to cope with infectious pathogens (Dantzer, 2009; Lawson et al., 2013; Pitychoutis et al., 2009). Peripheral administration of LPS activates the immune system, resulting in the release of pro-inflammatory cytokines and prostaglandins (Dantzer, 2009; Loftis et al., 2010). These peripherally produced cytokines gain access to the brain and produce the classical symptoms of sickness behavior, including a reduction in locomotor activity and exploratory behaviors and anorexia. Although some studies attribute the increased immobility in the FST during endotoxemia to a reduction of locomotor activity (Straub, 2014), others claim that this symptom results from the presence of depressive symptoms, which are caused by the inescapable situation imposed by the test that produces depressive-like behavior (Godbout et al., 2008; Dantzer, 2009; Castagné et al., 2010). These findings provide evidence that thyroid status acts as modulator for the development of depressive-like and exploratory behaviors in mice because PTU pretreatment delayed the LPS-induced behavioral changes relative to euthyroid animals. An insufficiency of thyroid hormones is often associated with depressive-like behaviors; thus, increased immobility in animals

could be expected for hypothyroidism (Montero-Pedrazuela et al., 2006; Zeng et al., 2007; Pilhatsch et al., 2010; Dana et al., 2011; Ge et al., 2012).

Previous studies involving mice with different thyroid states or mutation of the TRH receptor have shown no influence on spontaneous movement (Sala-Roca et al., 2002; Wilcoxon et al., 2007; Klieverik et al., 2009). Although hypothyroidism is associated with a reduction in basal metabolism and energy expenditure (Kim, 2008), the effect on motor activity should only occur in situations in which the muscle strength and cardiovascular system are compromised by the prolonged absence of thyroid hormones (Pilhatsch et al., 2010) or when other factors are associated with the hypothyroidism condition (Dana et al., 2011). Olivares et al. (2012) found a decrease in locomotor activity in rats with reduced levels of thyroid hormones; however, this reduction was mediated by chronic stress in the paradigm of social defeat. Another study reported impaired locomotor activity associated with increased anxiety in the OFT during conditions of insufficient thyroid hormones (Wilcoxon et al., 2007); however, the impaired locomotor activity that was attributed to hypothyroidism had been experienced in the perinatal phase, which may have compromised the neuromotor development of the animals, leading to decreased neurogenesis with a consequent behavioral inhibition. Thus, we suggest that the reduction of hormones *per se*, in the absence of other factors, does not cause the impairment of voluntary motor activity observed in the OFT.

These results suggest that there appears to be a delay in the behavioral responses to endotoxemia in the hypothyroidism condition. Moreover, the activity of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis is essential for energy homeostasis and is modulated by physical or emotional stress (Gutiérrez-Mariscal et al., 2012). Because thyroid hormones regulate the production and release of various enzymes and the speed of metabolic reactions, a reduction in the

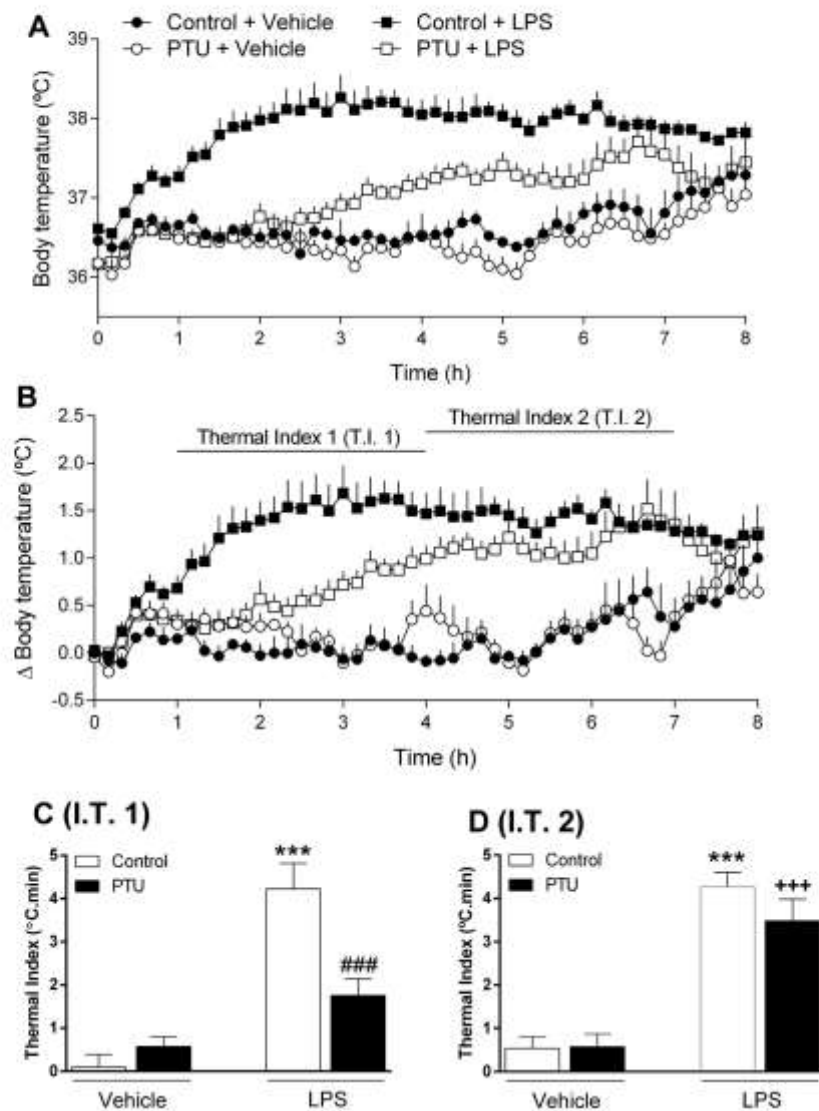


Fig. 4. Time course of the effects of the pretreatment with 0.05% propylthiouracil (PTU), which was added to the drinking water on the body temperature (A), change in body temperature (B) and thermal index (C and D) evaluated after the administration of either lipopolysaccharide (LPS) or saline. Each point or column represents the mean with the S.E.M. The symbols denote the significance levels: *** $p < 0.001$ compared with the Control + Vehicle groups; *** $p < 0.001$ compared with the PTU + Vehicle group; ### $p < 0.001$ compared with the Control + LPS group.

levels of the biologically active hormone (triiodothyronine; T3) could be implicated in the impaired capacity to respond to an immune challenge in the hypothyroidism condition (Biesmans et al., 2013).

The hypothyroidism-induced delay in the physiological and behavioral response to an immunological challenge is demonstrated by the fact that the pretreatment with PTU changes the onset of the febrile response of these animals. The development

of the febrile response to lipopolysaccharide in the hypothyroid model has not been studied. A previous study reported that the reduction in the febrile response of thyroid-deficient rabbits is due to the reduced number of β -adrenergic receptors or to a change in the availability of the neurotransmitter in thermogenically active tissues, such as brown fat (Macari et al., 1987).

In fact, thyroid hormones actively participate in the processes that produce and conserve heat and increase the metabolic effects

of catecholamines in the mechanisms of thermoregulation (Little et al., 2013; Warner et al., 2013; Straub, 2014). In addition, LPS-activated hypothalamic TRH neurons could represent one of the non-thermal hormonal mediators that modulates thermoregulatory circuits and alters the setpoint (Keil et al., 1994). Although the mechanisms that modulate the setpoint in hypothyroid animals are not known, we demonstrate that the febrile response was delayed, corroborating the delay in the manifestation of sickness behavior in the hypothyroid condition. One of the possible causes for this finding would be the low capacity for cytokine production that occurs when the levels of peripheral thyroid hormones decrease (Rozing et al., 2012). Earlier studies have demonstrated higher circulating levels of pro-inflammatory cytokines in patients with hyperthyroidism (Lakatos et al., 1997). Moreover, hyperthyroidism treatment was associated with an increasing of serum pro-inflammatory cytokines levels (Siddiqi et al., 1988). The systemic administration of LPS or recombinant pro-inflammatory cytokines, such as IL-1, to healthy laboratory animals or human volunteers triggers an entire set of responses that are characteristic of the acute phase reaction; this response includes a central component in the form of fever, activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and the behavioral symptoms of sickness. The communication between the nervous, immune and endocrine systems, constituting a psychoneuroimmunendocrine system, is the basis of the maintenance of homeostasis and therefore health. Each of these homeostatic systems is complex, and the interactions between these systems show even greater complexity. In conclusion, this result demonstrates that thyroid status modifies the psychoneuroimmunendocrine response to an immune challenge and suggests that thyroid hormones are essential for thermoregulation and the manifestation of sickness behavior during endotoxemia.

Conflict of interest

All authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Michele Porto Marassi from the Federal University Rural of Rio de Janeiro for assistance with the hormonal measurements, and we also acknowledge the financial support from CAPES and FAPEMIG.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2014.12.014>.

References

- Biesmans, S., Meert, T.F., Bouwknrecht, J.A., Acton, P.D., Davoodi, N., De Haes, P., Kuijlaars, J., Langlois, X., Matthews, L.J., Ver Donck, L., Hellings, N., Nuydens, R., 2013. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm.* 2013, 271350.
- Bris, K., Führer, D., Bielermann, H., 2011. Molecules important for thyroid hormone synthesis and action – known facts and future perspectives. *Thyroid Res.* 4 (Suppl. 1), 59.
- Castagné, V., Moser, P., Roux, S., Försvoll, R.D., 2010. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr. Protoc. Pharmacol.* (Chapter 5, Unit 5.8).
- Dana, L., Helmreich, D.L., Tylee, D., 2011. Thyroid hormone regulation by stress and behavioral differences in adult male rats. *Horm. Behav.* 60, 284–291.
- Dantzer, R., Kelley, K.W., 2007. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav. Immun.* 21, 153–160.
- Dantzer, R., 2009. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 29, 247–264.
- de Paiva, V.N., Lima, S.N., Fernandes, M.M., Sorriol, R., Andrade, C.A., Guisti-Paiva, A., 2010. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. *Behav. Brain Res.* 215, 146–151.
- De Vito, P., Incirpi, S., Pedersen, J.Z., Luty, P., Davis, F.B., Davis, P.J., 2011. Thyroid hormones as modulators of immune activities at the cellular level. *Thyroid* 21, 879–890.
- Dunn, A.J., Swiergiel, A.H., 2005. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 688–693.
- Fonseca, T.L., Correa-Medina, M., Campos, M.P., Wittmann, G., Wernick-de-Castro, J.P., Arraigo-Drigo, R., Maza-Garzon, M., Uetz, C.B., Galecki, A., Fekete, C., Gereben, R., Lechan, R.M., Bianco, A.C., 2013. Coordination of hypothalamic and pituitary T3 production regulates TSH expression. *J. Clin. Invest.* 123, 1492–1500.
- Ge, J.F., Peng, L., Hu, C.M., Wu, T.N., 2012. Impaired learning and memory performance in a subclinical hypothyroidism rat model induced by hemi-thyroid electrocauterization. *J. Neuroendocrinol.* 24, 953–961.
- Guisti-Paiva, A., Branco, L.G., de Castro, M., Amunes-Rodrigues, J., Carnio, E.C., 2001. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. *Physiol. Arch.* 447, 175–180.
- Godbout, J.P., Moreau, M., LeStage, J., Chen, J., Sparkman, N.L., O'Connor, J., Castanon, N., Kelley, K.W., Dantzer, R., Johnson, R.W., 2008. Aging exacerbates depressive-like behavior in mice in response to activation of the peripheral innate immune system. *Neuropsychopharmacology* 33, 2341–2351.
- Gordon, C.J., 1997. Behavioral and autonomic thermoregulation in the rat following propylthiouracil-induced hypothyroidism. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58, 231–236.
- Gohe, S., Wang, Z., Ng, L., Kindblom, J.M., Barroo, A.C., Ohlsson, C., Vennström, B., Forrest, D., 1999. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary–thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev.* 13, 1329–1341.
- Guñeire-Marmal, M., de Gortari, P., López-Robalcava, C., Martínez, A., Joseph-Bravo, P., 2008. Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdala TRHergic neurons in anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 33, 198–213.
- Guñeire-Marmal, M., Sánchez, E., García-Vázquez, A., Rebollo-Soltero, D., Charri, J., Joseph-Bravo, P., 2012. Acute response of hypothalamic thyrotropin releasing hormone neurons and thyrotropin release in behavioral paradigms producing varying intensities of stress and physical activity. *Regul. Pept.* 179, 61–70.
- Jena, S., Anand, C., Chaitny, G.B., Dandapat, J., 2012. Induction of oxidative stress and inhibition of superoxide dismutase expression in rat cerebral cortex and cerebellum by PTU-induced hypothyroidism and its reversal by curcumin. *Neuro. Sci.* 33, 869–873.
- Johnstone, A.F., Gilbert, M.E., Aydin, C., Grace, C.E., Hasegawa, M., Gordon, C.J., 2013. Thermoregulatory deficits in adult Long Evans rat exposed perinatally to the antithyroid drug, propylthiouracil. *Neurotoxicol. Teratol.* 39, 1–6.
- Keil, R., Biedel, W., Simon, E., 1994. Thyroid status modulates hypothalamic thermosensitivity, vasopressin and corticosteroid secretion in rabbits. *Adv. Pharmacol. Sci.* 321–326.
- Kiss, B., 2008. Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. *Thyroid* 18, 141–144.
- Klietherik, L.P., Coomans, C.P., Enderl, E., Sauerwein, H.P., Havelkes, L.M., Vushol, P.J., Rensen, P.C., Romijn, J.A., Kalsbeek, A., Fliers, E., 2009. Thyroid hormone effects on whole-body energy homeostasis and tissue-specific fatty acid uptake in vivo. *Endocrinology* 150, 5639–5648.
- Kulikov, A., Turrisanti, J., Jeannings, R., 1997. Experimental hypothyroidism increases immobility in rats in the forced swim paradigm. *Neurosci. Lett.* 234, 111–114.
- Lakatos, P., Folties, J., Horvath, C., Kiss, L., Tatrai, A., Takacs, L., Srem, P.H., 1997. Serum interleukin-6 and bone metabolism in patients with thyroid function disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 78–81.
- Lawson, M.A., McCusker, R.H., Kelley, K.W., 2013. Interleukin-1 beta converting enzyme is necessary for development of depression-like behavior following intracerebroventricular administration of lipopolysaccharide to mice. *J. Neuroinflamm.* 10, 54.
- Little, A.G., Kunisue, T., Kannan, K., Seebacher, F., 2013. Thyroid hormone actions are temperature-specific and regulate thermal acclimation in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Biol.* 11, 26.
- Lofris, J.M., Huckans, M., Morasco, B.J., 2010. Neuroimmune mechanisms of cytokine-induced depression: current theories and novel treatment strategies. *Neurobiol. Dis.* 37, 510–533.
- López, M., Alvarez, C.V., Nogueiras, R., Diéguez, C., 2013. Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends Mol. Med.* 19, 418–427.
- Macari, M., Petá, L.R., Silva, C.A., 1987. The development of a febrile response to pyrogens in the thyroid-deficient rabbit. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65, 1325–1328.
- Montano-Pedraza, A., Venero, C., Lavado-Auniz, R., Fernández-Lamo, I., García-Verdugo, J.M., Bernal, J., Guadalupe-Ferraz, A., 2006. Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior. *Mol. Psychiatry* 11, 361–371.
- Olivares, E.L., Silva-Almeida, C., Pestana, F.M., Sotoca-Córtes, R., Araújo, L.G., Rodrigues, N.C., Mecawi, A.S., Cortes, W.S., Marassi, M.P., Reis, L.C., Rocha, F.F., 2012. Social stress-induced hypothyroidism is attenuated by antidepressant treatment in rats. *Neuropharmacology* 62, 446–456.
- Pilhatsch, M., Winter, C., Nordström, K., Vennström, B., Bauer, M., Juckel, G., 2010. Increased depressive behaviour in mice harboring the mutant thyroid hormone receptor alpha 1. *Behav. Brain Res.* 214, 187–192.

- Plychouris, P.M., Nakamura, K., Tsonis, P.A., Papadopoulos-Dailiti, Z., 2009. Neurochemical and behavioral alterations in an inflammatory model of depression: sex differences exposed. *Neuroscience* 159, 1216–1232.
- Pomolt, R.D., Bertin, A., Jalife, M., 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 229, 327–338.
- Roggers, P., Webb, G.P., 1980. Estimation of body fat in normal and obese mice. *Br. J. Nutr.* 43, 83–86.
- Rozing, M.P., Westendorp, R.G., Mair, A.B., Wijman, C.A., Frölich, M., de Craen, A.J., van Heemst, D., 2012. Serum triiodothyronine levels and inflammatory cytokine production capacity. *Agr. (Dordr.)* 34, 195–201.
- Sala-Roca, J., Martí-Carbonell, M.A., Garcia, A., Darbra, S., Balada, F., 2002. Effects of chronic dysthyroidism on activity and exploration. *Physiol. Behav.* 77, 125–133.
- Siddiqi, A., Burnin, J.M., Wood, D.F., Munson, J.P., 1988. Triiodothyronine regulates the production of interleukin-6 and interleukin-8 in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells. *J. Endocrinol.* 157, 453–461.
- Straub, R.H., 2014. Interaction of the endocrine system with inflammation: a function of energy and volume regulation. *Arthritis Res. Ther.* 16, 203.
- Ueta, C.B., Oliveira, E.L., Bianco, A.C., 2011. Responsiveness to thyroid hormone and to ambient temperature underlies differences between brown adipose tissue and skeletal muscle thermogenesis in a mouse model of diet-induced obesity. *Endocrinology* 152, 3571–3581.
- Warner, A., Rahman, A., Solsjö, P., Gottschling, K., Davis, B., Vennström, B., Arner, A., Miita, J., 2013. Inappropriate heat dissipation ignites brown fat thermogenesis in mice with a mutant thyroid hormone receptor $\alpha 1$. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 16241–16246.
- Wameet, M.H., Beckett, G.J., 2010. Mechanisms behind the non-thyroidal illness syndrome: an update. *J. Endocrinol.* 205, 1–13.
- Wilcoxon, J.S., Nadolski, G.J., Samarut, J., Chassande, O., Redei, E.E., 2007. Behavioral inhibition and impaired spatial learning and memory in hypothyroid mice lacking thyroid hormone receptor α . *Behav. Brain Res.* 177, 105–116.
- Yang, Y., Gordon, C.J., 1997. Regulated hypothermia in the hypothyroid rat induced by administration of propylthiouracil. *Am. J. Physiol.* 272, R1390–R1395.
- Zeng, H., Schimpf, B.A., Rohde, A.D., Pavlova, M.N., Gravenov, A., Bergmann, J.E., 2007. Thyrotropin-releasing hormone receptor 1-deficient mice display increased depression and anxiety-like behavior. *Mol. Endocrinol.* 21, 2795–2804.

Supplementar Data

Table 1: Two-way analysis of variance of groups pretreatment with 0.05% propylthiouracil (PTU), which was added to the drinking water (thyroid status factor) and submitted to injection of vehicle or LPS (immunological challenge factor) on the open field test.

	Immunological challenge factor	Thyroid status factor	Interaction
Open Field Test (parameters)			
		Time = 2 hours	
Center	$F_{1,32} = 2.818, P = 0.1030$	$F_{1,32} = 1.391, P = 0.2469$	$F_{1,32} = 2.075, P = 0.1594$
Periphery	$F_{1,32} = 17.99, P = 0.0002$	$F_{1,32} = 7.145, P = 0.0117$	$F_{1,32} = 16.11, P = 0.0021$
Total	$F_{1,32} = 26.38, P < 0.0001$	$F_{1,32} = 10.98, P = 0.0023$	$F_{1,32} = 16.93, P = 0.0003$
Rearing	$F_{1,32} = 3.669, P = 0.0644$	$F_{1,32} = 5.175, P = 0.0297$	$F_{1,32} = 1.210, P = 0.2796$
		Time = 6 hours	
Center	$F_{1,28} = 49.34, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 0.028, P = 0.8668$	$F_{1,28} = 11.47, P = 0.0021$
Peripheral	$F_{1,28} = 71.20, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 41.86, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 51.23, P < 0.0001$
Total	$F_{1,28} = 128.1, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 42.14, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 70.42, P < 0.0001$
Rearing	$F_{1,28} = 53.08, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 24.81, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 8.806, P = 0.0061$
		Time = 24 hours	
Center	$F_{1,28} = 17.55, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 74.95, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 19.14, P < 0.0001$
Peripheral	$F_{1,28} = 227.2, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 172.7, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 120.0, P < 0.0001$
Total	$F_{1,28} = 152.3, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 276.1, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 147.9, P < 0.0001$
Rearing	$F_{1,28} = 43.79, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 38.64, P < 0.0001$	$F_{1,28} = 35.85, P < 0.0001$

Table 2: Two-way analysis of variance of groups pretreatment with 0.05% propylthiouracil (PTU), which was added to the drinking water (thyroid status factor) and submitted to injection of vehicle or LPS (immunological challenge factor) on the forced swimming test.

	Immunological challenge factor	Thyroid status factor	Interaction
Forced Swimming Test (parameters)			
		2 hours	
Floating	$F_{1,36} = 129.3, P < 0.001$	$F_{1,36} = 30.11, P < 0.001$	$F_{1,36} = 95.6, P < 0.001$
Swimming	$F_{1,36} = 102.8, P < 0.0001$	$F_{1,36} = 22.28, P < 0.0001$	$F_{1,36} = 61.88, P < 0.0001$
Climbing	$F_{1,36} = 51.66, P < 0.001$	$F_{1,36} = 15.95, P < 0.001$	$F_{1,36} = 77.18, P < 0.0001$
		6 hours	
Floating	$F_{1,36} = 100.2, P < 0.0001$	$F_{1,36} = 133.2, P < 0.0001$	$F_{1,36} = 25.06, P < 0.0001$
Swimming	$F_{1,36} = 54.49, P < 0.0001$	$F_{1,36} = 88.89, P < 0.0001$	$F_{1,36} = 17.35, P < 0.001$
Climbing	$F_{1,36} = 242.9, P < 0.0001$	$F_{1,36} = 146.9, P < 0.0001$	$F_{1,36} = 20.28, P < 0.0001$
		24 hours	
Floating	$F_{1,32} = 41.81, P < 0.0001$	$F_{1,32} = 213.3, P < 0.0001$	$F_{1,32} = 16.62, P < 0.001$
Swimming	$F_{1,32} = 32.73, P < 0.0001$	$F_{1,32} = 193.1, P < 0.0001$	$F_{1,32} = 22.01, P < 0.0001$
Climbing	$F_{1,32} = 16.79, P < 0.001$	$F_{1,32} = 70.75, P < 0.0001$	$F_{1,32} = 5.64, P < 0.05$