

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL- MG**  
**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FISIOLÓGICAS**

**MERELYM KETTERYM DE OLIVEIRA**

**PARTICIPAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES ATÍPICOS**  
**(ENDOCANABINOIDES E SULFETO DE HIDROGÊNIO) NO COMPORTAMENTO**  
**DOENTIO EM RATOS**

**Alfenas/MG**

**2020**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Sede

O48p Oliveira, Merelym Ketterym de  
Participação de neurotransmissores atípicos (endocanabinoides e sulfeto de hidrogênio) no comportamento doentio em ratos / Merelym Ketterym de Oliveira – Alfenas, MG, 2020.  
113 f.: il. –

Orientador: Alexandre Giusti Paiva.  
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2020.  
Bibliografia.

1. Endotoxemia. 2. Inflamação. 3. Ativação astrocitária. I. Paiva, Alexandre Giusti. II. Título.

CDD- 616

Merelym Keterym de Oliveira

PARTICIPAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES ATÍPICOS (ENDOCANABINOIDES E SULFETO DE  
HIDROGÊNIO) NO COMPORTAMENTO DOENTIO EM RATOS

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL-MG. Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva

Aprovada em: 22 de outubro de 2020

Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
UNIFAL-MG

Profa. Dra. Beatriz de Carvalho Borges del Grande  
Instituição: University of Michigan

Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco  
Instituição: Universidade Paulista  
USP

Profa. Dra. Bruna Kalil Cutti  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
UNIFAL -MG

Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Giusti Paiva, Professor do Magistério Superior**, em 22/10/2020, às 17:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giovane Galdino de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 22/10/2020, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruna Kalil Cutti, Professor do Magistério Superior**, em 23/10/2020, às 13:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Beatriz de Carvalho Borges Del Grande, Usuário Externo**, em 23/10/2020, às 14:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **LUIZ GUILHERME DE SIQUEIRA BRANCO, Usuário Externo**, em 23/10/2020, às 18:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0385631** e o código CRC **AF82B24A**.

*Dedico a finalização deste trabalho  
a Deus, a quem devo tudo que sou!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser meu Pai, amigo e consolador nas horas difíceis, sem Ele não teria chegado até aqui. Ele me capacitou e me levou a lugares que eu jamais teria alcançado sem a Sua presença.

Aos meus pais, Maria e Paulo, que sempre se esforçaram para que eu pudesse me sentir realizada, apoiaram minha caminhada, enxugaram minhas lágrimas e jamais desistiram de mim.

Mãe, obrigada por tudo que a senhora fez e faz por mim, por cuidar do meu filho com todo carinho e por ter me dado a chance de estudar e realizar meus ideais, pois o sonho de tornar-me Doutora estaria limitado, se tivesse que cuidar do Luiz Gustavo sem sua ajuda. Gratidão eterna ainda seria pouco para expressar o quanto sou grata pelo privilégio de ser sua filha!

Ao meu filho Luiz Gustavo, por ser minha inspiração e abrilhantar minha vida com seu carinho. Eu achava que te ensinaria tanto da vida e foi você quem me ensinou a viver!

Ao meu namorado Jeferson, que em tão pouco tempo trouxe luz e alegria para os meus dias. Obrigada por seu meu companheiro de todas as horas e apoiar os meus sonhos. Você é um presente de Deus para mim e tornou minha caminhada repleta de amor e felicidade!

Aos meus irmãos Pablo e Paula e cunhados Natália e João por sempre torcerem pelo meu sucesso e acreditarem em minha capacidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva, por ter me dado a oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa e por contribuir com minha formação acadêmica, amadureci muito com seus ensinamentos. Obrigada pela paciência e até mesmo pelas broncas, pois elas me tornaram a profissional que sou hoje!

À Dr<sup>a</sup>. Fabiana Giusti, por ter me estendido a mão quando mais precisei. Obrigada pelo carinho, apoio e ajuda em todos os sentidos. Obrigada por ter estado presente em uma das fases mais difíceis da minha vida!

Agradeço aos meus amigos e companheiros de laboratório (Letícia, Wesley, Tatiane, Ana Cláudia, Fernando, Carol, Cíntia, Josi, Maria, Jadi) pelo apoio, aprendizado, parceria, confraternizações e pela paciência. Em especial, agradeço às filhas que a ciência me deu, Danyelle e Ana Carolina. Vocês me fizeram ter alguns cabelos

brancos, mas sou muito grata por ter contribuído com a formação de vocês, afinal juntas fizemos um lindo trabalho.

Ao técnico José Reis, obrigada por sua ajuda e apoio. Sempre com tamanha presteza me auxiliou, tornando possível a realização deste trabalho!

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001, pois o presente trabalho foi realizado com seu apoio, à UNIFAL-MG e ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas, por tornar-me doutora!

## RESUMO

Lipopolissacarídeo é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas, o qual é reconhecido por células imunes. Injeções periféricas desta toxina são capazes de mimetizar uma infecção, gerando um processo inflamatório. Em resposta às alterações a nível imunológico e endócrino frente a um estímulo infeccioso-inflamatório, observamos mudanças comportamentais e termorregulatórias no animal, conhecidas como comportamento doentio. Diante deste quadro, agentes moduladores da resposta inflamatória desempenham um papel importante. O sistema endocanabinoide e o neurotransmissor gasoso, sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), considerados neurotransmissores atípicos, tem sido abordados por participarem de diversas atividades fisiológicas associadas à regulação da homeostase, contração vascular, efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antiapoptóticos, antidepressivos e ansiolíticos. Diante disso, o objetivo do presente estudo, foi avaliar a participação dos neurotransmissores atípicos nas alterações comportamentais e neuroimunes observadas durante o comportamento doentio. Inicialmente, selecionamos a dose de LPS, para tal, realizamos uma curva dose-resposta e através de testes comportamentais, selecionamos a dose de 200 µg/Kg para nosso estudo. Em seguida, os animais foram submetidos à estereotaxia e após sete dias, passaram por 2 partes distintas. Na Parte I, os animais receberam AM251 (antagonista de canabinóide), ou WIN55,212-2 (agonista de canabinóide), ou VDM (inibidor da recaptção de canabinóide), ou veículo (V) intracerebroventricular (i.c.v.) e 15 minutos após injetamos intraperitonealmente (i.p.) salina (S) ou LPS (200 µg/ Kg). Passadas duas horas, submetemos os animais aos testes de: campo aberto (CA), ingestão alimentar (IA) e nado forçado (NF). Os animais da Parte II, também passaram pelo procedimento cirúrgico e após sua recuperação (5-7 dias), receberam Na<sub>2</sub>S (doador de H<sub>2</sub>S), ou Aminooxiacetato (AOA, inibidor da enzima CBS) ou veículo (V) i.c.v. e imediatamente em seguida, injetamos i.p. salina ou LPS. Após duas horas, submetemos os animais dos testes de: campo aberto (CA), ingestão alimentar (IA), interação social (IS) e nado forçado (NF), porém nesta segunda parte, coletamos o plasma dos animais, a fim de quantificar as citocinas plasmáticas e uma estrutura encefálica, o córtex pré-frontal, visando realizar a técnica de *Western Blotting*, para quantificar a expressão de GFAP em animais pré-tratados com H<sub>2</sub>S ou AOA, durante a endotoxemia. Os animais da Parte I, apresentaram uma redução na ingestão alimentar nos grupos tratados com V+LPS, AM251+LPS e VDM+LPS em relação ao controle. Contudo, nos animais tratados com WIN+LPS, observamos um aumento da ingestão em relação ao grupo que recebeu V+LPS. Nos testes de CA e NF, apenas aqueles que receberam V+LPS e AM251+LPS apresentaram uma diferença significativa em relação ao grupo V+S, onde observamos redução da distância percorrida no aparato e aumento de tempo de imobilidade, respectivamente, o que nos permitiu sugerir que o sistema endocanabinoide, via receptores CB1, não participa da modulação do comportamento doentio. Já, nos animais da Parte II, o grupo tratado com V+LPS apresentou redução da distância percorrida e aumento do tempo de imobilidade no CA, redução do tempo de interação total na IS, aumento do tempo de imobilidade e redução do tempo de nado no NF e redução da ingestão alimentar em relação ao grupo V+S. Esse quadro também foi observado no grupo de animais que receberam AOA+LPS. Naqueles que receberam Na<sub>2</sub>S+LPS observamos aumento do tempo de interação total na IS, redução do tempo de imobilidade no NF e aumento da ingestão alimentar, contudo

não notamos diferença significativa nos parâmetros analisados no CA, em relação ao grupo controle. Quanto às citocinas, TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$ , observamos um aumento de suas concentrações plasmáticas em todos os grupos quando comparados ao grupo controle. No que diz respeito à expressão de GFAP, notamos um aumento da expressão desta proteína nos grupos V+LPS e AOA+LPS, contudo o H<sub>2</sub>S foi capaz de prevenir o aumento da expressão de GFAP induzido pelo LPS. Estes resultados demonstram que o pré-tratamento com a Na<sub>2</sub>S (doador de H<sub>2</sub>S, i.c.v.), antes da aplicação i.p. de LPS, foi capaz de prevenir as alterações comportamentais e a ativação astrocitária frente ao desafio imunológico, nos permitindo sugerir que o sulfeto de hidrogênio pode influenciar a manifestação do comportamento doentio.

Palavras-chave: Endotoxemia. Inflamação. Ativação astrocitária.

## ABSTRACT

Lipopolysaccharide is a component of the cell wall of gram-negative bacteria, which is recognized by immune cells. Peripheral injections of this toxin are able to mimic an infection, generating an inflammatory process. In response to changes in the immune and endocrine levels in the face of an infectious-inflammatory stimulus, we observed behavioral and thermoregulatory changes in the animal, known as sickness behavior. Given this situation, agents that modulate the inflammatory response play an important role. The endocannabinoid system and the gaseous neurotransmitter, hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), considered atypical neurotransmitters, have been addressed because participate in various physiological activities associated with the regulation of homeostasis, vascular contraction, anti-inflammatory effects, antioxidants, antiapoptotics, antidepressants and anxiolytics. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the participation of atypical neurotransmitters in behavioral and neuroimmune changes observed during sickness behavior. Initially, we selected the dose of LPS, performed a dose-response curve and through behavioral tests, selected the dose of 200 µg / Kg for our study. Then, the animals were submitted to stereotaxis and after seven days, passed through 2 different parts. In Part I, the animals received AM251 (cannabinoid antagonist), or WIN55,212-2 (cannabinoid agonist), or VDM (cannabinoid reuptake inhibitor), or intracerebroventricular (icv) vehicle (V) and 15 minutes after injecting intraperitoneally (ip) saline (S) or LPS (200 µg / Kg). After two hours, submitted the animals to the tests of: open field (OF), food intake (FI) and forced swimming (FS). The animals in Part II also underwent the surgical procedure and after their recovery (5-7 days), received Na<sub>2</sub>S (H<sub>2</sub>S donor), or Aminooxyacetate (AOA, CBS enzyme inhibitor) or vehicle (V) i.c.v. and immediately afterwards inject i.p. saline or LPS. After two hours, submitted the animals for the tests of: open field (OF), food intake (FI), social interaction (SI) and forced swimming (FS), however in this second part, we collected the animals' plasma in order to quantify plasma cytokines and a brain structure, the prefrontal cortex, aiming to perform the Western Blotting technique, to quantify GFAP expression in animals pretreated with H<sub>2</sub>S or AOA, during endotoxemia. The animals in Part I showed a reduction in food intake in the groups treated with V + LPS, AM251 + LPS and VDM + LPS when compared to the control. However, in animals treated with WIN + LPS, we observed an increase in intake compared to the group that received V + LPS. In the OF and FS tests, only those who received V + LPS and AM251 + LPS showed a significant difference in relation to the V + S group, where observed a reduction in the distance traveled in the apparatus and an increase in immobility time, respectively, which allowed to suggest that the endocannabinoid system, via CB1 receptors, does not participate in the modulation of sickness behavior. In the animals in Part II, the group treated with V + LPS showed a reduction in the distance traveled and an increase in the immobility time in the OF, a reduction in the total interaction time in the SI, an increase in the immobility time and a reduction in the swimming time in the FS and reduced food intake compared to the V + S group. This picture was also observed in the group of animals that received AOA + LPS. In those who received Na<sub>2</sub>S + LPS, observed an increase in the total interaction time in the SI, a reduction in the immobility time in the FS and an increase in food intake, however, we did not notice a significant difference in the parameters analyzed in the OF, in relation to the control group. As for cytokines, TNF-α and IL1β, observed an increase in their plasma concentrations in all groups when compared to the control group. Regarding the

expression of GFAP, observed an increase in the expression of this protein in the groups V + LPS and AOA + LPS, however H<sub>2</sub>S was able to prevent the increase in GFAP expression induced by LPS. These results demonstrate the pre-treatment with Na<sub>2</sub>S (H<sub>2</sub>S donor, i.c.v.), before i.p. of LPS, was able to prevent behavioral changes and astrocyte activation in the face of the immune challenge, allowing to suggest that hydrogen sulfide may influence the manifestation of sickness behavior.

Keywords: Endotoxemia. Inflammation. Astrocytic activation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Resposta imune evocada por lipopolissacarídeo.....	20
Figura 2	Vias de comunicação sistema imune-cérebro.....	23
Figura 3	Representação esquemática do sistema endocanabinoide.....	28
Figura 4	Indução do comportamento doentio por aplicação de LPS.....	36
Figura 5	Parte 1 - injeção i.c.v. e i.p. nos animais, para realização dos testes comportamentais.....	37
Figura 6	Parte 2 - injeção i.c.v. e i.p. nos animais, para realização dos testes comportamentais.....	38
Figura 7	Parte 2 - injeção i.c.v. e i.p. nos animais, para posterior dosagem de citocinas e realização da técnica de <i>Western Blotting</i> .....	39
Figura 8	Realização de estereotaxia nos animais.....	41
Figura 9	Estereotaxia-posição da cânula demonstrada no monitor.....	42
Figura 10	Passo a passo da cirurgia de estereotaxia.....	42
Figura 11	Campo Aberto.....	45
Figura 12	Efeitos do LPS no teste de ingestão alimentar.....	48
Figura 13	Efeitos do LPS no teste de campo aberto.....	49
Figura 14	Efeitos do LPS no teste de interação social.....	50
Figura 15	Efeitos do LPS no teste de nado forçado.....	51
Figura 16	Efeito do pré-tratamento com AM251 na endotoxemia induzida por LPS, no teste de ingestão alimentar.....	52
Figura 17	Efeito do pré-tratamento com VDM na endotoxemia induzida por LPS, no teste de ingestão alimentar.....	53
Figura 18	Efeito do pré-tratamento com WIN55,212-2 na endotoxemia induzida por LPS, no teste de ingestão alimentar.....	55
Figura 19	Efeito do pré-tratamento com AM251 na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Campo aberto.....	57
Figura 20	Efeito do pré-tratamento com VDM na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Campo aberto.....	58

Figura 21	Efeito do pré-tratamento com WIN55,212-2 na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Campo aberto.....	59
Figura 22	Efeito do pré-tratamento com AM251 na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Nado Forçado.....	60
Figura 23	Efeito do pré-tratamento com VDM na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Nado Forçado.....	61
Figura 24	Efeito do pré-tratamento com WIN55,212-2 na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Nado Forçado.....	62
Figura 25	Efeito do pré-tratamento com AOA na endotoxemia induzida por LPS, no teste de comportamento ingestivo.....	64
Figura 26	Efeito do pré-tratamento com Na <sub>2</sub> S na endotoxemia induzida por LPS, no teste de comportamento ingestivo.....	65
Figura 27	Efeito do pré-tratamento com AOA ou Na <sub>2</sub> S na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Campo aberto.....	67
Figura 28	Efeito do pré-tratamento com AOA na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Nado Forçado.....	69
Figura 29	Efeito do pré-tratamento com Na <sub>2</sub> S na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Nado Forçado.....	70
Figura 30	Efeito do pré-tratamento com AOA ou Na <sub>2</sub> S na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Interação Social.....	72
Figura 31	Efeito do pré-tratamento com AOA na concentração de citocinas plasmáticas, durante a endotoxemia induzida por LPS	73
Figura 32	Efeito do pré-tratamento com Na <sub>2</sub> S na concentração de citocinas plasmáticas, durante a endotoxemia induzida por LPS	74
Figura 33	Efeito do pré-tratamento com AOA na expressão de GFAP (no córtex pré-frontal), durante a endotoxemia induzida por LPS.....	76
Figura 34	Efeito do pré-tratamento com Na <sub>2</sub> S na expressão de GFAP (no córtex pré-frontal), durante a endotoxemia induzida por LPS.....	77

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Grupos experimentais (sistema endocanabinoide/ desafio imunológico com LPS).....	37
Quadro 2	Grupos experimentais (sulfeto de hidrogênio/ desafio imunológico com LPS).....	38
Quadro 3	Quadro 3. Dose e horário de aplicação de LPS.....	40
Tabela 1	Análise de Variância de uma via para o Teste de Ingestão Alimentar, em animais tratados com veículo ou LPS (Valor de F).....	39 109
Tabela 2	Análise de Variância de uma via para o Teste de Campo Aberto, em animais tratados com veículo ou LPS (Valor de F)..	109
Tabela 3	Análise de Variância de uma via para o Teste de Interação Social, em animais tratados com veículo ou LPS (Valor de F)...	109
Tabela 4	Análise estatística - teste <i>t student's</i> para o Teste de Nado Forçado, em animais tratados com veículo ou LPS.....	109
Tabela 5	Análise de variância de duas vias no Teste de Ingestão Alimentar, em grupos pré-tratados com veículo ou AM251 (Pré-tratamento) e submetidos à injeção i.p. de veículo ou LPS (Desafio Imunológico).....	52
Tabela 6	Análise de variância de duas vias no Teste de Ingestão Alimentar, em grupos pré-tratados com veículo ou VDM (Pré-tratamento) e submetidos à injeção i.p. de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	54
Tabela 7	Análise de variância de duas vias no Teste de Ingestão Alimentar, em grupos pré-tratados com veículo ou WIN 55,212-2 (Pré-tratamento) e submetidos à injeção i.p. de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	55
Tabela 8	Análise de variância de duas vias no Teste de Campo Aberto, em grupos pré-tratados com veículo ou AM251 (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	58

Tabela 9	Análise de variância de duas vias no Teste de Campo Aberto, em grupos pré-tratados com veículo ou VDM (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico) .....	58
Tabela 10	Análise de variância de duas vias no Teste de Campo Aberto, em grupos pré-tratados com veículo ou WIN 55,212-2 (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico) .....	59
Tabela 11	Análise de variância de duas vias no Teste de Nado Forçado, em grupos pré-tratados com veículo ou AM251 (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	61
Tabela 12	Análise de variância de duas vias no Teste de Nado Forçado, em grupos pré-tratados com veículo ou VDM (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	62
Tabela 13	Análise de variância de duas vias no Teste de Nado Forçado, em grupos pré-tratados com veículo ou WIN 55,212-2 (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	63
Tabela 14	Análise de variância de duas vias no Teste de Ingestão Alimentar, em grupos pré-tratados com veículo ou AOA (Pré-tratamento) e submetidos à injeção i.p. de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	64
Tabela 15	Análise de variância de duas vias no Teste de Ingestão Alimentar, em grupos pré-tratados com veículo ou Na2S (Pré-tratamento) e submetidos à injeção i.p. de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	66
Tabela 16	Análise de variância de duas vias no Teste de Campo Aberto, em grupos pré-tratados com veículo ou AOA (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	68

Tabela 17	Análise de variância de duas vias no Teste de Campo Aberto, em grupos pré-tratados com veículo ou Na <sub>2</sub> S (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	68
Tabela 18	Análise de variância de duas vias no Teste de Nado Forçado, em grupos pré-tratados com veículo ou AOA (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	69
Tabela 19	Análise de variância de duas vias no Teste de Nado Forçado, em grupos pré-tratados com veículo ou Na <sub>2</sub> S (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	71
Tabela 20	Análise de variância de duas vias no Teste de Interação Social, em grupos pré-tratados com veículo ou AOA ou Na <sub>2</sub> S (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	72
Tabela 21	Análise de variância de duas vias em grupos pré-tratados com veículo ou AOA (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico), em relação às concentrações de citocinas plasmáticas.....	74
Tabela 22	Análise de variância de duas vias em grupos pré-tratados com veículo ou Na <sub>2</sub> S (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico), em relação às concentrações de citocinas plasmáticas.....	75
Tabela 23	Análise de variância de duas vias em grupos pré-tratados com veículo ou AOA (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de salina ou LPS (Desafio imunológico), em relação à expressão de GFAP.....	76
Tabela 24	Análise de variância de duas vias em grupos pré-tratados com veículo ou Na <sub>2</sub> S (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de salina ou LPS (Desafio imunológico), em relação à expressão de GFAP.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEA	Anandamida
AM251	Antagonista de CB1
AMPC	Adenosina Monofosfato cíclico
AOA	Aminooxiacetato
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira Hematoencefálica
CA	Campo aberto
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CB	Canabinoide
CB1	Receptor de canabinoide tipo 1
CB2	Receptor de canabinoide tipo 2
CBS	Cistationina-β-sintetase
CD14-MD2	<i>Cluster of differentiation 14 in macrophages</i>
cm	centímetros
CO	Monóxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenase 2
CRF	Fator liberador de corticotrofina
CSE	Cistationina-γ-liase
CVOs	Órgãos circunventriculares
DAGL	Diacilglicerol lipase
eCBs	Endocanabinoides
EPM	Erro padrão da média
FAAH	Fatty Acide Amide Hydrolase
g	gramas
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GR	Glutationa redutase
GRx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa
h	horas
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de Hidrogênio

HHA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
IA	Ingestão alimentar
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
IS	Interação Social
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 Beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
LBP	Proteína de ligação ao lipopolissacarídeo
LCE	Labirinto em cruz elevado
LPS	Lipopolissacarídeo
MAGL	Monoacilglicerol lipase
mL	mililitro
mL/Kg	mililitro por Kilograma
MST	3-mercaptopiruvato sufurtransferase
NAPE-PLD	N-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D hidrolase
NK	<i>Natural killer</i>
NO	óxido nítrico
NTs	Neurotransmissores
NF	Nado Forçado
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NRF2	Fator nuclear Tipo 2
POA	Área pré-óptica
PGE2	Prostaglandina E2
PRL	Prolactina
PVN	Núcleo paraventricular
ROS	Espécie reativa de oxigênio
s	Segundos
S	Salina
SNC	Sistema Nervoso Central
SON	Núcleo supra-óptico
TBE	Tribromoetanol

TLR4	<i>Toll Like Receptor 4</i>
<i>TLRs</i>	<i>Toll-like receptors</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
USA	<i>United States America</i>
V	Veículo
VDM	Inibidor da recaptação de endocanabinoide
WIN55,212-2	Agonista de canabinoide
$\mu\text{g/Kg}$	Micrograma por Kilograma
2-AG	<i>2 Arachidonoyl glycerol</i>
$\Delta^9$ -THC	<i><math>\Delta^9</math> Tetrahydrocannabinol</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
1.1	LPS E COMPORTAMENTO DOENTIO.....	20
1.2	NEUROTRANSMISSORES ATÍPICOS.....	25
1.3	SISTEMA ENDOCANABINOIDE.....	27
1.4	SULFETO DE HIDROGÊNIO (H <sub>2</sub> S).....	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
3.1	ANIMAIS.....	35
3.2	DROGAS.....	35
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	36
<b>3.3.1</b>	<b>Indução do comportamento doentio por aplicação de LPS.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Estereotaxia, pré-tratamento i.c.v. e tratamento i.p.: Parte 1 e Parte 2.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Dosagem de citocinas e Western Blotting.....</b>	<b>39</b>
3.4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	39
<b>3.4.1</b>	<b>Dose e horário de aplicação de LPS.....</b>	<b>39</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Estereotaxia.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Dosagem de citocinas.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4.4</b>	<b><i>Western Blotting</i>.....</b>	<b>43</b>
3.5	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	44
<b>3.5.1</b>	<b>Campo Aberto.....</b>	<b>44</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Interação social.....</b>	<b>45</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Ingestão alimentar.....</b>	<b>46</b>
<b>3.5.4</b>	<b>Nado forçado.....</b>	<b>46</b>
3.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	46
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
4.1	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LPS SOBRE O COMPORTAMENTO.....	47

4.1.1	<b>Ingestão alimentar</b> .....	47
4.1.2	<b>Campo Aberto</b> .....	48
4.1.3	<b>Interação social</b> .....	49
4.1.4	<b>Nado Forçado</b> .....	50
4.2	<b>INFLUÊNCIA DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS À ENDOTOXEMIA</b> .....	51
4.2.1	<b>Ingestão alimentar</b> .....	51
4.2.2	<b>Campo Aberto</b> .....	56
4.2.3	<b>Nado Forçado</b> .....	60
4.3	<b>INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM SULFETO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S) SOBRE AS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS À ENDOTOXEMIA</b> .....	63
4.3.1	<b>Ingestão alimentar</b> .....	63
4.3.2	<b>Campo Aberto</b> .....	66
4.3.3	<b>Nado Forçado</b> .....	68
4.3.4	<b>Interação social</b> .....	71
4.3.5	<b>Dosagem de citocinas</b> .....	73
4.3.6	<b>Análise da expressão de GFAP por <i>Western Blotting</i></b> .....	75
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	78
5.1	<b>EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LPS SOBRE O COMPORTAMENTO</b> .....	78
5.2	<b>INFLUÊNCIA DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS À ENDOTOXEMIA</b> .....	80
5.3	<b>INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM SULFETO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S) SOBRE AS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS À ENDOTOXEMIA</b> .....	84
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	90
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	91
	<b>ANEXOS</b> .....	107

## 1 INTRODUÇÃO

A seguir, apresentaremos os temas abordados neste estudo.

### 1.1 LPS E COMPORTAMENTO DOENTIO

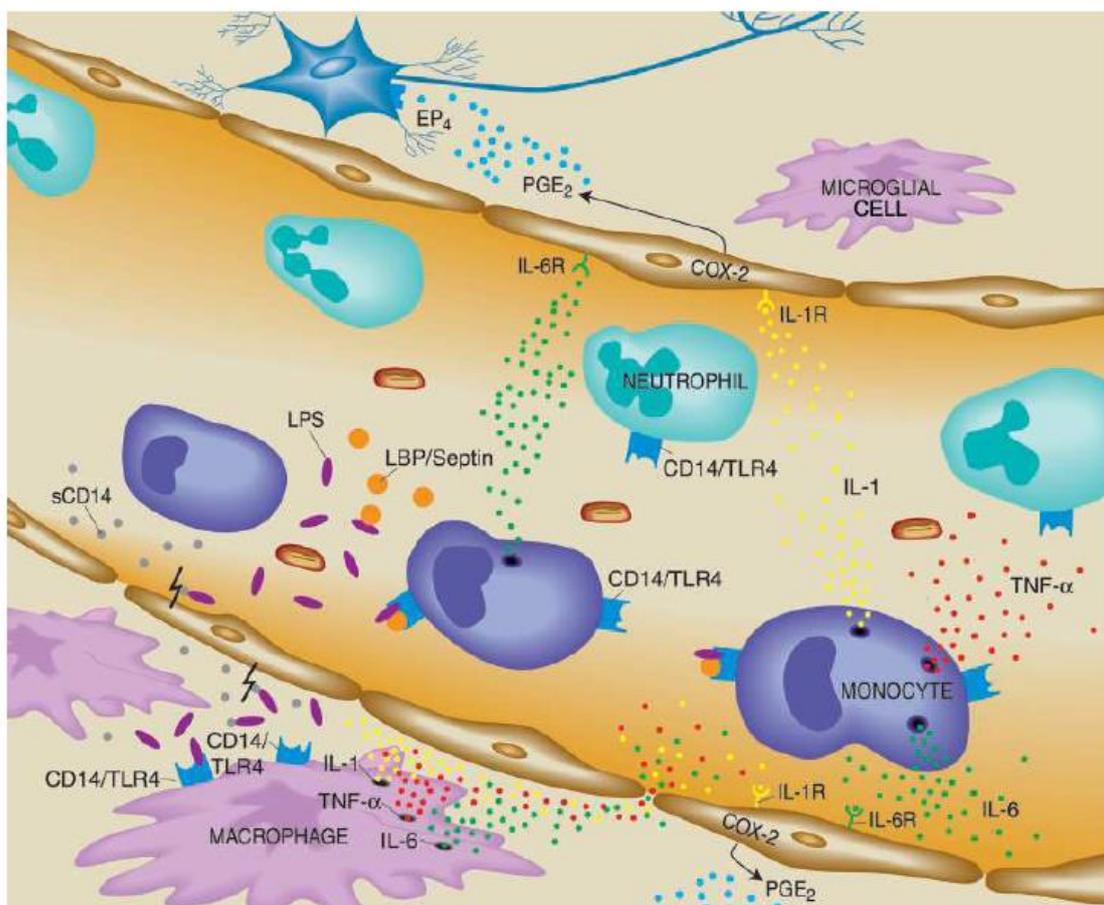
Lipopolissacarídeo (LPS), alvo de nosso estudo, é um componente externo da parede celular de bactérias Gram negativas. Estruturalmente ele é constituído por uma unidade glicídica associada ao lipídio A (centro biologicamente ativo da molécula), o qual é reconhecido facilmente por células imunes principalmente macrófagos. Como é uma toxina apolar, na corrente sanguínea, necessita ser transportado por lipoproteínas de alta densidade (LBP- *LPS-binding protein*) (FREUDENBERG *et al.*, 2001).

O LPS tem a capacidade de se ligar ao LBP, formando o complexo LBP-LPS, o qual se liga a um receptor na membrana dos macrófagos (CD14-MD2), que por sua vez envia um sinal para o interior da célula através de um receptor Toll-like 4 (TLR4) (KELMER, 2009).

Ao ser reconhecido pelos receptores TLR4 (presente na superfície de células apresentadoras de antígenos como monócitos e macrófagos), o LPS é capaz de estimular a liberação de mediadores pró-inflamatórios como citocinas, histamina, serotonina, óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), cicloxigenase 2 (COX2) e prostaglandinas (KELMER, 2009; NISHIO *et al.*, 2013). A liberação destes mediadores, envia sinais ao cérebro por diversas vias, alcançando direta ou indiretamente neurônios e células de apoio (microglia e astrócitos) (BRAHMACHARI, S.; FUNG, Y.K.; PAHAN, K, 2006; MARTIN *et al.*, 2013).

Estudos pioneiros já demonstravam que a aplicação de LPS, é um dos modelos mais comumente utilizados para simular a evocação do sistema imune a partir de estressores biológicos. Injeções periféricas de LPS são capazes de gerar um processo inflamatório, mimetizando várias das respostas inflamatórias de fase aguda (BURREL, 1994). Sabe-se ainda, que estas respostas são cruciais, pois representam uma estratégia altamente organizada para combater uma infecção (DANTZER, 2009).

Figura 1- Resposta imune evocada por LPS.



Fonte: ZHANG; RIVEST, 2003, modificado.

Nota: Na corrente sanguínea, o LPS se liga ao LBP, formando o complexo LBP-LPS, este pode então ativar diferentes populações celulares (monócito/neutrófilos e macrófagos) por ligação ao seu receptor CD14 e receptor TLR4. Uma das consequências mais bem esclarecidas dessa ativação é a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6. Estas citocinas podem atuar no SNC e ativam COX-2 e Prostaglandina E sintase, que por sua vez, estimulam a síntese de PGE<sub>2</sub>.

É importante salientar que durante o desenvolvimento do processo inflamatório ou infeccioso, podemos observar a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como: fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6), as quais apresentam-se em níveis plasmáticos extremamente elevados (TURNBULL; RIVIER, 1999). As citocinas são moléculas proteicas grandes (hidrofílicas) que não atravessam a barreira hematoencefálica (BHE).

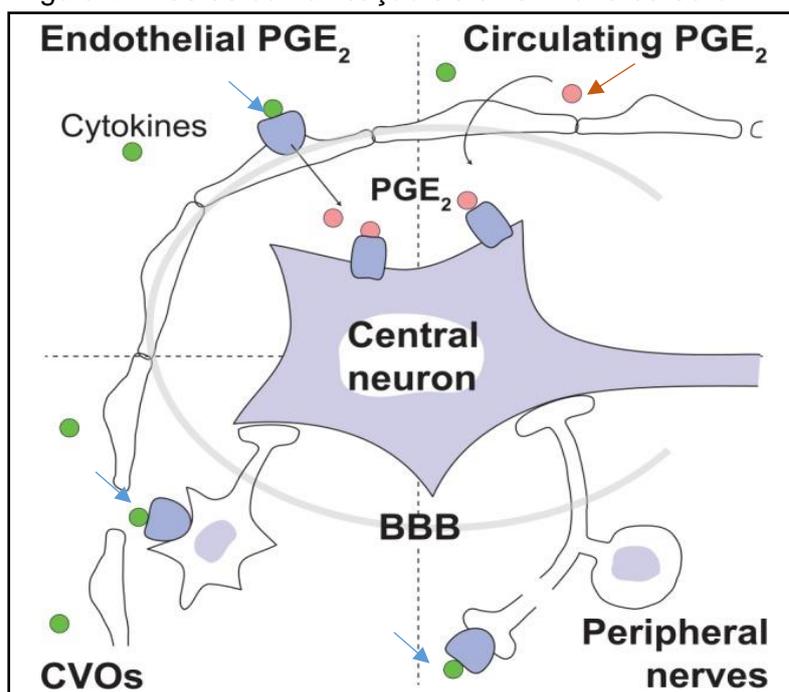
Trabalhos de Blomqvist e Engblom (2018) demonstraram que citocinas liberadas na periferia podem chegar à BHE e ativarem o sistema nervoso central (SNC), por meio de diferentes vias (figura 2). Citocinas pró-inflamatórias liberadas periféricamente podem se ligar a receptores nas células dos vasos sanguíneos

cerebrais e induzir a síntese de prostaglandina E2 (PGE2). Elas podem ainda, ativar neurônios dos órgãos circumventriculares (CVOs), que possuem capilares fenestrados, ou até mesmo, ativar nervos periféricos. Demonstrou-se também, que a inflamação periférica pode liberar PGE2 circulante que entra no cérebro.

A síntese de PGE2 é dependente da indução de COX-2 e da enzima prostaglandina sintase E, ambas expressas em células endoteliais de vasos sanguíneos cerebrais (RIVEST, 2001). A PGE2 é uma molécula lipofílica que se difunde pelo parênquima cerebral e age em receptores neuronais no tronco encefálico, chamados de EP3 ou EP4 e em áreas hipotalâmicas, como o núcleo paraventricular (PVN) e área pré-óptica (POA), que estão envolvidas no controle da atividade do eixo HHA e regulação da temperatura corporal (DANTZER, 2009; OKA *et al.*, 2000; RIVEST, 2001).

Com a ativação do sistema imune frente à exposição ao patógeno, podemos observar além da ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise- Adrenal (HHA), um aumento da produção de glicocorticoides e de proteínas de fase aguda (haptoglobina, proteína C-reativa, ceruloplasmina), redução da concentração plasmática de ferro e zinco e aumento da concentração de cobre, alterações metabólicas, leucocitose, anorexia e febre (BLATTEIS, 2006).

Figura 2- Vias de comunicação sistema imune-cérebro.



Fonte: BOMQVIST, ENGBLOM, 2018, modificado.

Nota: Citocinas podem atingir o sistema nervoso central, através de transportadores específicos localizados na barreira hematoencefálica ou passar para o cérebro através dos CVOs. A sinalização pode ocorrer também, pela produção de prostaglandinas na interface entre o cérebro e a corrente sanguínea, ou ainda, pelos nervos periféricos.

É conhecida a importância da neuroinflamação, no estabelecimento da resposta imunológica, merecendo destaque os astrócitos, que participam de eventos importantes na boa funcionalidade do SNC, como a composição da barreira hematoencefálica, migração neuronal, proteção contra o estresse oxidativo e resposta imune com secreção de citocinas pró-inflamatórias (VOLTERRA; MELDOLESI, 2005).

A astrogliose, como é conhecida a ativação dos astrócitos, é crucial no início e progresso da resposta neuroinflamatória (FARINA; ALOISI; MEINL, 2007) e está associada à expressão de uma proteína constituinte do citoesqueleto dos astrócitos, conhecida como Proteína Glial Fibrilar Ácida ou Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), considerada o principal biomarcador destas células (RODNIGHT *et al.*, 1997). Em resposta à exposição a um patógeno ocorre alteração na expressão desta proteína, resultando em seu aumento em situações de injúria (PEKNY; PEKNA, 2004).

Durante um processo inflamatório no SNC, a microglia ativada secreta

citocinas que ativam os astrócitos, aumentando a expressão de GFAP e S100B (outra proteína envolvida na ativação astrocitária). Essas proteínas se ligam a um receptor na microglia, levando à ativação de NF- $\kappa$ B, que estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias e induz a síntese da COX-2, contribuindo para o ciclo neuroinflamatório (GLASS, *et al.*, 2010). Neste contexto, Norden e colaboradores (2016) descreveram que a ativação do sistema imunológico através do LPS, é capaz de induzir uma resposta coordenada no SNC por meio da ativação das células gliais, as quais interpretam e propagam sinais inflamatórios no cérebro, influenciando as respostas fisiológicas e comportamentais.

Em resposta à estas alterações a nível imunológico/endócrino e na glia frente a um estímulo inflamatório-infeccioso, observamos mudanças comportamentais e termorregulatórias no animal. Como exemplo, temos a diminuição da ingestão de alimentos e do comportamento exploratório e social, anedonia, acentuado estado depressivo, alterações no padrão do sono, perda do apetite sexual, piloereção e febre (AUBERT, 1999). Ao conjunto destas manifestações comportamentais e termorregulatórias, caracterizadas como uma estratégia para poupar energia, afim de tornar eficiente a resposta imunológica frente ao patógeno, intitula-se comportamento doentio ou *sickness behavior* (AVITSUR; YIRMIYA, 1999; BLATTEIS *et al.*, 2005; DANTZER *et al.*, 1998 a, 1998 b; DANTZER *et al.*, 2001; DE PAIVA *et al.*, 2010; HORI *et al.*, 2000; KENT *et al.*, 1996; KLUGER, 1991; LEONARD, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2020; ROMANOVSKY, 2004; ROMANOVSKY *et al.*, 2006; SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2015; STEINER; BRANCO, 2003).

Segundo Moltz (1993) e Hart (1988) as alterações comportamentais que podem ser notadas durante a endotoxemia, são essenciais para a sobrevivência do animal, bem como as respostas termorregulatórias que levam à febre, pois a resposta adaptativa tem a finalidade de combater a infecção poupando energia, tendo em vista, aumentar a eficácia da resposta imune e estabelecer um ambiente desfavorável ao patógeno.

A redução da atividade locomotora e aumento do comportamento tipo-ansioso são respostas comumente observadas após tratamento agudo com endotoxina, estas respostas à infecção podem ser observadas após tratamento de roedores com doses variáveis de LPS (50-250  $\mu$ g/Kg), e isso pode ser constatado por parâmetros como atividade locomotora-exploratória, avaliada nos testes de claro escuro e campo

aberto e comportamento social, observado durante o teste de interação social (BANASIKOWSKI *et al.*, 2015).

Outro tipo de comportamento observado após administração de LPS é o tipo-depressivo, o qual considera parâmetros como tempo de imobilidade avaliado nos testes de nado forçado e suspensão pela cauda e de perda do prazer (anedonia), observado no teste de preferência à sacarose, ambos considerados como preditivos de comportamento tipo-depressivo em animais (DANTZER, 2009; LI *et al.*, 2015).

Apesar da diversidade de estudos sobre a modulação do comportamento doentio, há muito a ser investigado a respeito da participação dos neurotransmissores envolvidos neste quadro. Neurotransmissores atípicos vem sendo amplamente abordados e relacionados às alterações típicas do comportamento. Estudos anteriores revelaram estes neurotransmissores como alvo potencial para o desenvolvimento de drogas ansiolíticas (CHEN *et al.*, 2013; DONATTI *et al.*, 2017), além de atuarem no comportamento tipo-depressivo (CHEN *et al.*, 2013; HUANG; CHEN, ZHANG, 2016; MORAIS *et al.*, 2016) modularem o processo inflamatório (BENEDETTI *et al.*, 2017; HOLLIS *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2007) e controlarem a temperatura corporal (KWIATKOSKI *et al.*, 2012). Diante disso, este estudo tornou-se importante e necessário, pois como os dados que abordam conjuntamente neurotransmissores atípicos e comportamento doentio são escassos, este trabalho permitiu avaliar a participação destes neurotransmissores nas alterações comportamentais e neuroimunes frente ao desafio imunológico com LPS.

## 1.2 NEUROTRANSMISSORES ATÍPICOS

Os neurotransmissores (NTs) são pequenas moléculas responsáveis pela comunicação das células no sistema nervoso e comumente são encontradas nos terminais sinápticos dos neurônios. Eles são liberados na fenda sináptica e atuam em seus receptores localizados no neurônio pré-sináptico ou pós-sináptico. A atuação dos NTs em seus receptores modula a transmissão sináptica, dessa forma as respostas dadas pelos neurônios a um estímulo, podem ser excitatórias ou inibitórias e dependem das características dos neurotransmissores e seus receptores envolvidos (LENT, 2008).

#### a) Neurotransmissores convencionais ou típicos

Os mensageiros químicos que atuam como neurotransmissores convencionais compartilham certas características básicas. Eles são armazenados em vesículas sinápticas, liberados quando  $\text{Ca}^{+2}$  entra no terminal axonal em resposta à um potencial de ação e atuam ligando-se a receptores de membrana localizados no terminal pós-sináptico da célula (PIOMELLI, 2003).

Os neurotransmissores típicos podem ser divididos em: aminoácidos (glutamato, GABA e glicina), aminas biogênicas que são sintetizadas a partir de aminoácidos precursores (dopamina, norepinefrina, epinefrina, serotonina e histamina), neurotransmissores purinérgicos (ATP e adenosina) que são nucleotídeos e nucleosídeos, acetilcolina e neuropeptídeos (endorfinas e encefalinas, que inibem a dor, a substância P, que transporta os sinais da dor e o neuropeptídeo Y, que estimula a fome e pode prevenir convulsões) (LENT, 2008).

#### b) Neurotransmissores não convencionais ou atípicos

Algumas classes de NTs são consideradas atípicas e foram assim agrupadas por não seguirem todas as regras usuais que definem NTs convencionais anteriormente abordadas.

Nesta modalidade, podemos elencar os endocanabinoides e os neurotransmissores gasosos como óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO) e sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Estas moléculas são atípicas, pois não são armazenadas em vesículas sinápticas e podem transmitir mensagens do neurônio pós-sináptico para o pré-sináptico. Além disso, ao invés de interagir com receptores da membrana plasmática de suas células-alvo, os neurotransmissores gasosos podem atravessar a membrana celular e agir diretamente dentro da célula (BARANANO; FERRIS; SNYDER, 2001; PIOMELLI, 2003). Os endocanabinoides e o sulfeto de hidrogênio, alvos de nosso estudo, serão abordados a seguir.

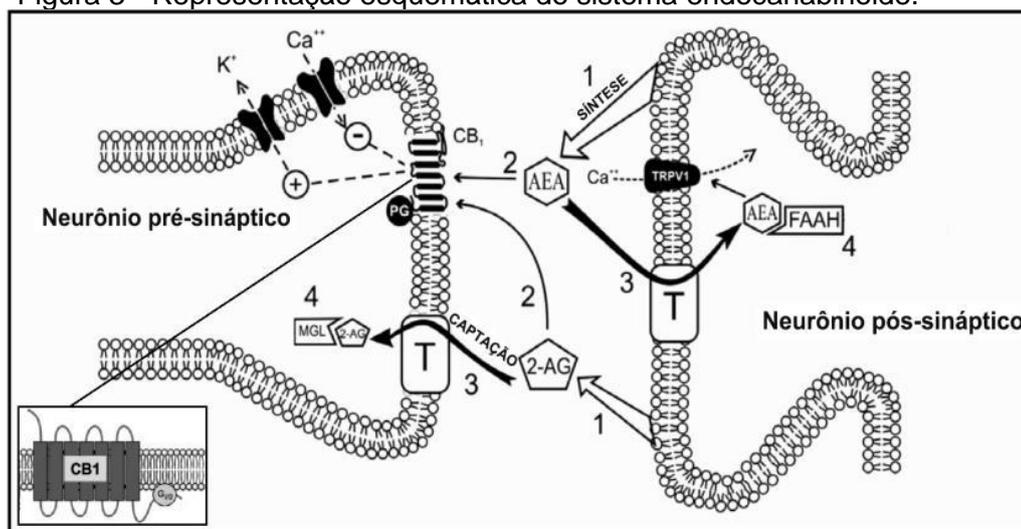
### 1.3 SISTEMA ENDOCANABINOIDE

Os mecanismos de modulação do comportamento doentio são pouco conhecidos. Neste contexto propomos avaliar a participação do sistema endocanabinoide no comportamento doentio.

O sistema endocanabinoide é composto pelos endocanabinoides, seus receptores e as enzimas que catalisam sua biossíntese e degradação. Ele pode ser entendido como um sistema de sinalização endógena que atua em inúmeros papéis fisiológicos, como a modulação da nocicepção, homeostase energética, resposta imunológica e controle do metabolismo endócrino (MARSICANO; LUTZ, 2006).

Os endocanabinoides (eCBs) são sintetizados nos neurônios pós-sinápticos e se ligam aos seus receptores nos neurônios pré-sinápticos, restringindo a atividade neural. São formados a partir da quebra de fosfolípidios de membrana, como o ácido araquidônico e agem como mensageiros retrógrados. A anandamida e o 2-AG, agonistas de receptores canabinoides, são formados por vias dependentes de fosfolípidios, cujas enzimas de síntese são a N-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D hidrolase (NAPE-PLD) e a DAGL, respectivamente (OKAMOTO *et al.*, 2004). Ambos (anandamida e 2-AG) após serem removidos da fenda sináptica através do transportador de endocanabinoides pela membrana pós e pré-sináptica (SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010), têm sua ação interrompida pelo processo de degradação. Essa etapa ocorre por simples difusão ou através de processo facilitado por uma proteína transportadora, onde são rapidamente metabolizados e hidrolisados pela FAAH e pela MAGL respectivamente, em compostos inativos (DI MARZO; MATIAS, 2005).

Figura 3 - Representação esquemática do sistema endocanabinoide.



Fonte: SAITO *et al.*, 2010 e PAGOTTO, *et al.*, 2006, modificado.

Nota: No centro da figura estão representados os Endocanabinoides (AEA e 2-AG). 1-Síntese, 2-Ligação dos endocanabinoides ao receptor CB1, 3- Transporte para dentro da célula (os transportadores estão representados pela letra T) e 4-Degradação pelas enzimas específicas (MGL e FAAH).

Temos dois tipos de receptores neste sistema: CB1 e CB2, ambos estão acoplados às proteínas Gi/o e pertencem à uma grande e diversificada família de proteínas acopladas à membrana celular. Os receptores CB1 são os mais abundantes até agora identificados no SNC, embora também estejam presentes no sistema nervoso periférico (DI MARZO; BIFULCO; PETROCELLIS, 2004).

Enquanto que, os receptores CB2 localizam-se em estruturas associadas à hematopoiese e à modulação do sistema imune. Os receptores canabinoides CB1 e principalmente CB2 estão presentes em células B, células natural killer (NK), monócitos, neutrófilos e leucócitos, além disso, tanto os macrófagos como os leucócitos secretam endocanabinoides. A presença do sistema endocanabinoide nos tecidos linfoides, nos permite sugerir que os endocanabinoides exercem alguma função sobre o sistema imunológico (PESTONJAMASP; BURSTEIN, 1998).

Conforme já descrito anteriormente, os endocanabinoides são neurotransmissores atípicos, que medeiam a transferência das informações dos terminais pós aos pré-sinápticos, de uma forma retrógrada, além disso são sintetizados sob demanda e não são armazenados em vesículas (PAGOTTO *et al.*, 2006; BURNSTOCK, 2009). A síntese desses neurotransmissores ocorre nos neurônios pós-sinápticos, após o influxo de cálcio e a ativação das fosfolipases, as quais convertem os fosfolipídios em endocanabinoides (PIOMELLI, 2003).

Grandes avanços no desenvolvimento de canabinoides sintéticos, tem permitido um progresso na pesquisa dos efeitos dos canabinoides no organismo. Como exemplo, temos o WIN55,212-2 (agonista de canabinoide), o qual é bastante seletivo para o CB1 e tem pouco efeito em outros sistemas de neurotransmissores. Outros compostos sintéticos bastante utilizados, são o VDM e o AM404, os quais agem inibindo a recaptção de canabinoides, tanto endógenos quanto exógenos. Essa ação pode ser realizada através da inibição da enzima FAAH ou da proteína transportadora, em ambos os casos observamos o aumento do tempo e da quantidade de canabinoides extracelular (BISOGNO; LIGRESTI; DI MARZO, 2005). Outros trabalhos revelam ainda, o desenvolvimento de potentes e seletivos antagonistas do receptor CB1, como SR141716A e AM251 (FOX *et al.*, 2001).

Diversos pesquisadores em estudos clínicos e experimentais, têm demonstrado que os canabinoides endógenos e a ativação de seus receptores são capazes de exercer muitos efeitos pleiotrópicos.

Estudos *in vitro* e *in vivo* tem sugerido que o sistema endocanabinoide possa ter ação neuroprotetora em mamíferos (MARTINEZ, 2013). Inclusive, nos EUA e Europa já são comercializados medicamentos à base de canabinoides. Um desses medicamentos é o Sativex®, um spray bucal que contém em sua fórmula canabidiol. Estudos demonstraram que o uso do medicamento é uma boa escolha para tratar espasticidade em pacientes com esclerose múltipla que não toleram os antiespásticos tradicionais (LEUSSINK, 2012).

No sistema nervoso, trabalhos mostraram a eficácia de agonistas canabinoides na isquemia cerebral, na epilepsia e também em modelos animais com doenças neurodegenerativas (CARLINI, 2004; MAKRIYANNIS; MECHOULAM; PIOMELLI, 2005).

Quanto ao sistema imune, pesquisas recentes tem mostrado que, *in vitro*, os canabinóides são capazes de atenuar um estímulo inflamatório (KLEIN *et al.*, 2000; KLEIN; NEWTON; FRIEDMAN, 1998) e outros estudos demonstraram ainda, que canabinoides como anandamida, 2-AG,  $\Delta^9$ -THC, canabidiol e WIN55,212, afetam vários tipos de células do sistema imune, tanto em humanos, quanto em animais (KLEIN *et al.*, 2000; COTA *et al.*, 2003).

Estudos de Baker, Jackson e Pryce (2007) revelaram a capacidade dos canabinoides inibirem linfócitos T no sangue periférico, provavelmente através de receptores CB2, na superfície do linfócito T, o que resultaria na redução da

apresentação de antígenos e da produção de citocinas pró-inflamatórias. Já os endocanabinoides, como 2-AG, teria a capacidade de suspender a ativação da microglia e inibir a função dos linfócitos T de induzir a apoptose.

Lago e colaboradores (2012) realizaram estudos com camundongos com encefalomielite autoimune experimental, onde testaram um agonista não seletivo de receptores canabinoides, o WIN55-212-2. O tratamento com esse agonista, foi capaz de diminuir a incapacidade neurológica dos camundongos e melhorar a coordenação motora desses animais, além de evitar a perda de peso. Ele atenuou a expressão de diversos marcadores pró-inflamatórios, como a COX-2 e TNF- $\alpha$  na medula espinhal e diminuiu a ativação da microglia no SNC.

Quanto à ingestão alimentar, diversos estudos demonstraram que o sistema endocanabinoide modula o comportamento alimentar, sendo os seus principais locais de ação, o sistema mesolímbico (componente hedônico) e o hipotálamo (componente homeostático). No sistema mesolímbico, é capaz de reforçar a motivação para procurar e consumir alimentos de elevado valor hedônico, interagindo com determinadas vias do circuito de recompensa cerebral. No hipotálamo, o sistema endocanabinoide é ativado após curtos períodos de privação alimentar, regulando os níveis e a ação de mediadores orexigênicos e anorexigênicos, induzindo o apetite (DI MARZO; MATIAS, 2005).

Além disso, os receptores CB1 quando ativados pelos endocanabinoides, podem atuar na via da dor estimulando a antinociceptividade. Na memória, agem controlando o movimento e inibindo a memória de curto prazo. No sistema endócrino, podem regular a secreção de prolactina (PRL), do hormônio do crescimento e o eixo HHA. No sistema cardiovascular e respiratório, atuam aumentando a frequência cardíaca, vasodilatação, broncodilatação e participam da termorregulação (COTA; MARSICANO; TSCHOP, 2003; DE PETROCELLIS; CASCIO; DI MARZO, 2004; DI MARZO; MATIAS, 2005; PAGOTTO *et al.*, 2006; PANIKASHVILI *et al.*, 2001; WAGNER *et al.*, 2001; WENGER *et al.*, 2001; RAWLS *et al.*, 2004).

Todavia, no que diz respeito ao comportamento, existem estudos que defendem uma melhora no comportamento tipo-ansioso/depressivo com a manipulação do sistema endocanabinoide (GRIEBEL *et al.*, 2005; PENÃ *et al.*, 2000; SINK *et al.*, 2010; TREZZA; VANDERSCHUREN, 2008), e outros achados, que enfatizam uma piora destes parâmetros (MORAIS *et al.*, 2016; NAVARRO *et al.*, 1997; PENÃ *et al.*, 2000; TREZZA; VANDERSCHUREN, 2008). Frente a esta

resposta contraditória, nosso trabalho propôs averiguar a participação deste sistema no comportamento doentio, induzido por LPS.

#### 1.4 SULFETO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S)

Neurotransmissores gasosos, como o H<sub>2</sub>S, o óxido nítrico (NO) e o monóxido de carbono (CO) são reconhecidos como importantes neuromoduladores, capazes de ativar mecanismos celulares em resposta a diferentes estímulos, podendo ter um importante papel em aspectos fisiológicos e patológicos. Além de atuarem como gasotransmissores, eles possuem outras propriedades em comum, como o fato de serem pequenas moléculas gasosas, facilmente permeáveis entre as membranas plasmáticas das células e não atuam sobre receptores específicos de membrana. Devido à sua reatividade, essas moléculas não são armazenadas em vesículas pré-sinápticas, mas são sintetizadas enzimaticamente sob demanda e sua produção ocorre sob regulação (KASPAREK *et al.*, 2008).

H<sub>2</sub>S, alvo de nosso estudo, é um gás incolor com forte odor (característico de ovo podre). O nível detectável deste gás pelo nariz humano, está em uma concentração 400 vezes menor que o seu nível tóxico (WANG *et al.*, 2002). Ele é produzido endogenamente a partir da L-cisteína pela ação das enzimas cistationina- $\gamma$ -liase (CSE, presente em tecidos periféricos), cistationina- $\beta$ -sintase (CBS, no cérebro) e 3-mercaptopiruvato sufurtransferase (MST) (CHEN *et al.*, 2013).

Estudos têm demonstrado que o H<sub>2</sub>S está envolvido em diversas atividades fisiológicas associadas à regulação da homeostase, contração vascular, efeitos anti-inflamatórios ou pró-inflamatórios.

No sistema cardiovascular, observou-se uma redução da hipertensão arterial devido ao efeito vasodilatador do H<sub>2</sub>S, relaxando a aorta torácica, veia porta e artéria mesentérica. Contudo, em outros estudos, vemos que em baixas concentrações ele possui efeito contrário, induzindo a vasoconstrição através do possível mecanismo de supressão do NO (GUO; CHENG; ZHU, 2013).

No sistema nervoso central, o neuromodulador, tem sido implicado em várias funções neuronais, como na indução da liberação do hormônio liberador de corticotropina no hipotálamo (RUSSO *et al.*, 2000) e na potenciação a longo prazo no hipocampo, por aumentar a sensibilidade do N-metil-D-aspartato através de uma

via mediada por AMPc, sendo importante no aprendizado, memória e hiperalgesia (ABE, KIMURA, 1996; KIMURA, 2000). Sabe-se que o H<sub>2</sub>S aumenta os níveis de AMPc nos neurônios e também hiperpolariza os neurônios primários por ativar os canais de potássio dependentes de ATP (MOORE *et al.*, 2003).

Na glia, o NaHS (doador de H<sub>2</sub>S) foi capaz de gerar ondas de cálcio, modulando funções vasculares e neuronais em uma cultura de células (NAGAI *et al.*, 2004). Além disso, o sulfeto de hidrogênio protegeu, de forma dose-dependente, a micróglia e os astrócitos da inflamação induzida por lipopolissacarídeo (HU *et al.*, 2007).

No sistema respiratório, Chunyu e colaboradores (2003) constataram que a atividade do mRNA da CSE e do H<sub>2</sub>S no tecido pulmonar e plasma, estavam suprimidos na hipertensão pulmonar em modelo de hipóxia em ratos e demonstraram ainda, que a administração exógena deste neuromodulador, pode reduzir a elevação da pressão arterial pulmonar.

O neurotransmissor gasoso, pode também regular a resposta inflamatória pulmonar ao modular a síntese de citocinas. Li e colaboradores (2008), utilizando modelo de injúria pulmonar induzida por ácido oléico, observaram que o tratamento dos ratos com o doador de H<sub>2</sub>S, diminuiu os níveis de IL-6 e IL-8. Em cultura de macrófagos da linhagem RAW264.7, o doador de H<sub>2</sub>S, GYY4137, foi capaz de inibir a liberação de IL-1  $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (WHITEMAN *et al.*, 2010). Em ambos os estudos, os doadores de H<sub>2</sub>S aumentaram a síntese de IL-10 pelos macrófagos.

Outras pesquisas demonstraram que o tratamento com o doador de H<sub>2</sub>S, o hidrossulfeto de sódio - NaHS, tem efeitos benéficos sobre o tratamento da asma, diminuindo a infiltração de eosinófilos e o estresse oxidativo pulmonar, o que levou a uma diminuição dos radicais livres derivados do oxigênio (ROS) e aumento das atividades da glutathione redutase (GR) e da glutathione peroxidase (GPx), sugerindo que o H<sub>2</sub>S possui um importante efeito antioxidante no pulmão, pela modulação das enzimas responsáveis pela manutenção dos níveis de glutathione (GSH) neste órgão (BENETTI *et al.*, 2013; CAMPOS *et al.*, 2016).

O tratamento com H<sub>2</sub>S revelou também, efeitos antiapoptótico e antioxidante, os quais também induziram neuroproteção, diminuindo os danos produzidos pela heroína no hipocampo de ratos (JIANG *et al.*, 2011). De modo semelhante, utilizando um doador de H<sub>2</sub>S, em cultura de células derivadas de feocromocitoma de rato,

observaram seu efeito neuroprotetor ao inibir a apoptose pela preservação da função mitocondrial e diminuição do acúmulo de ROS (TANG *et al.*, 2011).

Estudos de Fernández *et al* (2016), mostraram que o sulfeto de hidrogênio foi capaz de modular hipotermia durante choque endotóxico em ratos que receberam aminooxiacetato (AOA, inibidor de CBS) i.c.v., reforçando sua ação como uma molécula criogênica. Corroborando com este achado, outra pesquisa reforçou este papel criogênico em animais com anapirexia induzida por hipóxia (KWIATKOSKI *et al.*, 2012)

Quanto aos aspectos comportamentais, pesquisas de Chen *et al* (2013), constataram que o tratamento crônico com um doador de H<sub>2</sub>S (NaHS; 5,6 mg/kg, i.p.) reduziu comportamento tipo ansioso no teste de labirinto em cruz elevado (LCE) e o tempo de imobilidade no teste de nado forçado (NF). Estudos de Donatti *et al* (2017), reforçaram esse achado, mostrando que o tratamento crônico i.p. com H<sub>2</sub>S, exerceu um efeito ansiolítico em ratos submetidos aos testes de campo aberto e LCE. Ratos diabéticos, pré-tratados com H<sub>2</sub>S, apresentaram redução do tempo de imobilidade no NF e do comportamento semelhante à ansiedade no LCE, foram observados também, redução dos níveis de glutatona e aumento dos níveis da superóxido dismutase, revelando um papel inibidor do H<sub>2</sub>S sobre o stress oxidativo no hipocampo (TANG *et al.*, 2015).

Sabendo que o sulfeto de hidrogênio, é capaz de modular a resposta inflamatória, exercer efeitos semelhantes aos antidepressivos e ansiolíticos e regular a termorregulação, pode-se sugerir que a manipulação deste seja capaz de modificar o comportamento do animal durante a endotoxemia induzida pelo LPS. Diante disso, este trabalho permitiu avaliar a participação do H<sub>2</sub>S nas alterações comportamentais e neuroimunes observadas durante o comportamento doentio.

## 2 OBJETIVOS

A seguir, serão descritos os objetivos deste estudo.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a participação de neurotransmissores atípicos (endocanabinoides e H<sub>2</sub>S) sobre o comportamento doentio induzido pelo LPS em ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar o efeito da administração de diferentes doses de LPS (100, 200 ou 500 µg/Kg) sobre as alterações comportamentais, 2 horas após aplicação intraperitoneal (i.p.) de LPS;
- b) Parte 1: Avaliar as alterações comportamentais durante o comportamento doentio, através dos testes de campo aberto, ingestão alimentar e nado forçado, em animais que receberam tratamento com endocanabinoides: AM251 (antagonista do receptor CB1), WIN55,212 (Agonista de canabinoide) ou VDM (inibidor da recaptação de endocanabinoide), antes da administração de LPS ou salina;
- c) Parte 2: Avaliar as alterações comportamentais durante o comportamento doentio, através dos testes de campo aberto, ingestão alimentar, nado forçado e interação social, em animais que receberam tratamento com sulfeto de sódio (Na<sub>2</sub>S - doador de H<sub>2</sub>S) ou aminooxiacetato (AOA, inibidor de CBS), antes da administração de LPS ou salina;
- d) Avaliar a influência do pré-tratamento com Na<sub>2</sub>S ou AOA sobre a concentração de citocinas plasmáticas durante a endotoxemia;
- e) Realizar o teste de *Western Blotting* para quantificar a expressão de GFAP no córtex pré-frontal de animais pré-tratados com Na<sub>2</sub>S ou AOA, durante a endotoxemia.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nos tópicos a seguir será explicitada a metodologia e a análise estatística que foram utilizadas durante a realização deste trabalho.

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos adultos machos da linhagem *Wistar*, com massa corporal variando entre 250 e 300g (7-8 semanas), provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas-MG. Os animais tiveram livre acesso à água e alimento (ração peletizada normoproteica) e foram mantidos à temperatura de  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  em caixas de polipropileno, em fotoperíodo definido de 12 horas, com as luzes acesas às 07:00 (COSTA *et al.*, 2013).

Os experimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes Brasileiras para a Experimentação Animal definidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal e os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas -UNIFAL, inscrito sob os protocolos 30/2016 e 40/2018.

#### 3.2 DROGAS

- a) Lipopolissacarídeo proveniente de *Escherichia coli* (sorotipo 026: B6 – Sigma Aldrich, USA), aplicado intraperitonealmente (i.p.) em dose única e diluído em salina fisiológica 0,9%;
- b) AM251 (Antagonista de CB1), WIN55,212 (Agonista de canabinoide), VDM (Inibidor da recaptação de endocanabinoide) diluídos em solução contendo DMSO+Tween20+Salina (na proporção 1:1:8), aplicados intracerebroventricularmente (i.c.v.) em dose única;
- c) Na<sub>2</sub>S (Doador de H<sub>2</sub>S) e AOA (aminoxiacetato, inibidor de CBS) aplicados intracerebroventricularmente (i.c.v.), diluídos em salina fisiológica 0,9%;
- d) Pentabiótico (Fort Dodge Saúde Animal LTDA), Cetoprofeno, Tribromoetanol (TBE-Sigma) e soro fisiológico 0,9% (Isotarma).

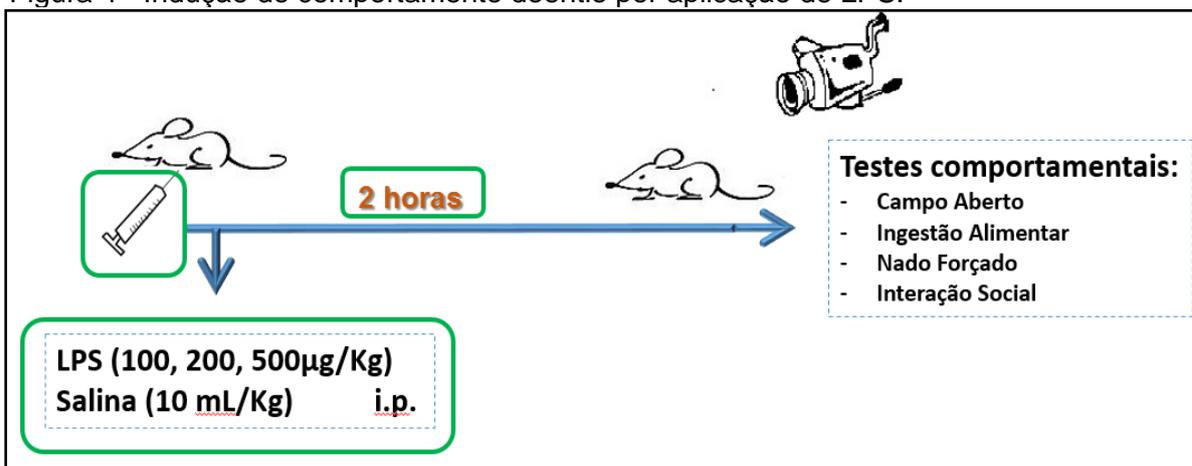
### 3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Descreveremos a seguir, os protocolos experimentais utilizados em nosso estudo.

#### 3.3.1 Indução do comportamento doentio por aplicação de LPS

A fim de determinar a dose de aplicação de LPS mais conveniente para verificar seus efeitos sobre o comportamento doentio, foram utilizadas as doses de 100, 200 e 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (026: B6 – Sigma Aldrich, USA) e os animais foram submetidos a testes comportamentais 2 horas após a aplicação (NÖLDER; SCHÖTZ, 2007). A administração do LPS ou salina foi realizada por via intraperitoneal e em dose única (Figura 4).

Figura 4 - Indução do comportamento doentio por aplicação de LPS.



Fonte: da autora.

#### 3.3.2 Estereotaxia, pré-tratamento i.c.v. e tratamento i.p.: Parte 1 e Parte 2

Na Parte 1, para averiguar a participação do sistema endocanabinoide sobre o comportamento doentio induzido por LPS, os animais passaram pelo processo cirúrgico de estereotaxia e após sete dias, receberam 15 minutos antes da aplicação intraperitoneal de LPS ou salina, injeção intracerebroventricular de veículo ou antagonista de CB1 (AM251) ou agonista de CB (WIN55,212) ou inibidor da

recaptação de endocanabinoide (VDM). Composto dessa forma os seguintes grupos (Quadro 1):

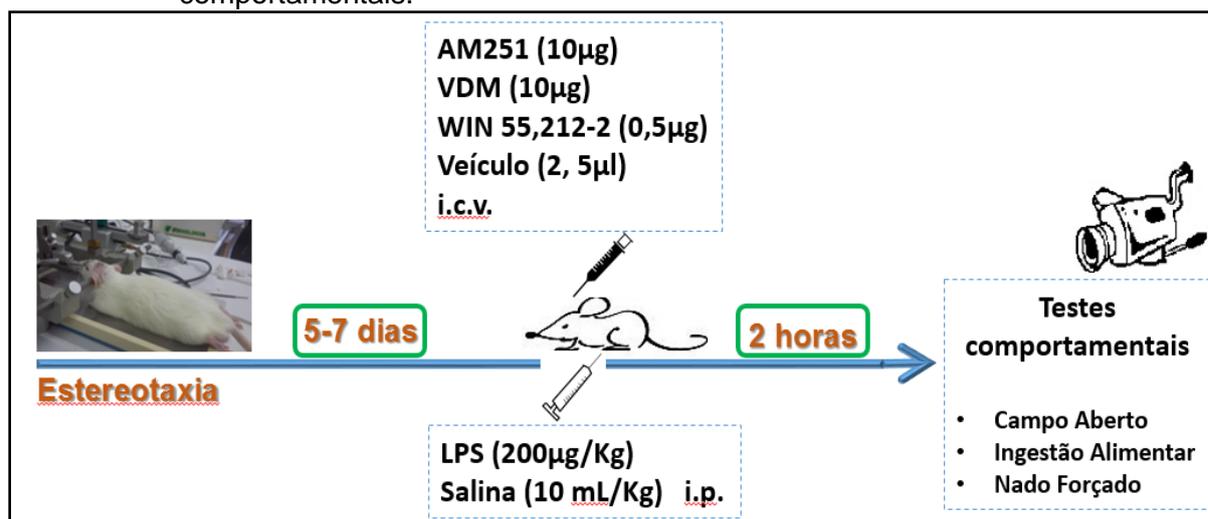
Quadro 1- Grupos experimentais (sistema endocanabinoide/ desafio imunológico com LPS).

Pré-tratamento (i.c.v.)	Tratamento (i.p.)
Veículo	Salina
Veículo	LPS
AM251	Salina
AM251	LPS
VDM	Salina
VDM	LPS
WIN55,212-2	Salina
WIN55,212-2	LPS

Fonte: da autora.

É importante salientar que estes animais foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: Campo Aberto, Ingestão Alimentar e Nado Forçado, 2 horas após a aplicação de LPS ou salina (Figura 5).

Figura 5 - Parte 1 - injeção i.c.v. e i.p. nos animais, para realização dos testes comportamentais.



Fonte: da autora.

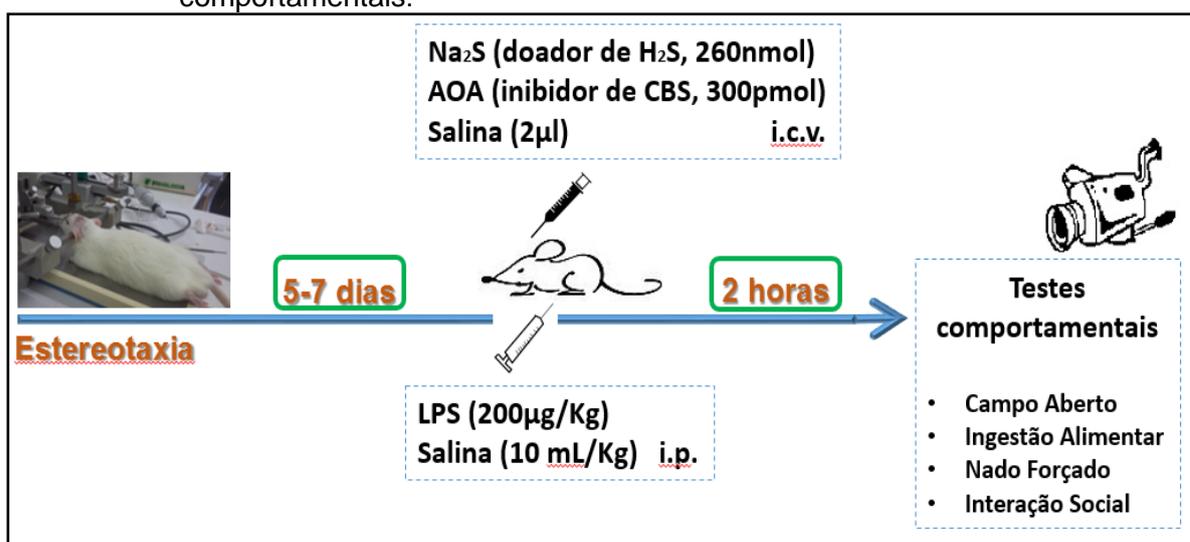
Na Parte 2, a fim de verificar a influência do sulfeto de hidrogênio sobre o comportamento doentio induzido por LPS, os animais também passaram pelo processo cirúrgico de estereotaxia e passados sete dias, receberam antes da aplicação i.p. de LPS ou veículo, injeção intracerebroventricular de veículo ou Na<sub>2</sub>S (doador de H<sub>2</sub>S) ou AOA (antagonista de CBS) (KWIATKOSKI, *et al.*, 2013). Estes animais foram submetidos aos seguintes testes comportamentais, 2 horas após a administração de LPS ou veículo: Campo aberto, Interação Social, Nado forçado e Ingestão alimentar (Figura 6). Compondo dessa forma, os seguintes grupos experimentais (Quadro 2):

Quadro 2- Grupos experimentais (sulfeto de hidrogênio/ desafio imunológico com LPS).

Pré-tratamento (i.c.v.)	Tratamento (i.p.)
Veículo	Salina
Veículo	LPS
Na <sub>2</sub> S	Salina
Na <sub>2</sub> S	LPS
AOA	Salina
AOA	LPS

Fonte: da autora.

Figura 6 - Parte 2 - injeção i.c.v. e i.p. nos animais, para realização dos testes comportamentais.

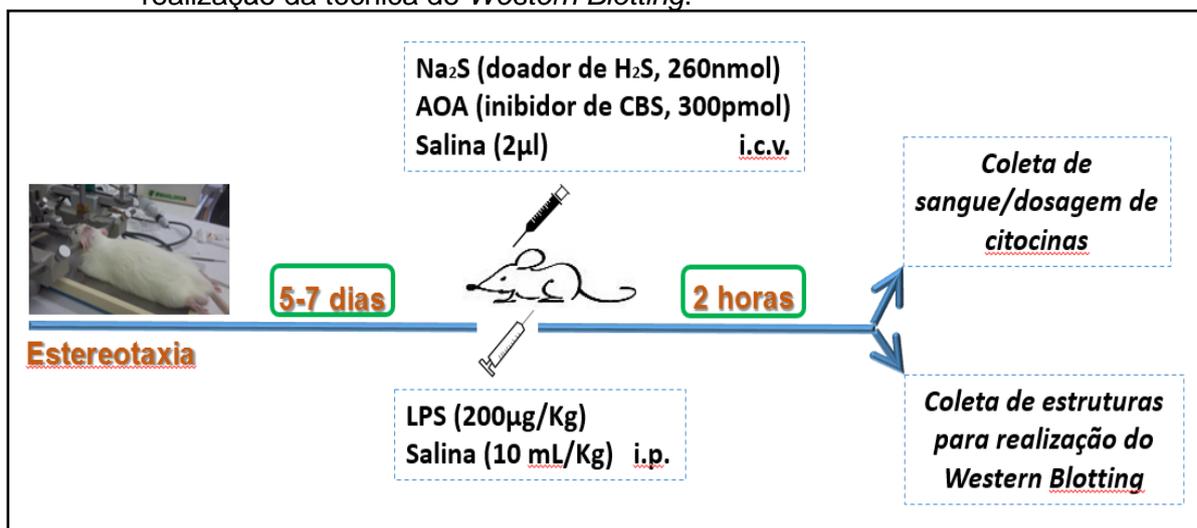


Fonte: da autora.

### 3.3.3 Dosagem de citocinas e *Western Blotting*

Ainda na Parte 2, com a finalidade de verificar a participação do sulfeto de hidrogênio durante a endotoxemia induzida por LPS, os animais passaram pelo processo cirúrgico de estereotaxia e após sete dias, receberam antes da aplicação i.p. de LPS ou salina, injeção intracerebroventricular de veículo ou Na<sub>2</sub>S (doador de H<sub>2</sub>S) ou AOA (antagonista de CBS). Após duas horas da aplicação do lipopolissacarídeo, coletamos o sangue destes animais para dosagem de citocinas plasmáticas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e o córtex pré-frontal, a fim de quantificar a expressão de GFAP (figura 7).

Figura 7 - Parte 2 - injeção i.c.v. e i.p. nos animais, para posterior dosagem de citocinas e realização da técnica de *Western Blotting*.



Fonte: da autora.

## 3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

A seguir, serão descritos os procedimentos experimentais que foram realizados neste estudo.

### 3.4.1 Dose e horário de aplicação de LPS

Para determinar a melhor dose para aplicação de LPS, a fim de verificar seus efeitos sobre o comportamento doentio, foram utilizadas as doses de 100, 200 e 500 µg/Kg de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (026: B6 – Sigma Aldrich, USA) e os animais foram submetidos a testes comportamentais 2 horas após a aplicação. A administração do LPS ou do veículo foi realizada por via intraperitoneal, em dose única, compondo dessa forma 4 grupos experimentais (Quadro 3):

Quadro 3- Dose e horário de aplicação de LPS.

<b>Tratamento (i.p.)</b>
Salina
LPS 100 µg/Kg
LPS 200 µg/Kg
LPS 500 µg/Kg

Fonte: da autora.

### 3.4.2 Estereotaxia

Antes do início da cirurgia foi administrado nos animais 0,02 mL de antibiótico veterinário (Pentabiótico) por via intramuscular e 0,1mL de anti-inflamatório (Cetoprofeno) por via subcutânea. Feito isso, os ratos foram anestesiados com tribromoetanol e a fim de permitir o acesso e canulação do ventrículo lateral, sua cabeça foi imobilizada por meio da fixação em três pontos, mandíbula e orifícios auditivos direito e esquerdo. Uma incisão de aproximadamente 1,5 cm foi feita no tecido epitelial e subcutâneo, possibilitando assim, o acesso à abóboda craniana.

Adotamos o bregma (ponto onde a sutura sagital encontra perpendicularmente a sutura coronal) como referência para acesso ao ventrículo lateral. A superfície craniana foi limpa com água oxigenada 10% (v/v), permitindo dessa forma maior nitidez ao ponto de encontro das suturas.

O acesso ao ventrículo lateral foi permitido usando as coordenadas presentes no atlas “The Rat Brain”, de Paxino e Watson (1998): -0,5 mm posterior, -1,5 mm lateral e -3,6 mm ventral, tendo como ponto zero o bregma.

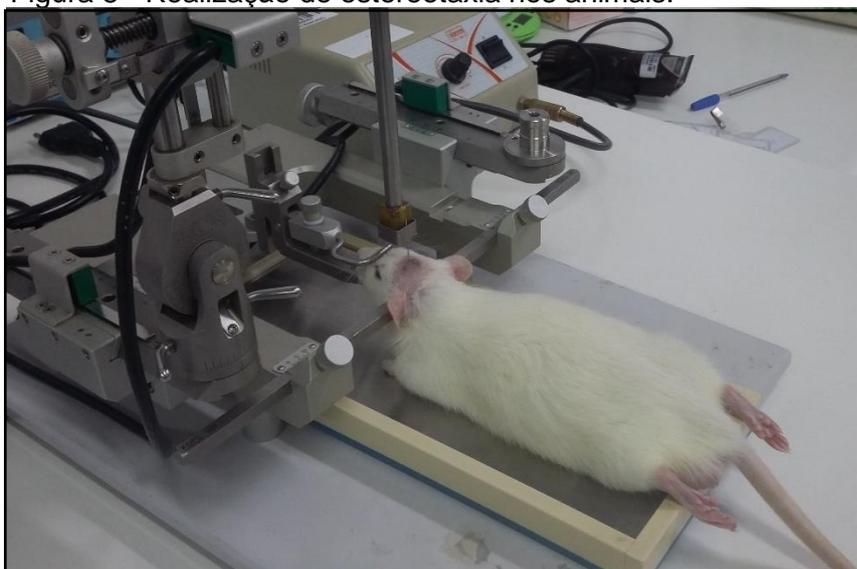
Para fixação da cânula (10 mm) e fechamento da incisão foi utilizado acrílico odontológico polimerizável, o qual é capaz de formar uma espécie de capacete no local.

A fim de evitar que o capacete de acrílico se descole do crânio do animal, dois parafusos de 5 mm foram fixados nos ossos parietais direito e esquerdo, os quais serviram como suporte.

Após a cirurgia, os animais foram alocados individualmente em caixas de acrílico de formato retangular (30cm x 19,5cm x 12cm), onde permaneceram durante 7 dias permitindo sua recuperação do procedimento cirúrgico.

Ao final dos experimentos foi verificado o posicionamento correto da cânula através da infusão de 5 $\mu$ L do corante azul de Evans (2%), ou seja, a visualização do corante no terceiro ventrículo sinalizou que o procedimento foi realizado da forma correta.

Figura 8 - Realização de estereotaxia nos animais.



Fonte: da autora.

Figura 9- Estereotaxia-posição da cânula demonstrada no monitor.



Fonte: da autora.

Figura 10 - Passo a passo da cirurgia de estereotaxia.



Fonte: da autora.

### 3.4.3 Dosagem de citocinas

Os animais foram anestesiados com TBE (250 mg/kg; 0,1mL/g) e o sangue coletado por decapitação, foi submetido à centrifugação por um período de 15

minutos a 3500 rpm, a fim de obter o plasma para posterior dosagem das citocinas pró-inflamatórias: fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), usando o kit ELISA (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), de acordo com os protocolos recomendados pelo fabricante.

#### 3.4.4 *Western Blotting*

Utilizamos a técnica de *Western Blotting* para avaliar a expressão de GFAP no córtex pré-frontal dos animais. Os roedores foram mortos por decapitação, e imediatamente depois, o córtex pré-frontal foi dissecado e armazenado em -80°C até o momento da realização do teste de Bradford.

Para a realização do teste de Bradford as amostras foram homogeneizadas em tampão de lise com um coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (9200 rpm, 15 minutos, 4°C) e a concentração de proteínas no sobrenadante foi quantificada pelo teste de Bradford. As amostras contendo o tampão de lise juntamente com *Laemmli* foram fervidas e submetidas a análise de *Western blotting*. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE a 12% (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio) e em seguida transferidas para membranas de nitrocelulose com um sistema eletroforético semi-seco (Bio-Rad, Hercules, CA). A membrana foi lavada 3 vezes em PBS contendo 0,05% de Tween 20, bloqueada com 5% de leite desnatado em PBS durante 2 horas à temperatura ambiente e depois incubadas *overnight*, a 4 ° C com um anticorpo anti-GFAP (1:1000, Santa Cruz-sc 33673).

No dia seguinte, após 3 lavagens em PBS contendo 0,05% de Tween 20, as membranas foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com anticorpo secundário específico (1:2000, Abcam-ab 6789).

Após o período de incubação, a membrana foi lavada 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05% e aplicou-se um kit de detecção comercial durante aproximadamente 1 a 2 minutos (kit de deteco ECL, Bio-Rad, Hercules, CA). As imagens de análise foram capturadas por analisador de imagem por quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA). Posteriormente, as membranas passaram pelo processo de *stripping* seguido do bloqueio em 5% de leite desnatado em PBS durante 2 horas.

Depois do bloqueio as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05%, seguida da incubação *overnight*, a 4 ° C com anticorpo anti-actina (1:5000, Sigma Aldrich 4700). No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05%, e as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário (1:2000, Abcam-ab 6789). Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05%, em seguida aplicou-se um kit de detecção comercial durante aproximadamente 1 a 2 minutos (kit de deteco ECL, Bio-Rad, Hercules, CA).

As imagens de análise foram capturadas por analisador de imagem por quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA) e as intensidades de banda foram quantificadas utilizando um software específico da Bio-Rad. A intensidade de cada banda foi expressa em relação à da  $\beta$ -actina e os dados expressos foram normalizados para o controle.

### 3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

A seguir, serão descritos os testes comportamentais que foram realizados neste estudo.

#### 3.5.1 Campo aberto

A avaliação deste teste permitiu verificar a atividade locomotora em roedores. O rato foi colocado no centro de um aparato circular de fundo preto (com 60 cm de diâmetro e paredes com altura de 60 cm) e o registro do teste foi realizado através de filmagem durante 5 minutos. A análise foi realizada através do software *Ethovision XT 9.0* (um sistema de observação computadorizado, capaz de realizar rastreamento, análise e reconhecimento comportamental), onde analisou-se a distância percorrida pelo animal na arena e seu tempo de imobilidade (NOLDUS; SPINK; TEGELENBOSCH, 2001).

Figura 11- Campo Aberto.



Fonte: da autora.

### 3.5.2 Interação social

O teste de interação social consistiu no confronto entre o animal a ser testado (animal residente) e um indivíduo da mesma espécie que tinha, idade e peso inferior ao testado – no mínimo 100g a menos (animal intruso). Para tanto, os animais foram colocados na arena de campo aberto quadrado e a interação entre residente e intruso foi registrada por uma câmera filmadora, durante 10 minutos. Para evitar que o comportamento exploratório atrapalhasse a exibição do comportamento de interação social, o animal residente foi ambientado à arena do campo aberto por 3 dias consecutivos, anteriores ao dia do teste, por um período de 10 minutos.

No dia do teste foi observado os seguintes comportamentos: exploração anogenital, se ele segue, imita ou monta no animal intruso (colocar as patas dianteiras sobre o animal intruso), parâmetros conhecidos como interação total. Os vídeos foram analisados e o tempo total de interação entre residente e intruso foi contabilizado (DER-AVAKIAN; MARKOU, 2014).

### 3.5.3 Ingestão alimentar

Anteriormente ao dia do teste os animais foram alocados em caixas individuais e tiveram livre acesso à água e comida. No dia do teste, antes de receber o tratamento, retirou-se a ração por 2 horas. Posteriormente à essa restrição alimentar, foi oferecida aos animais ração peletizada previamente pesada e o padrão de ingestão alimentar foi monitorado durante 24 horas, por meio de pesagem da ração nos tempos de 2, 4, 6 e 24 horas após sua reintrodução (RORATO *et al.*, 2012).

### 3.5.4 Nado Forçado

O teste do nado forçado é um modelo preditivo de parâmetros tipo depressivo, desenvolvido de acordo com o método descrito por Porsolt e colaboradores (1978). Utilizamos um cilindro de acrílico, com dimensões de 24 cm de diâmetro e 60 cm de altura, preenchido com água à 25°C - 28°C até a altura de 40 cm. O volume de água permitiu que o animal nadasse ou boiasse sem encostar as patas ou a cauda no fundo do recipiente. Um dia antes do teste, os animais foram colocados para nadar por 15 minutos e após a sessão de natação eles foram secos com toalhas e colocados sob uma lâmpada (32°C) durante 15-30 minutos. No dia do teste (24 horas após a ambientação), os ratos foram colocados no cilindro por 5 minutos e o comportamento foi registrado através de filmagem, analisamos o tempo de imobilidade, de nado e de escalada no aparato (KIRKEDAL *et al.*, 2017; PADOVAN; GUIMARÃES, 2004).

## 3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados utilizando o programa do software GraphPad versão 6.0 e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para a comparação dos efeitos das diferentes doses de LPS foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de *Tukey*. Nos demais experimentos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de *Tukey*. O nível de significância foi baseado em valores de  $p$  inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## **4 RESULTADOS**

A seguir serão descritos os resultados obtidos neste estudo.

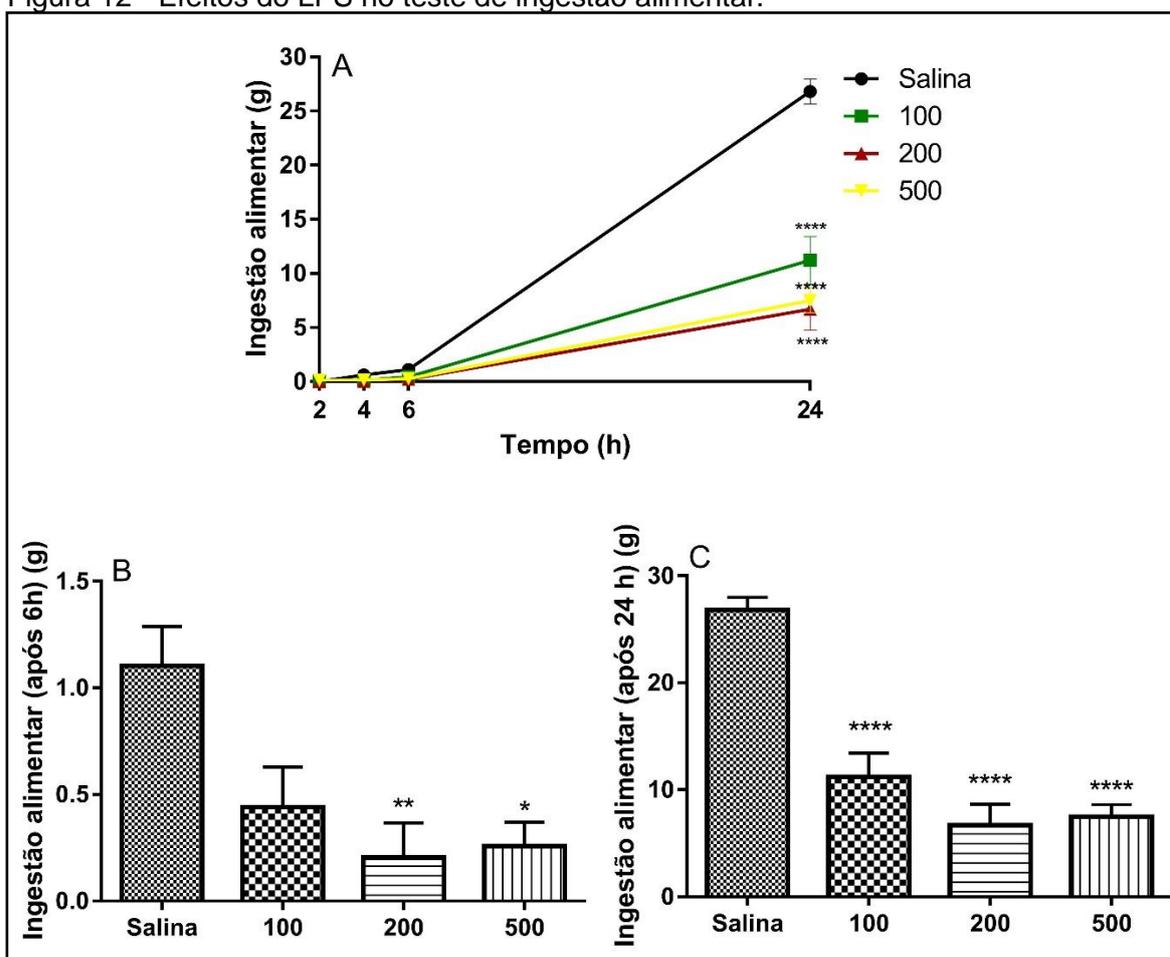
### **4.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LPS SOBRE O COMPORTAMENTO**

Descrevemos a seguir, os resultados obtidos através do tratamento dos animais com LPS.

#### **4.1.1 Ingestão alimentar**

Na figura 12, observamos que após 6 horas da injeção i.p. de LPS, os animais que receberam as doses de 200 e 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , apresentaram uma redução ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$  respectivamente) no parâmetro de ingestão alimentar em relação ao grupo controle. Essa redução ainda pôde ser observada, 24 horas após a aplicação i.p., em todas as doses testadas ( $p < 0,0001$ ) quando comparadas ao grupo salina (Anexo C - Tabela 1).

Figura 12 - Efeitos do LPS no teste de ingestão alimentar.



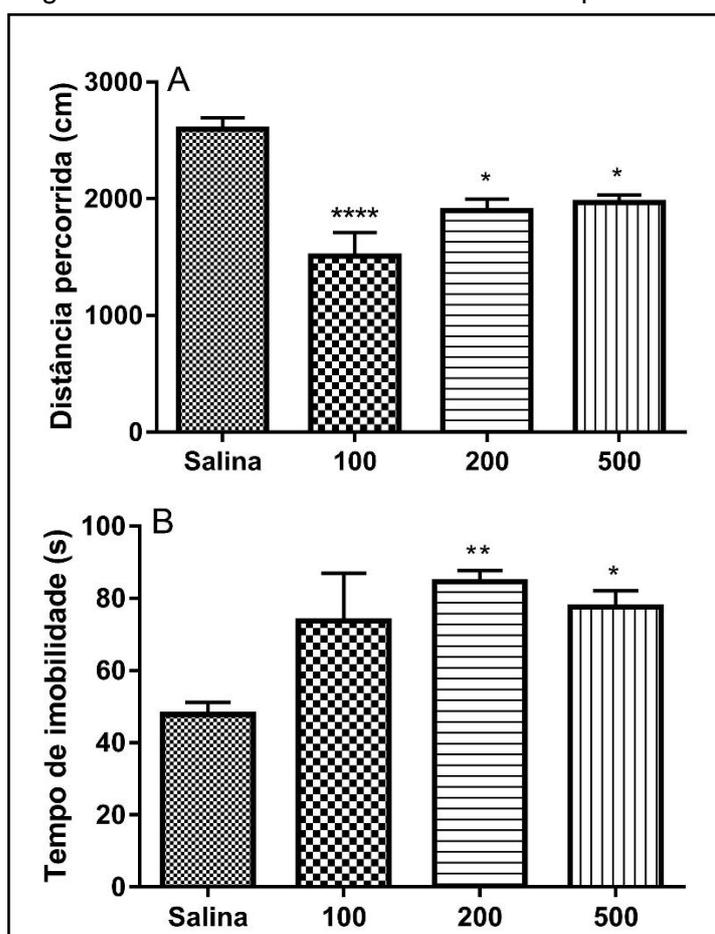
Fonte: da autora.

Nota: Ingestão alimentar nos tempos de 2, 4, 6 e 24 horas (A), Ingestão alimentar após 6 horas da administração de LPS (B) e Ingestão alimentar após 24 horas da administração de LPS (C). Resultados obtidos com ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 6 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados ao grupo salina.

#### 4.1.2 Campo Aberto

Como mostrado na figura 13, quando avaliados 2 horas após o tratamento, os animais que receberam as doses de 100, 200 e 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS apresentaram redução da distância percorrida no aparato ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$  respectivamente) e aumento do tempo de imobilidade, nas doses de 200 e 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$  respectivamente) quando comparados ao grupo que recebeu administração de i.p. de salina (Anexo C – Tabela 2).

Figura 13 - Efeitos do LPS no teste de campo aberto.



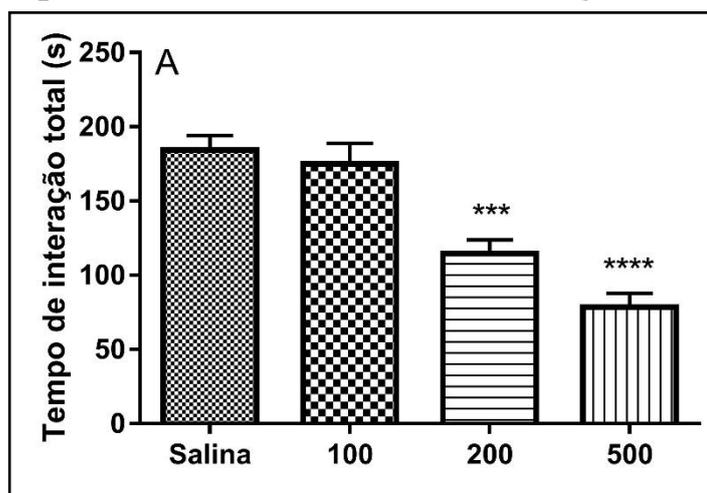
Fonte: da autora.

Nota: Distância percorrida (A) e Tempo de imobilidade (B) no teste de campo aberto 2 horas após a administração de LPS. Resultados obtidos com ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 11 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados ao grupo salina.

#### 4.1.3 Interação social

Como mostra a figura 14, quando os animais foram submetidos ao teste de interação social, observou-se uma diminuição do tempo de interação total, 2 horas após a aplicação de LPS nas doses de 200 ( $p < 0,01$ ) e 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  ( $p < 0,0001$ ), quando comparados aos animais do grupo controle (Anexo C – Tabela 3).

Figura 14 - Efeitos do LPS no teste de interação social.



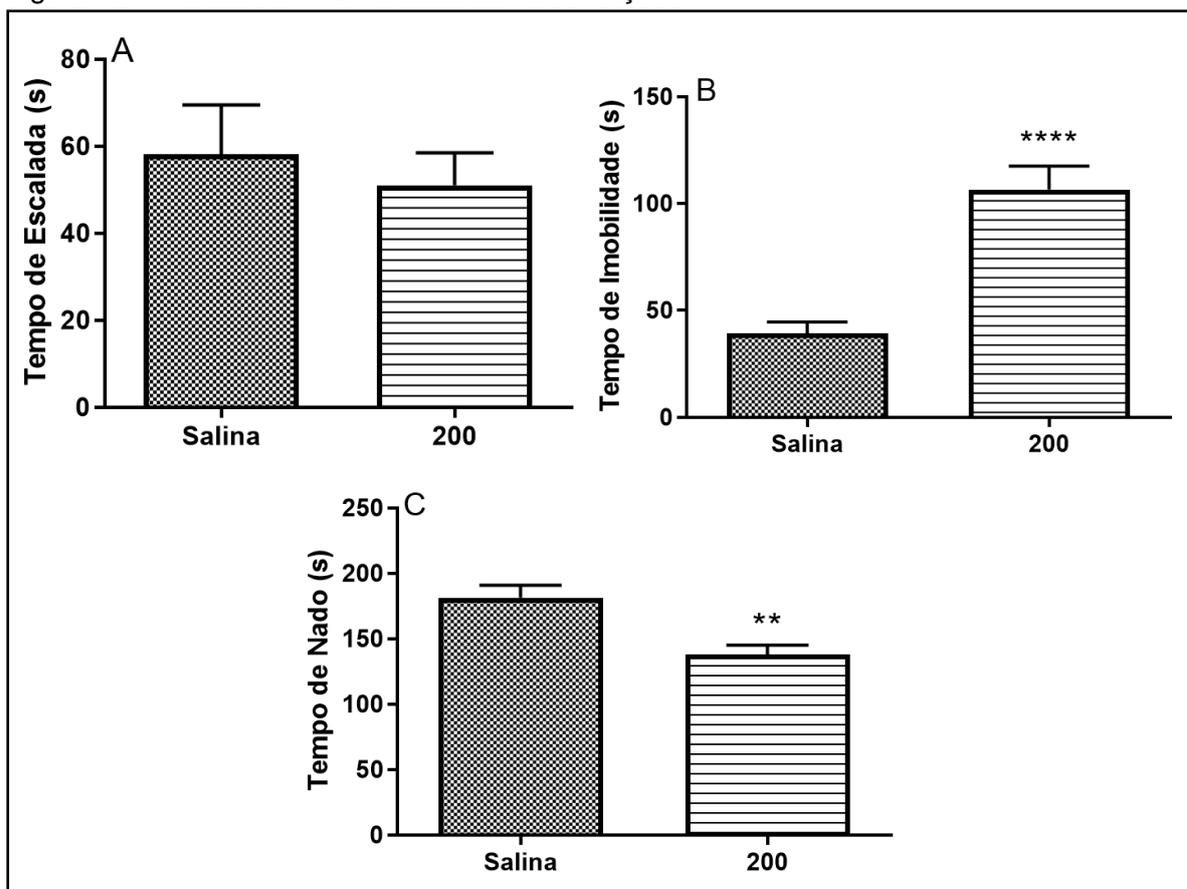
Fonte: da autora.

Nota: Tempo de interação total (A) no teste de interação social, realizado 2 horas após a administração de LPS. Resultados obtidos com ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 6 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados ao grupo salina.

#### 4.1.4 Nado Forçado

Como nossos resultados anteriores apontavam que na dose de 200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , já era possível observar alterações no comportamento dos animais, neste teste, avaliamos apenas esta dose a fim de confirmar nossos achados. Onde observamos, 2 horas após a injeção i.p. de LPS, um aumento do tempo de imobilidade ( $p < 0,0001$ ) e uma redução do tempo de nado ( $p < 0,01$ ) quando comparamos com os animais do grupo tratado com salina (Figura 15) (Anexo C- Tabela 4).

Figura 15 - Efeitos do LPS no teste de nado forçado.



Fonte: da autora.

Nota: Tempo de Escalada (A), Tempo de Imobilidade (B) e Tempo de Nado (C) no teste de nado forçado realizado 2 horas após a administração de LPS. Resultados obtidos com teste t student's. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 8 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados ao grupo salina.

## 4.2 INFLUÊNCIA DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS À ENDOTOXEMIA

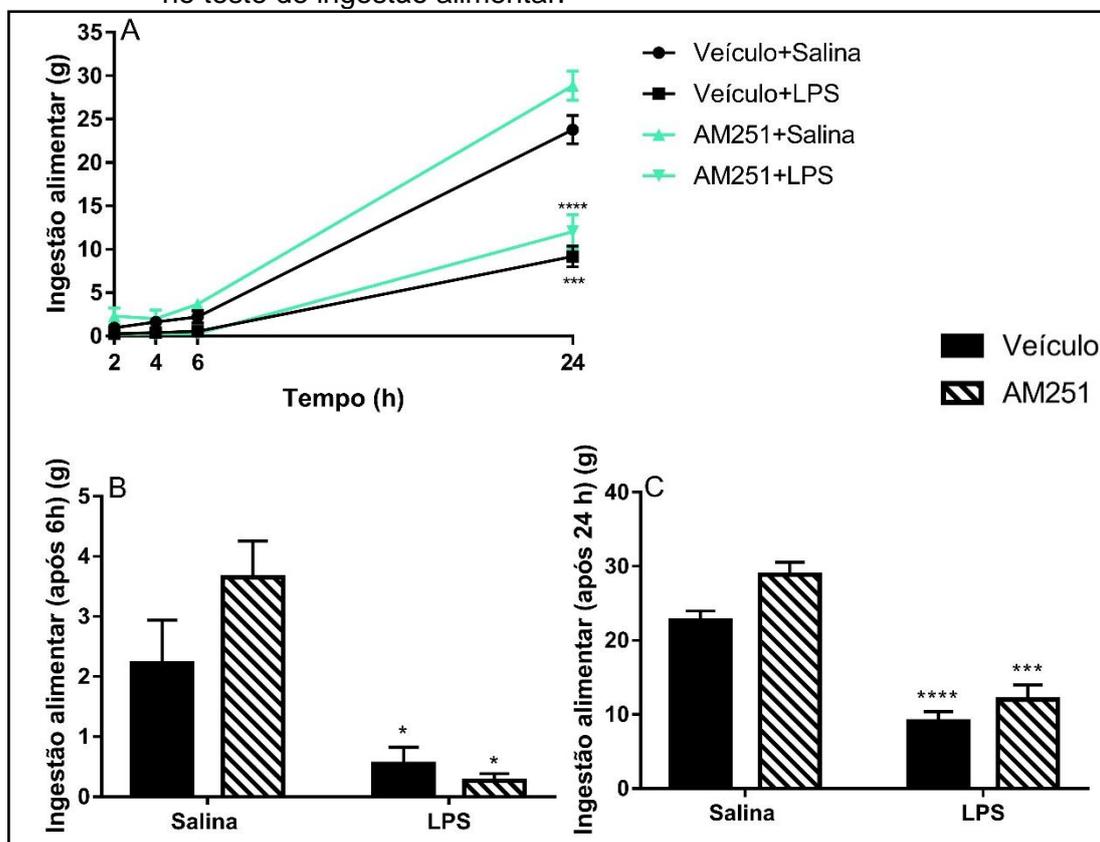
Os resultados obtidos através do pré-tratamento com AM251, VDM e WIN55,212-2, antes da aplicação i.p. de LPS, estão descritos a seguir.

### 4.2.1 Ingestão alimentar

Na figura 16, observamos que os animais que receberam LPS, apresentaram uma redução na ingestão alimentar em relação ao grupo controle, 6 horas ( $p < 0,05$ ) e 24 horas ( $p < 0,0001$ ) após sua aplicação. E essa redução também pôde ser observada nos animais pré-tratados com AM251, antes da injeção de LPS, nos

mesmos horários descritos acima ( $p < 0,05$  - 6 h,  $p < 0,001$  - 24 h) (Análise estatística - Tabela 5).

Figura 16 - Efeito do pré-tratamento com AM251 na endotoxemia induzida por LPS, no teste de ingestão alimentar.



Fonte: da autora.

Nota: Animais pré-tratados com AM251, antes da aplicação i.p. de LPS. Ingestão Alimentar (A), Ingestão alimentar após 6 horas do tratamento com LPS (B) e Ingestão alimentar após 24 horas do tratamento com LPS (C). Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n = 8-15$  animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados ao grupo controle.

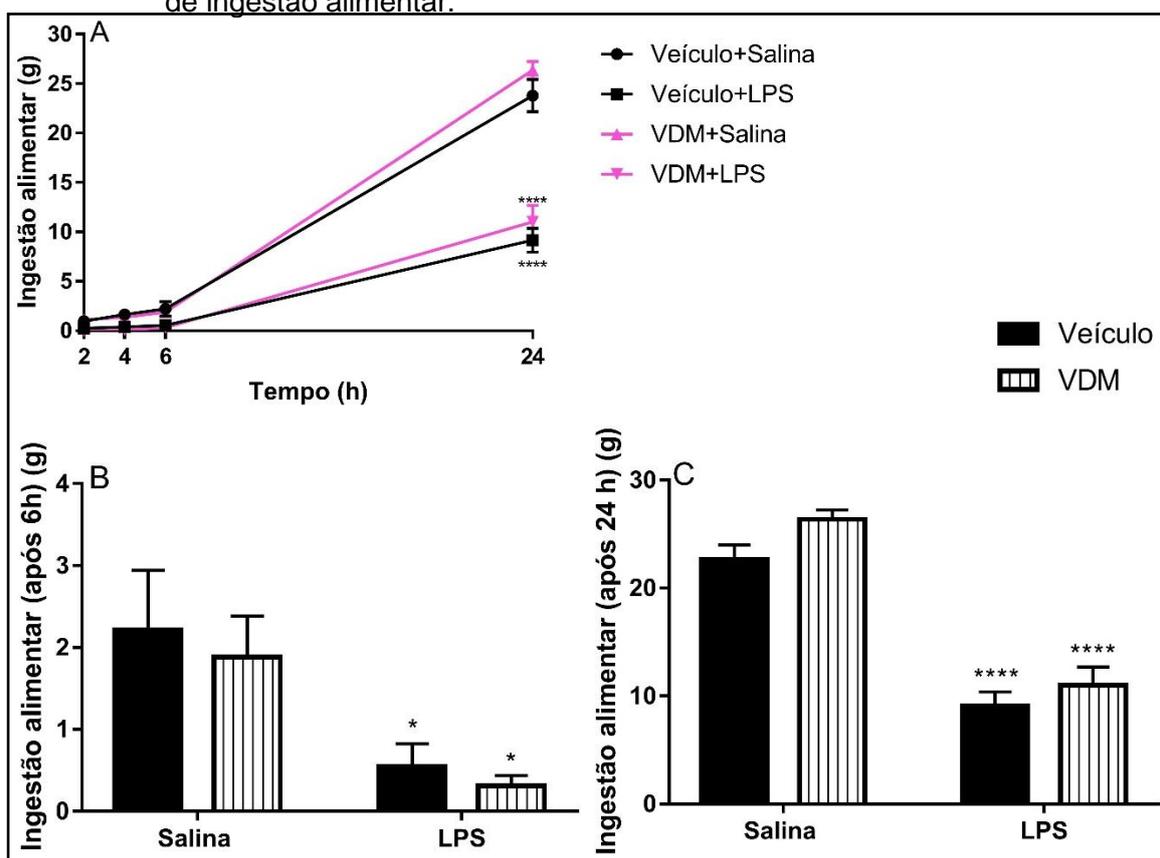
Tabela 5 - Análise de variância de duas vias no Teste de Ingestão Alimentar, em grupos pré-tratados com veículo ou AM251 (Pré-tratamento) e submetidos à injeção i.p. de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Parâmetros	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
<b>Ingestão Alimentar (g) 6 horas</b>	F(1,38) = 1,778 P = 0,1904	F(1,38) = 34,32 P < 0,0001	F(1,38) = 3,965 P = 0,0537
<b>Ingestão Alimentar (g) 24 horas</b>	F(1,38) = 7,109 P = 0,0114	F(1,38) = 78,91 P < 0,0001	F(1,38) = 0,897 P = 0,3499

Fonte: Da autora.

A figura 17 nos mostra que animais que receberam V+LPS e VDM+LPS, apresentaram uma redução na ingestão alimentar em relação ao grupo controle, após 6 horas ( $p < 0,05$  em ambos os grupos) e 24 horas ( $p < 0,0001$  para ambos) do desafio imunológico (Análise estatística - Tabela 6).

Figura 17 - Efeito do pré-tratamento com VDM na endotoxemia induzida por LPS, no teste de ingestão alimentar.



Fonte: da autora.

Nota: Animais pré-tratados com VDM, antes da aplicação i.p. de LPS. Ingestão Alimentar (A), Ingestão alimentar após 6 horas do tratamento com LPS (B) e Ingestão alimentar após 24 horas do tratamento com LPS (C). Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n = 8-15$  animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados ao grupo controle.

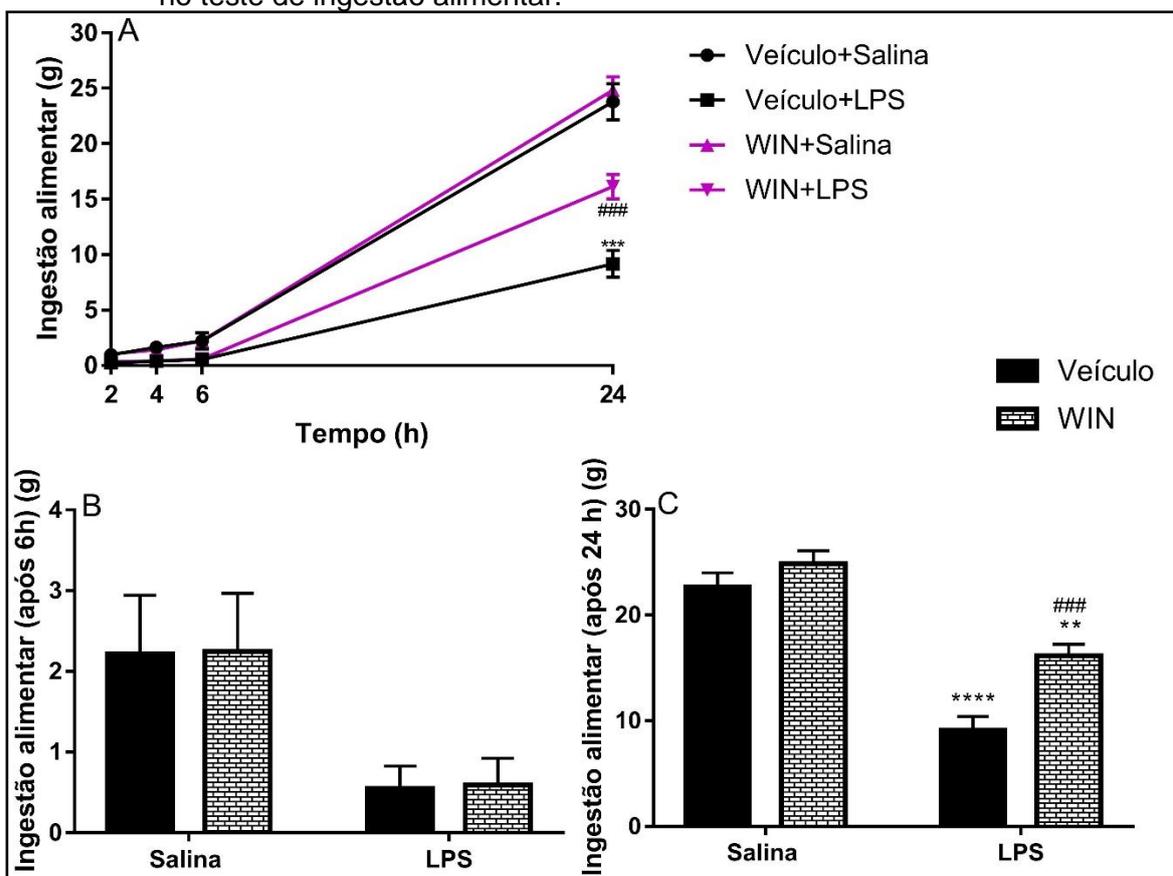
Tabela 6 - Análise de variância de duas vias no Teste de Ingestão Alimentar, em grupos pré- tratados com veículo ou VDM (Pré-tratamento) e submetidos à injeção i.p. de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

<b>Parâmetros</b>	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Desafio imunológico</b>	<b>Interação</b>
<b>Ingestão Alimentar (g) 6 horas</b>	F(1,38) = 0,4672 P = 0,4984	F(1,38) = 15,24 P = 0,0004	F(1,38) = 0,0123 P = 0,9123
<b>Ingestão Alimentar (g) 24 horas</b>	F(1,38) = 3,473 P = 0,0706	F(1,38) = 91,77 P < 0,0001	F(1,38) = 0,3377 P = 0,5648

Fonte: da autora.

Na figura 18, notamos que após 6 horas da aplicação de LPS, não observamos diferença significativa nos animais tratados com V+LPS e WIN+LPS em relação aos animais do grupo controle. Todavia, 24 horas após, o grupo V+LPS mostrou uma diminuição ( $p < 0,0001$ ) da ingestão alimentar em relação ao grupo tratado com veículo. Já, os animais tratados com WIN+LPS, foram capazes de reverter ( $p < 0,001$ ) a redução da ingestão alimentar induzida pela administração de LPS (Análise estatística - Tabela 7).

Figura 18 - Efeito do pré-tratamento com WIN55,212-2 na endotoxemia induzida por LPS, no teste de ingestão alimentar.



Fonte: da autora.

Nota: Animais pré-tratados com WIN55,212-2, antes da aplicação i.p. de LPS. Ingestão Alimentar (A), Ingestão alimentar após 6 horas do tratamento com LPS (B) e Ingestão alimentar após 24 horas do tratamento com LPS (C). Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 8-15 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados ao grupo controle, ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo V+LPS.

Tabela 7 - Análise de variância de duas vias no Teste de Ingestão Alimentar, em grupos pré- tratados com veículo ou WIN 55,212-2 (Pré-tratamento) e submetidos à injeção i.p. de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Parâmetros	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
<b>Ingestão Alimentar (g) 6 horas</b>	F(1,38) = 0,005708 P = 0,9402	F(1,38) = 11,54 P = 0,0015	F(1,38) = 0,000271 P = 0,9869
<b>Ingestão Alimentar (g) 24 horas</b>	F(1,38) = 12,34 P = 0,0012	F(1,38) = 71,98 P < 0,0001	F(1,38) = 3,43 P = 0,0722

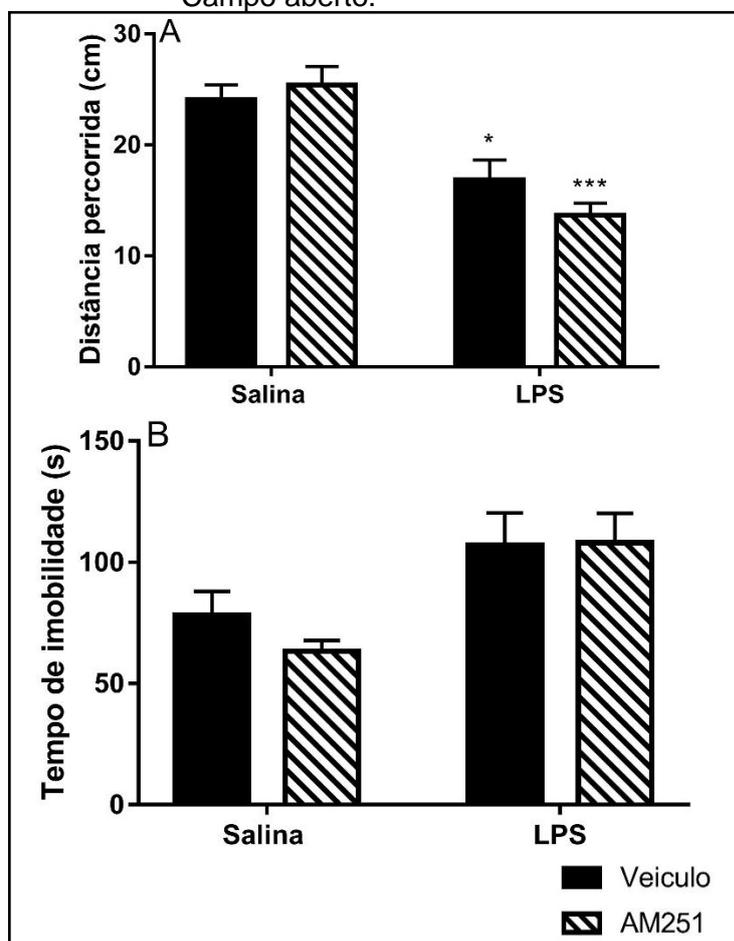
Fonte: da autora.

#### 4.2.2 Campo Aberto

Neste teste podemos observar que passadas duas horas da injeção i.p. de LPS, os animais apresentaram redução na distância percorrida no aparato ( $p < 0,05$ ), quando comparados ao controle (Figura 19A, 20A, 21A) e essa redução também foi observada nos animais que receberam AM251+LPS ( $p < 0,001$ ) (Análise estatística - Tabela 8).

Os grupos VDM+LPS e WIN+LPS não apresentaram diferença significativa no parâmetro atividade locomotora em relação aos seus controles e quanto ao tempo de imobilidade, não observamos alterações nos grupos testados quando comparados ao grupo veículo+salina (Figura 19B, 20B, 21C) (Análise estatística - Tabela 9 e 10).

Figura 19 - Efeito do pré-tratamento com AM251 na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Campo aberto.



Fonte: da autora.

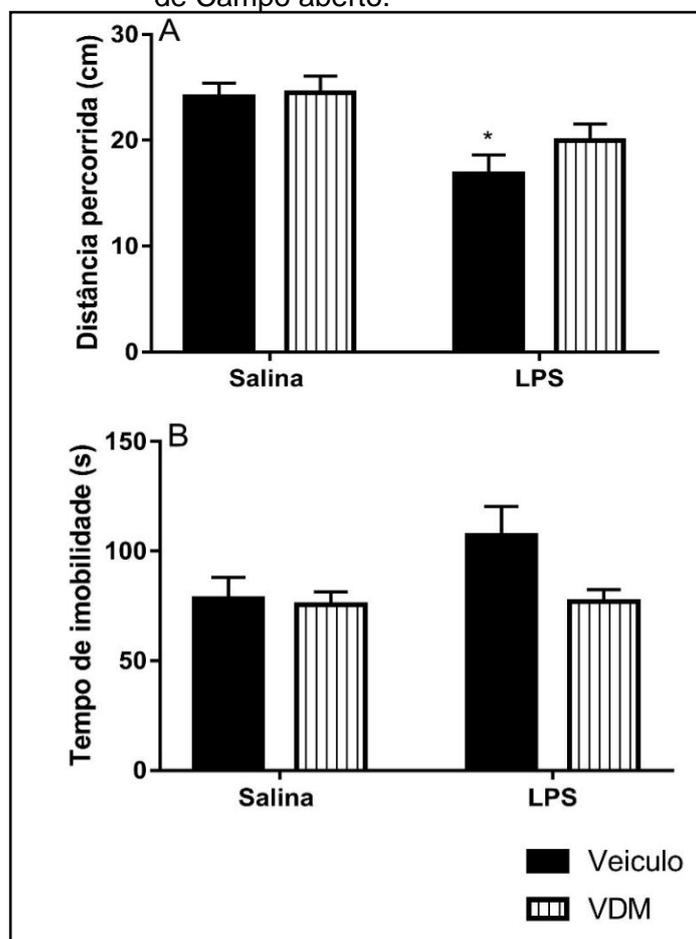
Nota: Animais pré-tratados com AM251, antes da aplicação i.p. de LPS. Distância percorrida (A) e Tempo de imobilidade (B) no teste de campo aberto. Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 8-15 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , comparados ao grupo salina.

Tabela 8 - Análise de variância de duas vias no Teste de Campo Aberto, em grupos pré-tratados com veículo ou AM251 (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Parâmetros	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
<b>Distância percorrida</b>	F(1,37) = 0,3324 P = 0,5677	F(1,37) = 32,88 P < 0,0001	F(1,37) = 1,817 P = 0,1859
<b>Tempo de imobilidade</b>	F(1,37) = 0,3107 P = 0,5806	F(1,37) = 8,516 P = 0,0060	F(1,37) = 0,4045 P = 0,5287

Fonte: Da autora.

Figura 20- Efeito do pré-tratamento com VDM na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Campo aberto.



Fonte: da autora.

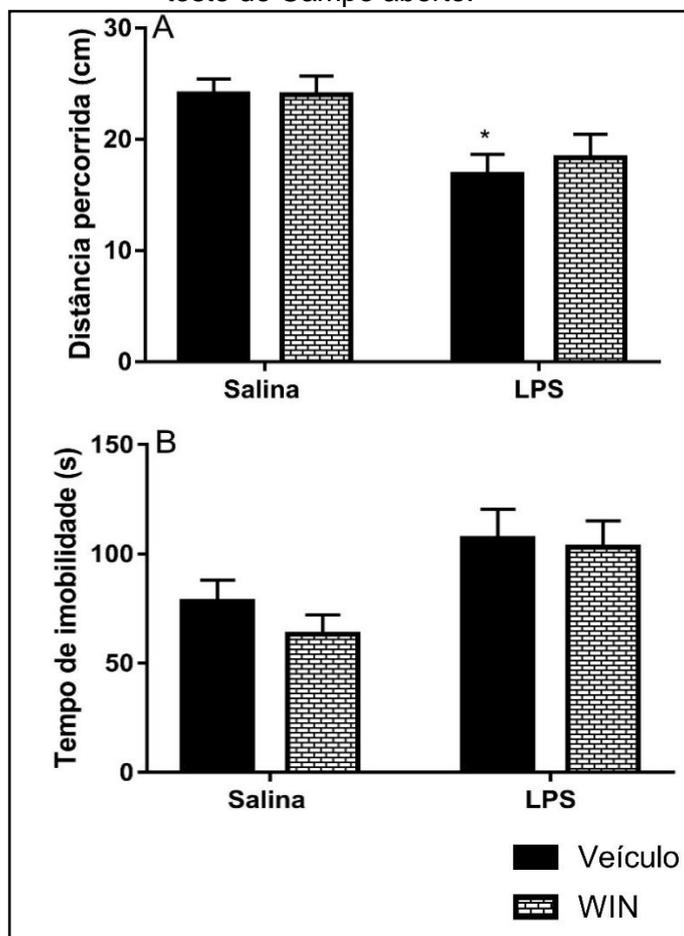
Nota: Animais pré-tratados com VDM, antes da aplicação i.p. de LPS. Distância percorrida (A) e Tempo de imobilidade (B) no teste de campo aberto. Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 8-15 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$ , comparados ao grupo salina.

Tabela 9 - Análise de variância de duas vias no Teste de Campo Aberto, em grupos pré-tratados com veículo ou VDM (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Parâmetros	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
<b>Distância percorrida</b>	F(1,36) = 0,9863 P = 0,3273	F(1,36) = 11,09 P = 0,0020	F(1,36) = 0,6052 P = 0,4417
<b>Tempo de imobilidade</b>	F(1,36) = 2,073 P = 0,1586	F(1,36) = 1,767 P = 0,1922	F(1,36) = 1,471 P = 0,2331

Fonte: Da autora.

Figura 21 - Efeito do pré-tratamento com WIN55,212-2 na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Campo aberto.



Fonte: da autora.

Nota: Animais pré-tratados com WIN55,212-2, antes da aplicação i.p. de LPS. Distância percorrida (A) e Tempo de imobilidade (B) no teste de campo aberto. Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 8-15 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$ , comparados ao grupo salina.

Tabela 10 - Análise de variância de duas vias no Teste de Campo Aberto, em grupos pré-tratados com veículo ou WIN 55,212-2 (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

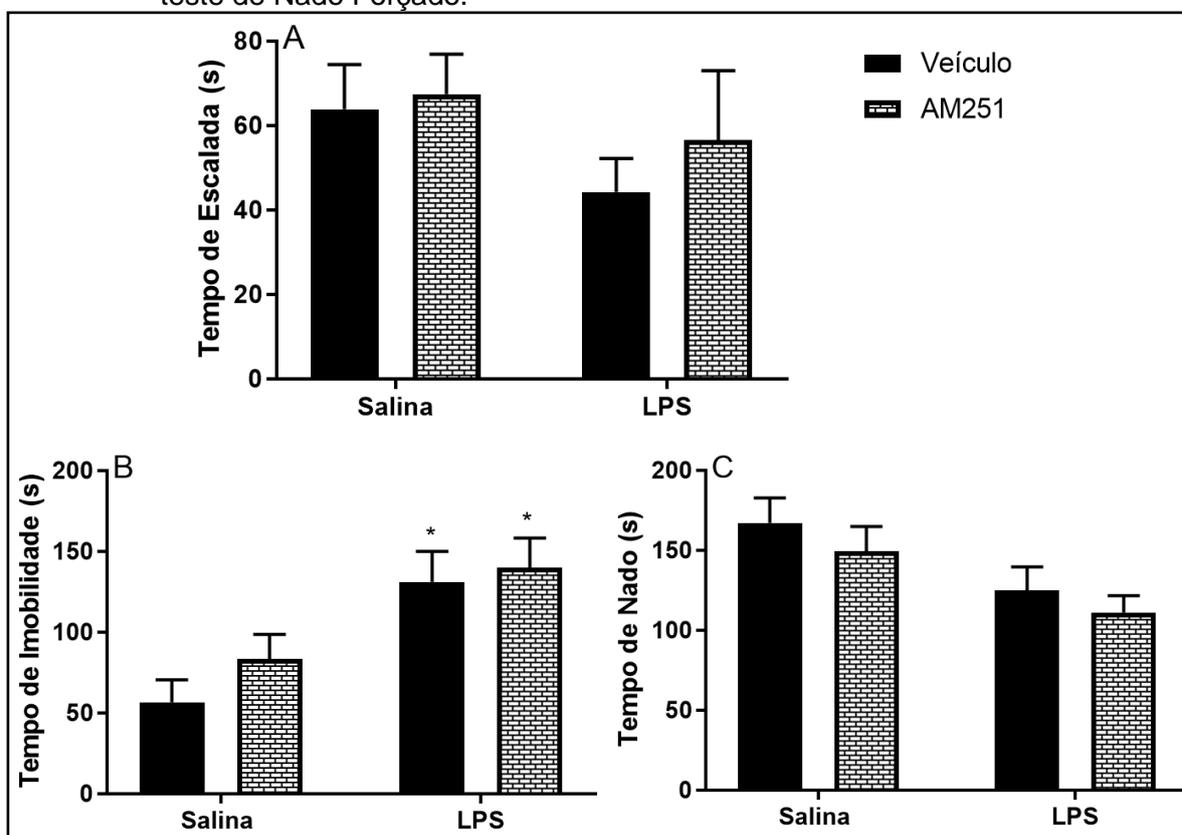
Parâmetros	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
<b>Distância percorrida</b>	F(1,38) = 0,1397 P = 0,7106	F(1,38) = 11,56 P = 0,0016	F(1,38) = 0,1637 P = 0,6880
<b>Tempo de imobilidade</b>	F(1,38) = 0,5834 P = 0,4497	F(1,38) = 7,445 P = 0,0096	F(1,38) = 0,1944 P = 0,6618

Fonte: Da autora.

### 4.2.3 Nado Forçado

O LPS administrado em conjunto com o veículo, promoveu o aumento ( $p < 0,05$ ) do tempo que o animal permaneceu imóvel no teste de Nado forçado, quando comparados aos seus respectivos grupos controle, como é possível observar nas figuras 22B, 23B e 24B. O grupo tratado com AM251 (Figura 22B), por sua vez, não foi capaz de alterar esse aumento da imobilidade induzido pelo LPS ( $p < 0,05$ ). Já os animais tratados com VDM e WIN55,212-2, não apresentaram alterações significativas nos parâmetros analisados (Análise estatística - Tabela 11, 12, 13).

Figura 22 - Efeito do pré-tratamento com AM251 na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Nado Forçado.



Fonte: da autora.

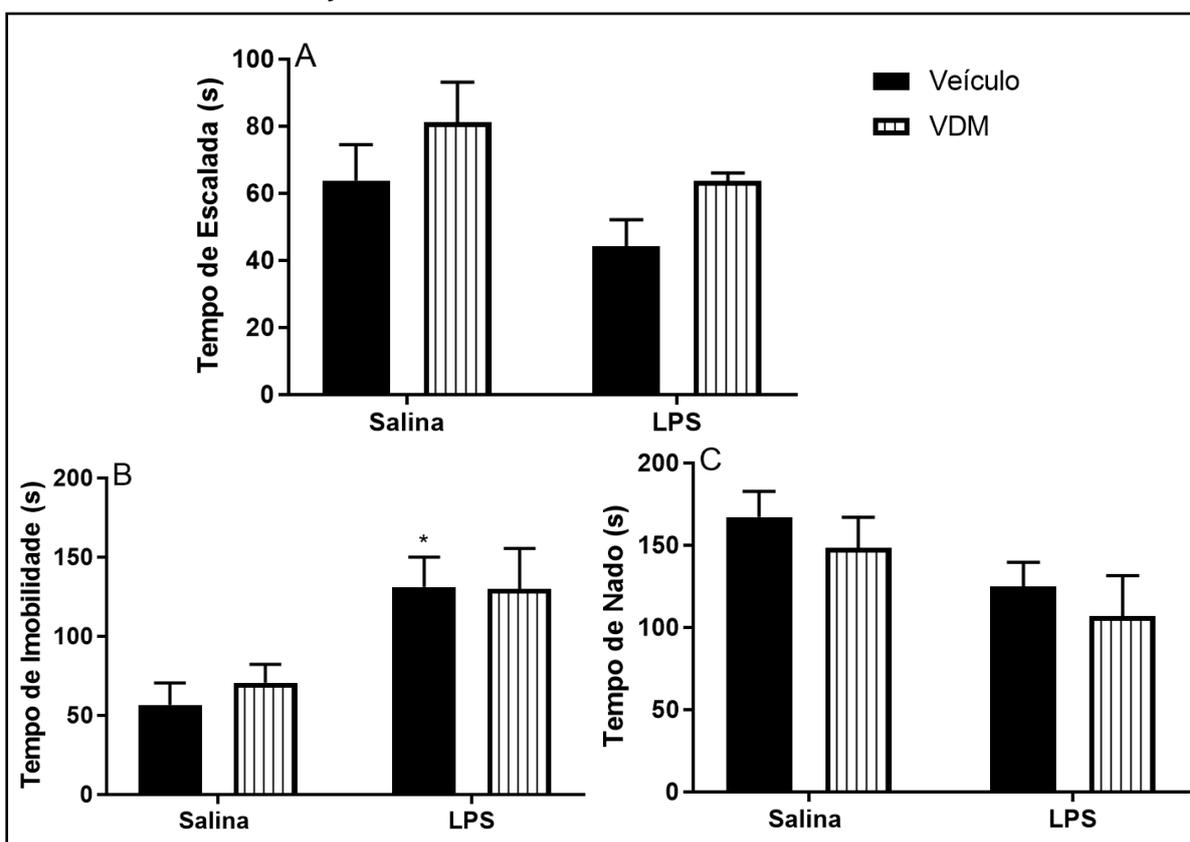
Nota: Animais pré-tratados com AM251, antes da aplicação i.p. de LPS. Tempo de Escalada (A), Tempo de Imobilidade (B) e Tempo de Nado (C) no teste de nado forçado. Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n = 4-5$  animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$  comparados ao grupo controle.

Tabela 11 - Análise de variância de duas vias no Teste de Nado Forçado, em grupos pré-tratados com veículo ou AM251 (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Parâmetros	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
<b>Tempo de Imobilidade</b>	F(1,15) = 1,085 P = 0,3152	F(1,15) = 14,62 P = 0,0019	F(1,15) = 0,2813 P = 0,6041
<b>Tempo de Escalada</b>	F(1,15) = 0,5193 P = 0,4822	F(1,15) = 1,911 P = 0,1871	F(1,15) = 0,1555 P = 0,6989
<b>Tempo de Nado</b>	F(1,15) = 1,002 P = 0,3339	F(1,15) = 6,484 P = 0,0233	F(1,15) = 0,001605 P = 0,9010

Fonte: Da autora.

Figura 23 - Efeito do pré-tratamento com VDM na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Nado Forçado.



Fonte: da autora.

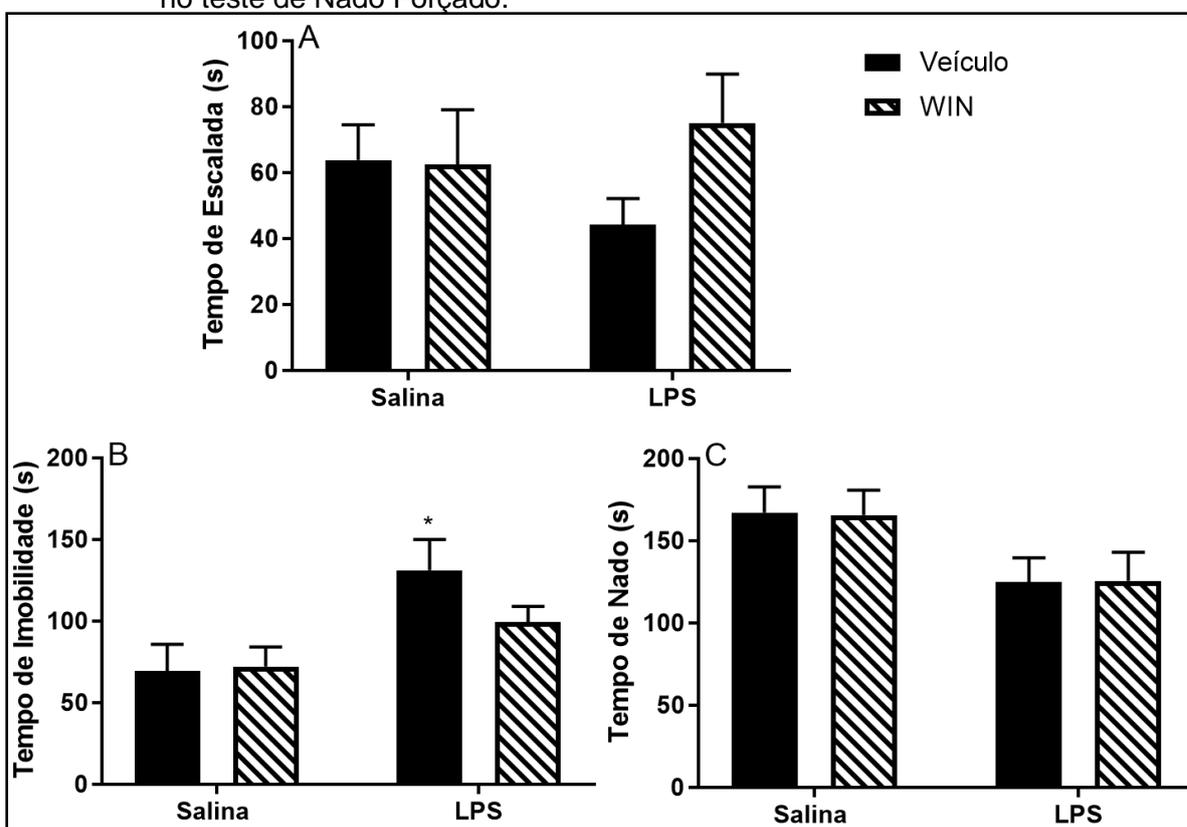
Nota: Animais pré-tratados com VDM, antes da aplicação i.p. de LPS. Tempo de Escalada (A), Tempo de Imobilidade (B) e Tempo de Nado (C) no teste de nado forçado. Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 4-5 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$  comparados ao grupo controle.

Tabela 12 - Análise de variância de duas vias no Teste de Nado Forçado, em grupos pré-tratados com veículo ou VDM (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Parâmetros	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
<b>Tempo de Imobilidade</b>	F(1,14) = 0,1334 P = 0,7208	F(1,14) = 14,61 P = 0,0021	F(1,14) = 0,195 P = 0,6060
<b>Tempo de Escalada</b>	F(1,14) = 3,188 P = 0,0959	F(1,14) = 3,234 P = 0,0937	F(1,14) = 0,01002 P = 0,9217
<b>Tempo de Nado</b>	F(1,14) = 1,024 P = 0,3286	F(1,14) = 5,266 P = 0,0377	F(1,14) 0,0003338 P = 0,9857

Fonte: Da autora.

Figura 24 - Efeito do pré-tratamento com WIN55,212-2 na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Nado Forçado.



Fonte: da autora.

Nota: Animais pré-tratados com WIN55,212-2, antes da aplicação i.p. de LPS. Tempo de Escalada (A), Tempo de Imobilidade (B) e Tempo de Nado (C) no teste de nado forçado. Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 4-5 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$  comparados ao grupo controle.

Tabela 13 - Análise de variância de duas vias no Teste de Nado Forçado, em grupos pré-tratados com veículo ou WIN 55, 212-2 (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Parâmetros	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
<b>Tempo de Imobilidade</b>	F(1,16) = 0,9555 P = 0,3429	F(1,16) = 9,166 P = 0,0080	F(1,16) = 1,363 P = 0,2601
<b>Tempo de Escalada</b>	F(1,16) = 1,283 P = 0,2740	F(1,16) = 0,07273 P = 0,7909	F(1,16) = 1,539 P = 0,2327
<b>Tempo de Nado</b>	F(1,16) = 0,000363 P = 0,9850	F(1,16) = 6,817 P = 0,0189	F(1,16) = 0,004883 P = 0,9452

Fonte: da autora.

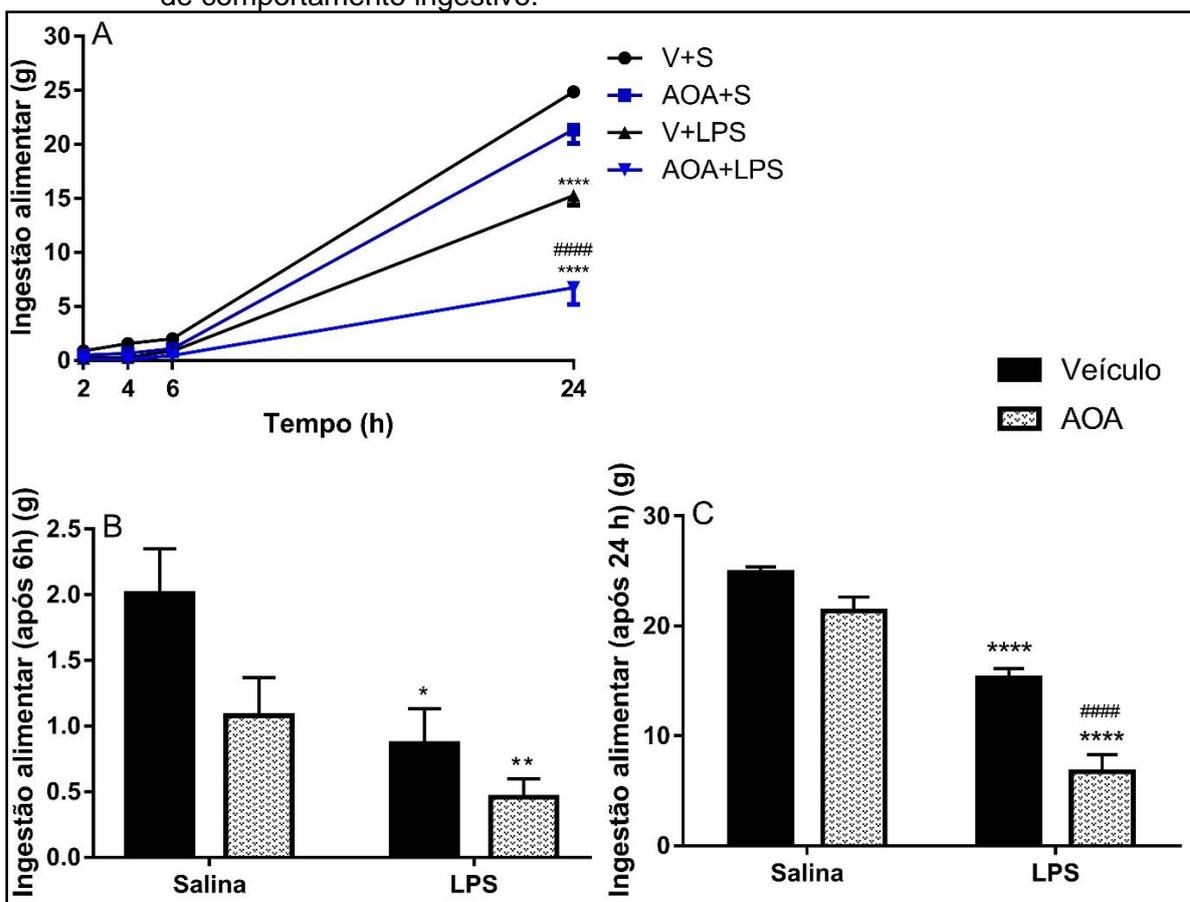
#### 4.3 INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM SULFETO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S) SOBRE AS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS À ENDOTOXEMIA

Os resultados obtidos através do pré-tratamento com Na<sub>2</sub>S, antes da aplicação i.p. de LPS, estão descritos a seguir.

##### 4.3.1 Ingestão alimentar

Na figura 25, notamos que os animais que receberam LPS, apresentaram uma diminuição no comportamento ingestivo em relação ao grupo controle, 6 horas ( $p < 0,05$ ) e 24 horas ( $p < 0,0001$ ) após sua aplicação. Essa redução também foi observada nos animais pré-tratados com AOA, antes da injeção de LPS, nos horários acima descritos quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,01$  em 6 horas,  $p < 0,0001$  em 24 horas), notamos ainda, que o AOA intensificou a redução da ingestão do alimento induzida pela endotoxina, em relação ao grupo veículo+LPS ( $p < 0,0001$ ) (Análise estatística - Tabela 14).

Figura 25 - Efeito do pré-tratamento com AOA na endotoxemia induzida por LPS, no teste de comportamento ingestivo.



Fonte: da autora.

Nota: Animais pré-tratados com AOA, antes da aplicação i.p. de LPS. Ingestão Alimentar (A), Ingestão alimentar após 6 horas do tratamento com LPS (B) e Ingestão alimentar após 24 horas do tratamento com LPS (C). Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 8 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados ao grupo controle, #####  $p < 0,0001$  comparado ao grupo V+LPS.

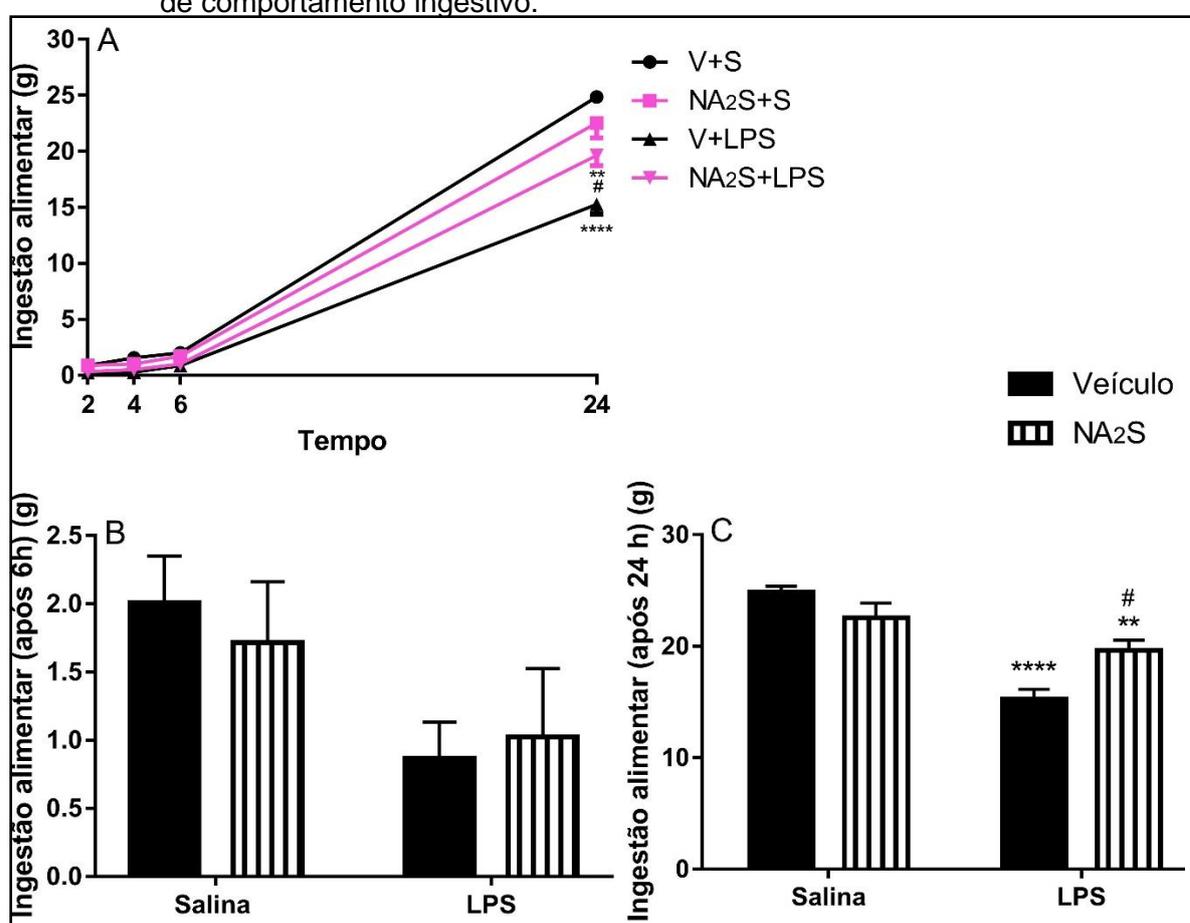
Tabela 14 - Análise de variância de duas vias no Teste de Ingestão Alimentar, em grupos pré-tratados com veículo ou AOA (Pré-tratamento) e submetidos à injeção i.p. de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Parâmetros	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
<b>Ingestão Alimentar (g) 6 horas</b>	F(1,28) = 6,127 P = 0,0196	F(1,28) = 10,6 P = 0,0030	F(1,28) = 0,9288 P = 0,3434
<b>Ingestão Alimentar (g) 24 horas</b>	F(1,28) = 28,21 P < 0,0001	F(1,28) = 114,5 P < 0,0001	F(1,28) = 4,938 P = 0,0345

Fonte: da autora.

Na figura 26, observamos que após 6 horas da aplicação de LPS, não notamos diferença significativa nos animais tratados com V+LPS e Na<sub>2</sub>S+LPS em relação aos animais do grupo veículo+salina. Entretanto, 24 horas após, o grupo V+LPS mostrou uma diminuição ( $p < 0,0001$ ) da ingestão alimentar em relação ao grupo tratado com veículo. Já, os animais tratados com Na<sub>2</sub>S+LPS, foram capazes de reverter ( $p < 0,05$ ) a redução da ingestão alimentar induzida pela administração de LPS (Análise estatística - Tabela 15).

Figura 26 - Efeito do pré-tratamento com Na<sub>2</sub>S na endotoxemia induzida por LPS, no teste de comportamento ingestivo.



Fonte: da autora.

Nota: Animais pré-tratados com Na<sub>2</sub>S, antes da aplicação i.p. de LPS. Ingestão Alimentar (A), Ingestão alimentar após 6 horas do tratamento com LPS (B) e Ingestão alimentar após 24 horas do tratamento com LPS (C). Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 6-8 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados ao grupo controle, #  $p < 0,05$  comparado ao grupo V+LPS.

Tabela 15 - Análise de variância de duas vias no Teste de Ingestão Alimentar, em grupos pré-tratados com veículo ou Na<sub>2</sub>S (Pré-tratamento) e submetidos à injeção i.p. de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

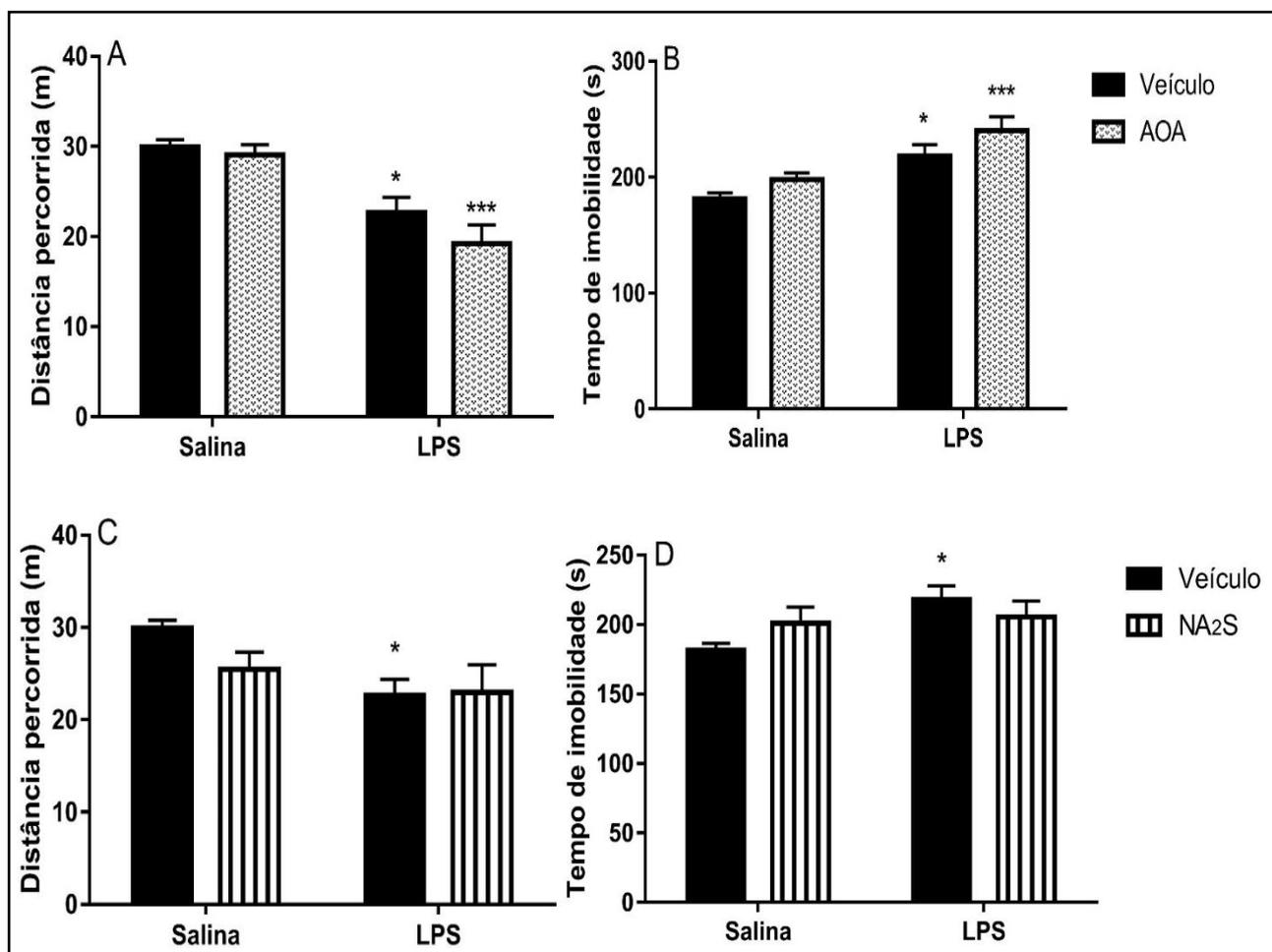
<b>Parâmetros</b>	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Desafio imunológico</b>	<b>Interação</b>
<b>Ingestão Alimentar (g) 6 horas</b>	F(1,24) = 0,03279 P = 0,8578	F(1,24) = 5,722 P = 0,0249	F(1,24) = 0,3442 P = 0,5629
<b>Ingestão Alimentar (g) 24 horas</b>	F(1,24) = 1,303 P = 0,2649	F(1,24) = 47,2 P < 0,0001	F(1,24) = 13,54 P = 0,0012

Fonte: da autora.

### 4.3.2 Campo Aberto

Neste teste observamos que após duas horas da administração de LPS, os animais apresentaram redução na distância percorrida no aparato ( $p < 0,05$ ) e aumento do tempo de imobilidade, quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 27A, 27B, 27C, 27D) e esse quadro também pôde ser observado nos animais que receberam AOA+LPS (Figura 27A e 27 B) ( $p < 0,001$  em ambos). Quanto ao pré-tratamento com Na<sub>2</sub>S, antes da aplicação i.p. de LPS, não observamos alterações entre os grupos, nos parâmetros analisados, quando comparados ao grupo veículo+salina (Figura 27C e 27D) (Análise estatística - Tabela 16 e 17).

Figura 27 - Efeito do pré-tratamento com AOA ou Na<sub>2</sub>S na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Campo aberto.



Fonte: da autora.

Nota: Distância percorrida (A) e Tempo de imobilidade (B), em animais pré-tratados com AOA, antes da aplicação i.p. de LP. Distância percorrida (C) e Tempo de imobilidade (D) em animais pré-tratados com Na<sub>2</sub>S, antes da aplicação i.p. de LPS, no teste de campo aberto. Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média ± EPM (n= 6-8 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , comparados ao grupo salina.

Tabela 16 - Análise de variância de duas vias no Teste de Campo Aberto, em grupos pré-tratados com veículo ou AOA (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Parâmetros	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
<b>Distância percorrida</b>	F(1,28) = 1,951 P = 0,1735	F(1,28) = 31,22 P < 0,0001	F(1,28) = 0,6903 P = 0,4131
<b>Tempo de imobilidade</b>	F(1,28) = 4,966 P = 0,0341	F(1,28) = 20,91 P < 0,0001	F(1,28) = 0,1102 P = 0,7424

Fonte: da autora.

Tabela 17 - Análise de variância de duas vias no Teste de Campo Aberto, em grupos pré-tratados com veículo ou Na<sub>2</sub>S (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

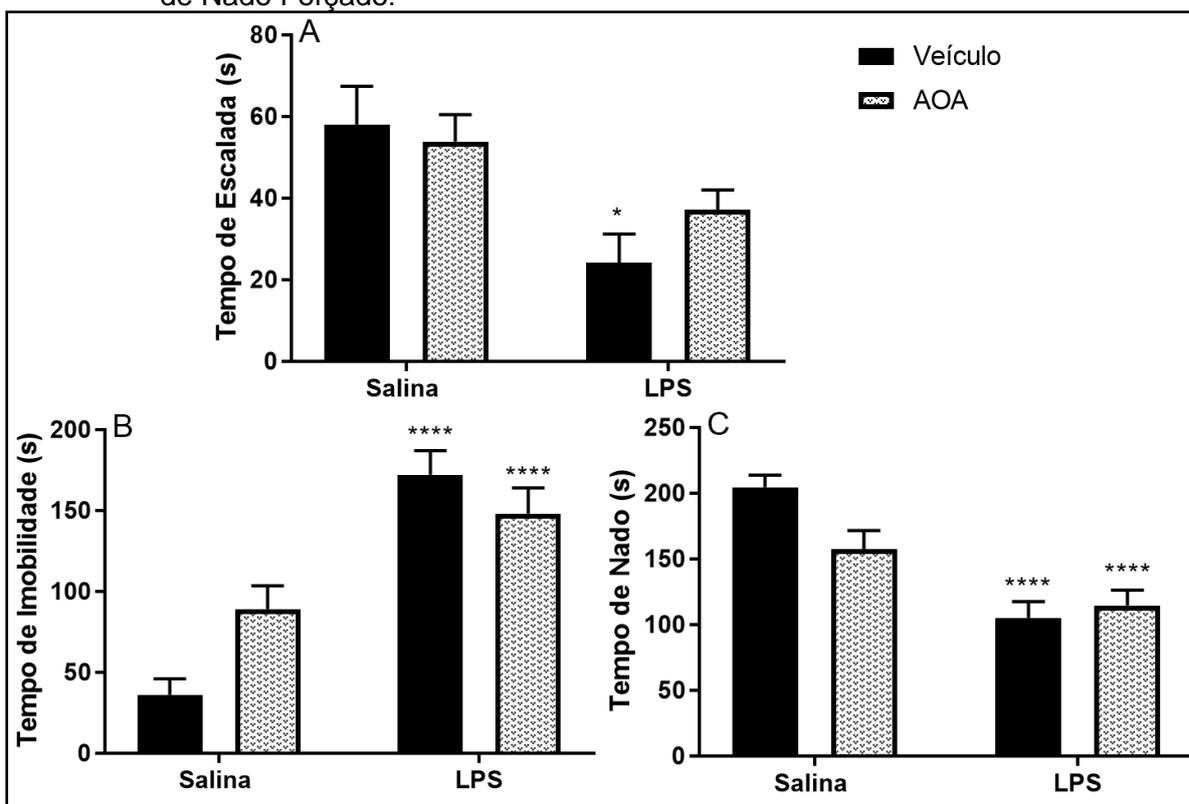
<b>Parâmetros</b>	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Desafio imunológico</b>	<b>Interação</b>
<b>Distância percorrida</b>	F(1,21) = 1,33 P = 0,2617	F(1,21) = 7,516 P = 0,0122	F(1,21) = 1,78 P = 0,1965
<b>Tempo de imobilidade</b>	F(1,21) = 0,1184 P = 0,7342	F(1,21) = 4,483 P 0,0463	F(1,21) = 2,785 P = 0,1100

Fonte: da autora.

### 4.3.3 Nado Forçado

A endotoxina administrada em conjunto com o veículo, foi capaz de promover o aumento ( $p < 0,0001$ ) do tempo que o animal permaneceu imóvel no teste de Nado forçado e de reduzir o tempo de escalada ( $p < 0,05$ ) e de nado ( $p < 0,0001$ ), quando comparados aos seus controles (Figuras 28A, 28B e 28C). O grupo tratado com AOA (Figura 28B e 28C), por sua vez, não foi capaz de alterar esse aumento da imobilidade e redução do tempo de nado, induzido pelo LPS ( $p < 0,0001$ , ambos) (Análise estatística - Tabela 18)

Figura 28 - Efeito do pré-tratamento com AOA na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Nado Forçado.



Fonte: da autora.

Nota: Animais pré-tratados com AOA, antes da aplicação i.p. de LPS. Tempo de Escalada (A), Tempo de Imobilidade (B) e Tempo de Nado (C) no teste de nado forçado. Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 6-7 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados ao grupo controle.

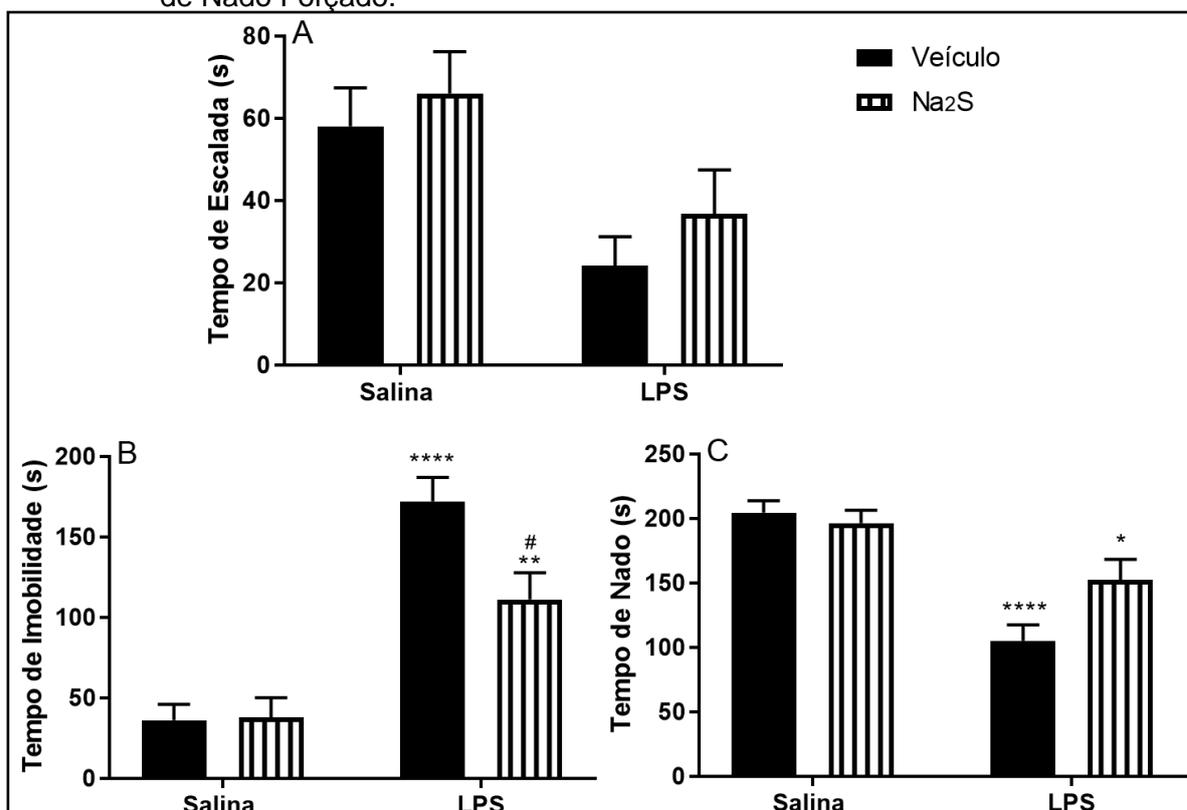
Tabela 18 - Análise de variância de duas vias no Teste de Nado Forçado, em grupos pré-tratados com veículo ou AOA (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Parâmetros	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
<b>Tempo de Imobilidade</b>	F(1,23) = 1,089 P = 0,3076	F(1,23) = 48,82 P < 0,0001	F(1,23) = 7,572 P = 0,0114
<b>Tempo de Escalada</b>	F(1,23) = 0,374 P = 0,5469	F(1,23) = 12,25 P = 0,0019	F(1,23) = 1,412 P = 0,2468
<b>Tempo de Nado</b>	F(1,23) = 2,521 P = 0,1260	F(1,23) = 35,59 P < 0,0001	F(1,23) = 5,717 P = 0,0254

Fonte: da autora.

Na figura 29, observamos que o LPS promoveu nos animais, uma diminuição ( $p < 0,0001$ ) do tempo de nado e aumento ( $p < 0,0001$ ) do tempo de imobilidade em relação ao grupo controle. Já, a administração i.c.v. de  $\text{Na}_2\text{S}$ , anteriormente à injeção de LPS, foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade ( $p < 0,05$ , quando comparados ao grupo V+LPS), mas não conseguiu alterar ( $p < 0,05$ ) o tempo de nado reduzido pelo LPS (Análise estatística - Tabela 19).

Figura 29 - Efeito do pré-tratamento com  $\text{Na}_2\text{S}$  na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Nado Forçado.



Fonte: da autora.

Nota: Animais pré-tratados com  $\text{Na}_2\text{S}$ , antes da aplicação i.p. de LPS. Tempo de Escalada (A), Tempo de Imobilidade (B) e Tempo de Nado (C) no teste de nado forçado. Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n = 4-7$  animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados ao grupo controle, #  $p < 0,05$  comparado ao grupo V+LPS.

Tabela 19 - Análise de variância de duas vias no Teste de Nado Forçado, em grupos pré-tratados com veículo ou Na<sub>2</sub>S (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

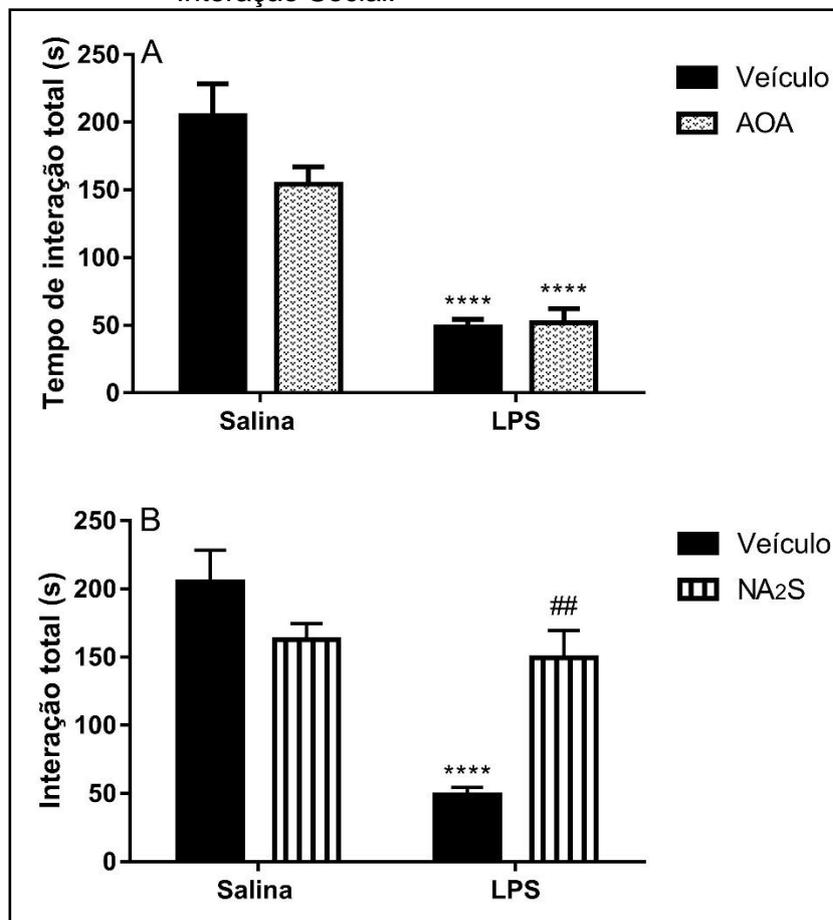
<b>Parâmetros</b>	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Desafio imunológico</b>	<b>Interação</b>
<b>Tempo de Imobilidade</b>	F(1,21) = 4,008 P = 0,0584	F(1,21) = 49,99 P <0,0001	F(1,21) = 4,495 P = 0,0461
<b>Tempo de Escalada</b>	F(1,21) = 1,108 P = 0,3045	F(1,21) = 10,44 P = 0,0040	F(1,21) = 0,05471 P = 0,8173
<b>Tempo de Nado</b>	F(1,21) = 2,192 P = 0,1536	F(1,21) = 29,46 P <0,0001	F(1,21) = 4,454 P = 0,0470

Fonte: da autora.

#### 4.3.4 Interação Social

Como mostra a figura 30, quando os animais foram submetidos ao teste de interação social, observou-se uma diminuição do tempo de interação total, 2 horas após a aplicação de LPS ( $p < 0,0001$ ), quando comparados aos seus respectivos controles (Figuras 30A e 30B). A redução ( $p < 0,0001$ ) também foi notada nos animais do grupo AOA+LPS em relação ao controle. Contudo, os animais do grupo Na<sub>2</sub>S+LPS, apresentaram um aumento ( $p < 0,01$ ) do tempo de interação, quando os comparamos aos animais do grupo V+LPS (Análise estatística - Tabela 20).

Figura 30 - Efeito do pré-tratamento com AOA ou Na<sub>2</sub>S na endotoxemia induzida por LPS, no teste de Interação Social.



Fonte: da autora.

Nota: Tempo de interação total (A, AOA e em B, Na<sub>2</sub>S) no teste de interação social, realizado 2 horas após a administração de LPS. Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média ± EPM (n= 5-8 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*\*\*\*  $p < 0,0001$  comparados ao grupo controle, ##  $p < 0,001$  comparados ao grupo V+LPS.

Tabela 20 - Análise de variância de duas vias no Teste de Interação Social, em grupos pré-tratados com veículo ou AOA ou Na<sub>2</sub>S (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

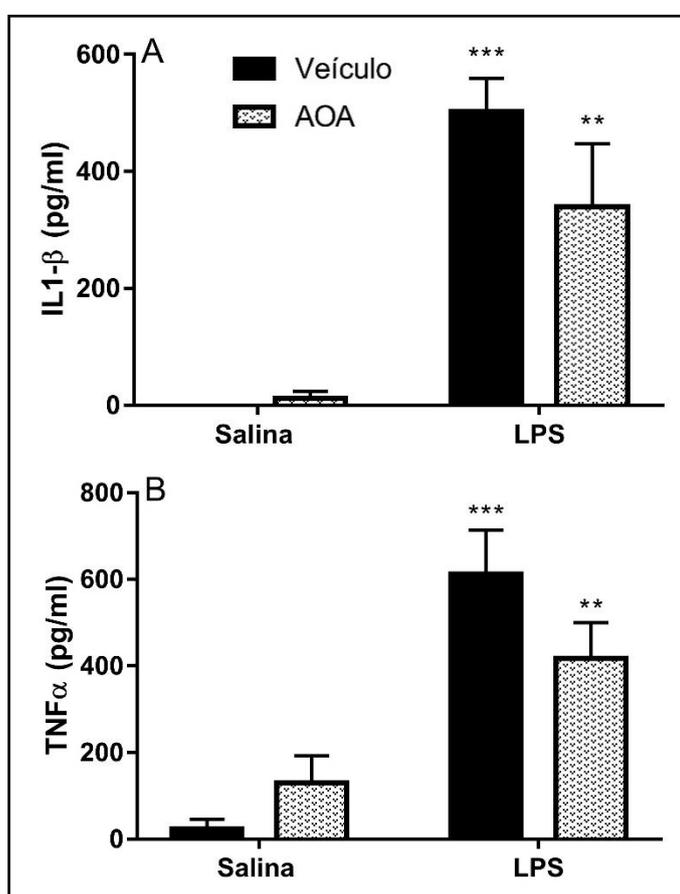
Parâmetros	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
<b>Distância percorrida (AOA)</b>	F(1,22) = 2,226 P = 0,1499	F(1,22) = 66,07 P < 0,0001	F(1,22) = 2,84 P = 0,1061
<b>Distância percorrida (Na<sub>2</sub>S)</b>	F(1,22) = 2,328 P = 0,1413	F(1,22) = 19,51 P = 0,0002	F(1,22) = 13,81 P = 0,0012

Fonte: da autora.

### 4.3.5 Dosagem de citocinas

O grupo tratado com veículo+LPS apresentou um aumento ( $p<0,001$  e  $p<0,05$ ) dos níveis séricos de IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  quando comparados aos seus respectivos grupos controle (Figura 31 e 32). Esse aumento também foi notado nos animais que receberam o pré-tratamento com AOA ( $p<0,01$  em ambos) ou Na<sub>2</sub>S ( $p<0,01$  e  $p<0,05$  respectivamente) e posteriormente, aplicação de LPS, quando comparados ao seu grupo controle (Análise estatística - Tabela 21 e 22).

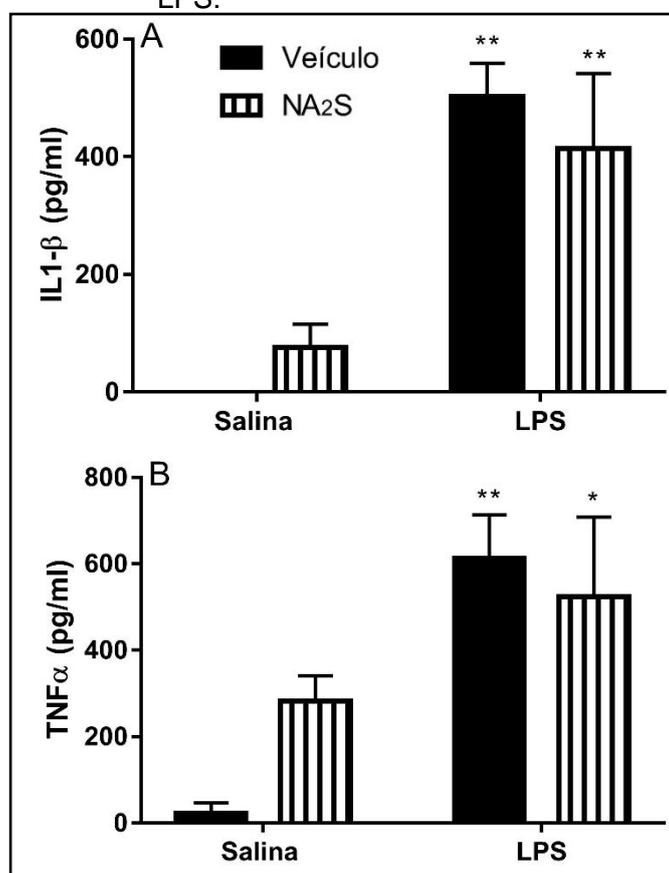
Figura 31 - Efeito do pré-tratamento com AOA na concentração de citocinas plasmáticas, durante a endotoxemia induzida por LPS.



Fonte: da autora.

Nota: Concentrações plasmáticas de IL1- $\beta$  (A) e TNF- $\alpha$  (B) durante a endotoxemia em animais pré-tratados com AOA. Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 5-8 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$  comparados ao grupo controle.

Figura 32 - Efeito do pré-tratamento com Na<sub>2</sub>S na concentração de citocinas plasmáticas, durante a endotoxemia induzida por LPS.



Fonte: da autora.

Nota: Concentrações plasmáticas de IL1-β (A) e TNF-α (B) durante a endotoxemia em animais pré-tratados com Na<sub>2</sub>S. Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média ± EPM (n= 5-9 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  comparados ao grupo controle.

Tabela 21 - Análise de variância de duas vias em grupos pré- tratados com veículo ou AOA (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de salina ou LPS (Desafio imunológico), em relação às concentrações de citocinas plasmáticas.

Dosagem de citocinas	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
<b>IL-1β</b>	F(1,18) = 1,396 P = 0,2527	F(1,18) = 41,88 P = <0,0001	F(1,18) = 1,866 P = 0,1888
<b>TNF- α</b>	F(1,21) = 0,3347 P = 0,5691	F(1,21) = 33,8 P < 0,0001	F(1,21) = 4,006 P = 0,0584

Fonte: da autora.

Tabela 22 - Análise de variância de duas vias em grupos pré-tratados com veículo ou Na<sub>2</sub>S (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de salina ou LPS (Desafio imunológico), em relação às concentrações de citocinas plasmáticas.

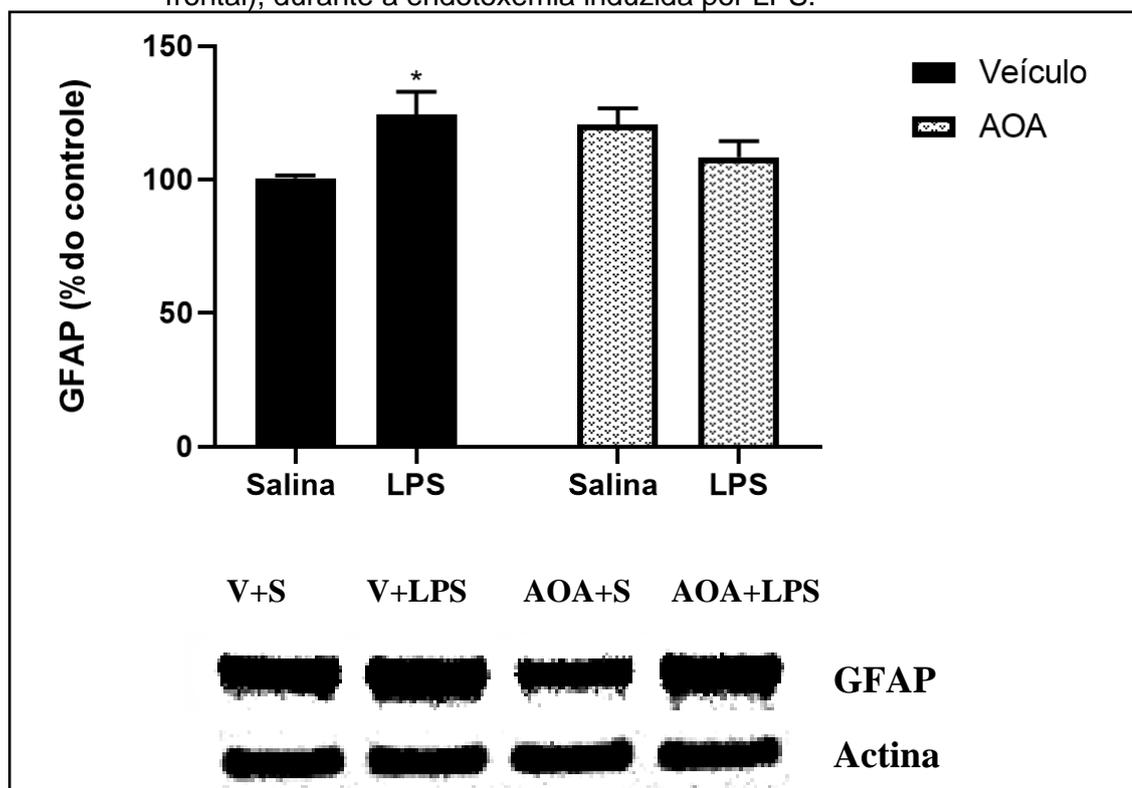
Dosagem de citocinas	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	F(1,21) = 0,006093 P = 0,9385	F(1,21) = 26,73 P <0,0001	F(1,21) = 1,009 P = 0,3266
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	F(1,20) = 0,6214 P = 0,4398	F(1,20) = 14,7 P = 0,0010	F(1,20) = 2,582 P = 0,1237

Fonte: da autora.

#### 4.3.6 Análise da expressão de GFAP por *Western Blotting*

Como podemos observar na Figura 33, o grupo que recebeu veículo+LPS apresentou um aumento da expressão de GFAP ( $p < 0,05$ ) no córtex pré-frontal, quando comparado ao grupo controle. Já na Figura 34, notamos um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da expressão da proteína fibrilar ácida, em animais pré-tratados com salina e submetidos à endotoxemia em relação ao grupo veículo+salina. Em contrapartida, o grupo que recebeu Na<sub>2</sub>S, antes da aplicação intraperitoneal de LPS, apresentou uma redução ( $p < 0,05$ ) na expressão de GFAP quando comparado ao grupo veículo+LPS, ou seja, o pré-tratamento com o sulfeto de hidrogênio, foi capaz de prevenir o aumento do GFAP induzido pelo lipopolissacarídeo (Análise estatística - Tabela 23 e 24).

Figura 33 - Efeito do pré-tratamento com AOA na expressão de GFAP (no córtex pré-frontal), durante a endotoxemia induzida por LPS.



Fonte: da autora.

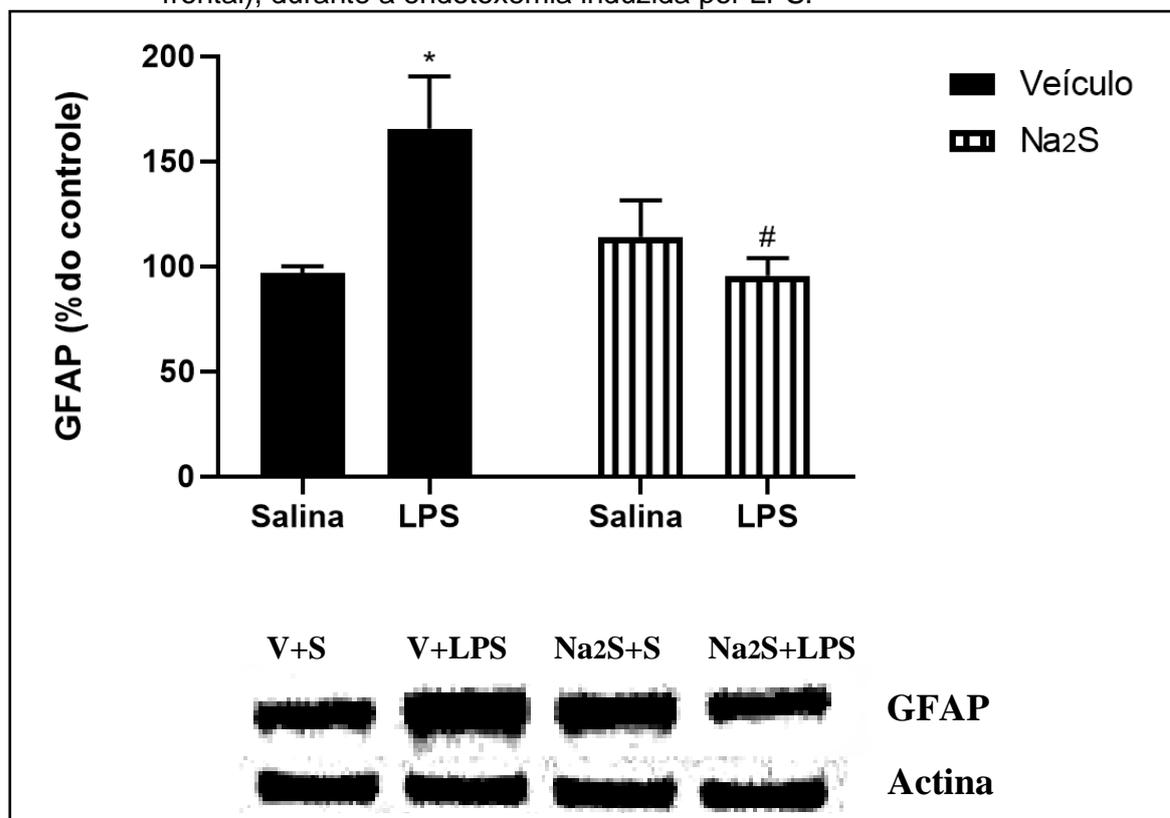
Nota: Expressão de GFAP durante a endotoxemia, em animais pré-tratados com AOA. Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n= 5-6 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$  comparados ao grupo controle.

Tabela 23 - Análise de variância de duas vias em grupos pré-tratados com veículo ou AOA (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de salina ou LPS (Desafio imunológico), em relação à expressão de GFAP.

Expressão de GFAP	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
AOA	F (1, 19) = 0,9220 P=0,3490	F (1, 19) = 0,1192 P=0,7337	F (1, 19) = 8,795 P=0,0079

Fonte: da autora.

Figura 34- Efeito do pré-tratamento com Na<sub>2</sub>S na expressão de GFAP (no córtex pré-frontal), durante a endotoxemia induzida por LPS.



Fonte: da autora.

Nota: Expressão de GFAP durante a endotoxemia, em animais pré-tratados com Na<sub>2</sub>S. Resultados obtidos com ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Tukey. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM (n=6 animais por grupo). Os símbolos representam níveis de significância: \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle, #  $p < 0,05$  comparado ao grupo V+LPS.

Tabela 24 - Análise de variância de duas vias em grupos pré-tratados com veículo ou Na<sub>2</sub>S (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de salina ou LPS (Desafio imunológico), em relação à expressão de GFAP.

Expressão de GFAP	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
Na <sub>2</sub> S	F (1, 20) = 2,547 P=0,1262	F (1, 20) = 2,767 P=0,1118	F (1, 20) = 7,614 P=0,0121

Fonte: da autora.

## 5 DISCUSSÃO

A seguir, serão discutidos os resultados encontrados em nosso estudo.

### 5.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LPS SOBRE O COMPORTAMENTO

O LPS é considerado um potente ativador do sistema imune e conforme trabalhos anteriores, quando ocorre uma infecção causada por um microrganismo patogênico, ocorre no hospedeiro, uma série de respostas imunes, fisiológicas, metabólicas e comportamentais, mediadas pela ativação do sistema imune, visando combater a infecção (DANTZER, 2004; DANTZER, 2009).

Esta endotoxina, quando administrada sistemicamente ou no encéfalo (ventrículo lateral) em animais de laboratório, é capaz de desencadear diversas respostas, características do chamado comportamento doentio, com desenvolvimento de febre, ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e mudanças comportamentais (DANTZER, 2009). Enfatizando o parâmetro comportamental, diversos estudos têm mostrado que a administração sistêmica de LPS em animais é caracterizada por sintomas como: redução da atividade locomotora-exploratória e do apetite, letargia e aumento de sensibilidade à dor (HART, 1988; KENT *et al.*, 1992).

De acordo com estudos de prévios do laboratório, o comportamento doentio é entendido como um estado motivacional no qual o animal está empenhado a evitar gasto energético, visando o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz e desfavorável ao patógeno (CABRAL; GIUSTI-PAIVA, 2016; DE PAIVA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2013; SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2015). Algumas das características observadas nos animais submetidos ao desafio imunológico com LPS, são muito semelhantes aos sintomas clinicamente relevantes na depressão e ansiedade em seres humanos (DANTZER *et al.*, 2008; KRISHNADAS; CAVANAGH, 2012) e é por esse motivo, que a administração sistêmica de LPS, tem sido abordada como um dos modelos experimentais utilizados para estudar a inflamação associada à depressão em roedores (FRENOIS; MOREAU; O'CONNOR, 2007; HENRY; HUANG; WYNNE, 2008; O'CONNOR; LAWSON; ANDRÉ, 2009).

Dentre as alterações comportamentais abordadas anteriormente no comportamento doentio, estão o comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo,

alteração da locomoção e da ingestão alimentar (DANTZER, 2004). Sabe-se que os modelos comportamentais são boas ferramentas para identificar o curso e a gravidade do comprometimento imunológico (GRANGER *et al.*, 2013) e que os testes de campo aberto, nado forçado, interação social e ingestão alimentar são descritos pela literatura como bons métodos de avaliação (LIU *et al.*, 2007). Diante do exposto, submetemos nossos animais a estes testes, afim de estudar o efeito das doses de 100, 200 e 500 µg/kg de LPS, duas horas após sua aplicação, visando a caracterização do estado doentio (CHAOULOFF; DURAND; MORMEDE, 1997; DE PAIVA *et al.*, 2010; DUNN; SWIERGIEL, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2020; SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2015).

Vale ressaltar que testamos as diferentes doses de LPS, duas horas após sua aplicação i.p., amparados em estudos anteriores, que demonstraram uma visão temporal da resposta comportamental à esta endotoxina. Conforme descrito por Nölder e Schötz (2007), é possível observar que o ápice da resposta comportamental acontece às 2 horas, sendo que ela se atenua com o passar do tempo, tornando-se não significativa quando comparada ao controle, 24 horas após a aplicação.

Em nosso trabalho, utilizamos o teste de campo aberto para avaliar a atividade locomotora dos animais (BATISTA; GIUSTI-PAIVA; VILELA, 2018) e observamos uma diminuição da distância percorrida e aumento do tempo de imobilidade, o que corrobora com estudos de Cabral e Giusti-Paiva (2016), onde camundongos submetidos a este teste, 2 horas após receberem LPS (200, 500 e 1000 µg/Kg) apresentaram uma redução no número de cruzamentos centrais, periféricos e totais.

Outro trabalho mostrou que camundongos tratados com LPS na dose de 200µg/Kg, apresentavam duas horas após o tratamento, menor locomoção no aparato de campo aberto e reduzidas visitas ao braço aberto no teste de labirinto em cruz elevado (KINOSHITA *et al.*, 2009). Ainda no parâmetro locomoção, estudos de Bassi e colaboradores (2012), testaram diferentes doses de LPS (10, 50, 200 e 500 µg/Kg, i.p.) em ratos *Wistar*, através de testes como: claro-escuro, campo aberto, labirinto em T elevado e labirinto em cruz elevado e verificaram que com a aplicação i.p. de LPS, na dose de 200 µg/Kg, os animais apresentaram diminuição da atividade locomotora e exploratória.

Nossos resultados mostraram também, uma redução do comportamento ingestivo em animais submetidos ao desafio imunológico, 6 horas e 24 horas após o tratamento i.p. com LPS, reafirmando dados mostrados na literatura (SILVA; GIUSTI-

PAIVA, 2015). É sabido que a anorexia é um clássico elemento da fase aguda da resposta imunológica e que o LPS por ser capaz de induzir esse tipo de resposta, tem a anorexia como um de seus efeitos mais marcantes (KOPF *et al*, 2011).

Quanto à interação social, notamos uma redução do tempo da interação total em animais que receberam LPS nas doses de 200 e 500 µg/Kg. Resultado semelhante foi revelado por Townsend *et al* (2014), que em seu estudo observou redução neste comportamento, tanto em ratos adultos quanto em idosos, duas horas após aplicar LPS.

Como nossos resultados e trabalhos da literatura apontavam que a dose de 200 µg/Kg de LPS, era capaz de evocar a resposta imune e produzir no animal alterações comportamentais, no teste de nado forçado, seguido conforme o protocolo descrito por Padovan e Guimarães (2004), testamos apenas esta dose e constatamos que após 2 horas, os animais apresentaram redução do tempo de nado e aumento do tempo de imobilidade, revelando um comportamento tipo-depressivo nos animais e estes dados reforçam o que foi encontrado por Oliveira e colaboradores (2020) e Silva e Giusti-Paiva (2016).

Resumindo, nossos achados mostraram que os animais que receberam LPS na dose de 200 µg/Kg e foram submetidos aos testes acima citados, duas horas após a aplicação i.p., apresentaram redução da capacidade locomotora/exploratória, da ingestão alimentar e da interação social e aumento do tempo de imobilidade, ou seja, escolhemos uma dose mínima, onde foi possível observar estes parâmetros alterados, justificando dessa forma a exclusão da dose de 500 µg/Kg. Portanto, nossos dados reafirmam a capacidade do LPS de produzir efeitos característicos do comportamento doentio (SONCINI *et al.*, 2012).

## 5.2 INFLUÊNCIA DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS À ENDOTOXEMIA

Após selecionarmos a dose de LPS (200 µg/Kg) a ser utilizada, investigamos a participação do sistema endocanabinoide sobre as respostas comportamentais de animais submetidos à endotoxemia.

Tem sido demonstrado na literatura, que receptores CB1 são encontrados em áreas do sistema nervoso relacionadas com o controle da ingestão de alimento,

como exemplo, o hipotálamo (HERKENHAM *et al.*, 1990) e que os eCBs possuem uma grande relevância quanto à ingestão de alimentos (COTA *et al.*, 2003).

Diante disso, em nosso trabalho, realizamos o teste de comportamento ingestivo e observamos que animais que receberam AM251 (antagonista de CB1) e VDM (inibidor da recaptção de endocanabinoide), antes da administração de LPS, apresentaram redução da ingestão alimentar, assim como os animais do grupo V+LPS. Estes resultados, reforçam estudos que testaram AM251 e AM404, frente ao desafio imunológico com LPS e constataram essa mesma redução (PAIVA; GIUSTI-PAIVA, 2013). Todavia, quando utilizamos um agonista não-seletivo de canabinoide, o WIN55,212-2, observamos uma prevenção do quadro de anorexia observada na endotoxemia induzida pelo LPS.

Dados obtidos de estudos experimentais em murídeos obesos e normais, mostraram que a ativação de receptores CB1 por canabinoides endógenos ou  $\Delta^9$ -THC, estimularam o consumo de alimentos. Contudo, animais cujos genes dos receptores CB1 haviam sido suprimidos (CB1<sup>-/-</sup>) consumiam menos comida e apresentavam um fenótipo magro, resistente ao aumento de peso induzido por dieta (DI MARZO *et al.*, 1998). Confirmando estes achados, Cota e colaboradores (2013) também demonstraram que animais knockout para o receptor CB1 apresentavam redução na ingestão de alimentos e peso reduzido.

Evidências obtidas de estudos com eCBs (anandamida e 2-AG) e canabinoides exógenos ( $\Delta^9$ -THC), apontaram um aumento da ingestão de alimento em animais tratados com estes canabinoides (HO *et al.*, 2007; KOCH; MATTHEWS, 2001; WILLIAMS; KIRKHAM, 1999).

Outros trabalhos demonstraram ainda, que a administração de agonistas CB1, central (MERROUN *et al.*, 2009) e sistêmica (GÓMEZ *et al.*, 2002) induziram efeito hiperfágico em ratos pré-saciados (24 horas de jejum, seguidas pelo acesso à comida posteriormente ao experimento). Em contrapartida, a administração sistêmica (GÓMEZ *et al.*, 2002) e central (i.c.v. MERROUN *et al.*, 2009) de antagonistas CB1 induziram efeito hipofágico em ratos pré-saciados.

Este efeito hiperfágico, induzido por agonistas CBs parece ser mediado pela ativação de receptores CB1 localizados no hipotálamo, visto que a microinjeção de  $\Delta^9$ -THC no hipotálamo, aumentou a ingestão de alimento e seu efeito foi bloqueado por rimonabant, um antagonista dos receptores CB1 (VERTY *et al.*, 2005). Estudos

de Jamshidi e Taylor (2001), reforçaram este efeito, mostrando que a microinjeção de anandamida no hipotálamo ventromedial, induziu hiperfagia em ratos.

Como se pode observar, são escassos os trabalhos que abordam conjuntamente eCBs e endotoxemia, frente ao parâmetro de ingestão alimentar. É sabido que durante a endotoxemia, o consumo de comida e água estão transitoriamente reduzidos e o peso corporal é diminuído (GRANGER *et al.*, 2012). Rorato e colaboradores (2010) demonstraram que a administração de LPS, estimula o eixo HHA e aumenta os níveis de CRF que possui efeitos anorexígenos. Diante disso e amparados por estudos anteriores, sugerimos que o sistema endocanabinoide controla a ingestão de alimento, por reforçar tonicamente a motivação pela busca e consumo de comida, possivelmente por interagir com vias envolvidas em mecanismos de recompensa ao nível do sistema mesolímbico ou então, pode ser ativado "sob demanda", após um curto período de privação de comida, modulando os níveis ou a ação de mediadores anorexígenos, presentes no desafio imunológico com LPS (BISOGNO; LIGRESTI; DI MARZO, 2005).

Penã e colaboradores (2000), demonstraram o efeito dos canabinoides sobre a locomoção e revelaram um efeito trifásico em animais tratados com  $\Delta^9$ -THC. Doses baixas, apontaram uma diminuição da locomoção, doses altas aumentaram a atividade locomotora e doses muito altas provocaram catalepsia.

Em nosso trabalho, realizamos o teste de campo aberto, a fim de avaliar a atividade locomotora dos animais e notamos que o sistema endocanabinoide não foi capaz de alterar as respostas comportamentais induzidas pelo LPS. Animais tratados com a endotoxina, apresentaram atividade locomotora reduzida, conforme pode ser observado nas alterações envolvidas no comportamento doentio. O antagonista CB1, AM251, não alterou a locomoção dos animais controle e diminuiu ainda mais esse comportamento quando tratados com LPS. Já, o agonista de CB, WIN 55,212-2 e o inibidor da recaptação de CB, VDM, não alteraram esta resposta.

A respeito dos efeitos dos eCBS sobre o comportamento tipo-ansioso, ainda são contraditórias as respostas observadas. Alguns testes demonstraram que a administração sistêmica de antagonistas dos receptores CB1 pode induzir efeito do tipo-ansiolítico (GRIEBEL *et al.*, 2005; SINK *et al.*, 2010), em outros estudos, efeito tipo-ansio gênico (NAVARRO *et al.*, 1997; THIEMANN *et al.*, 2009) ou ainda, podem não apresentar efeito algum (ADAMCZYK *et al.*, 2008). A literatura nos traz também,

que baixas doses de eCBs são ansiolíticas, enquanto que doses mais elevadas tendem a ser ansiogênicas (MOREIRA; WOTJAK, 2010).

No parâmetro sociabilidade, achados de Paiva e Giusti-Paiva (2013), revelaram ainda, que o pré-tratamento com AM251 e AM404, i.c.v., não foi capaz de prevenir a redução da interação social induzida pelo LPS e conforme demonstrado por Trezza e Vanderschuren (2008), os canabinoides podem tanto acentuar quanto inibir a interação social em ratos, dependendo de como o sistema endocanabinoide é estimulado.

Estudos apontam que drogas antidepressivas reduzem a imobilidade dos animais, tendo em vista que a imobilidade é apontada como um estado de desespero comportamental, no qual os animais não estão estimulados a tentar escapar da situação a que estão submetidos e é relacionada ao estado tipo-depressivo (LIU *et al.*, 2007). Morais e colaboradores (2016), testaram o papel do AM251 no comportamento tipo-depressivo, em animais diabéticos e constataram que ratos diabéticos (db) e ratos db+AM251, apresentaram aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado. Em nosso estudo, o sistema endocanabinoide não foi capaz de modular este tipo de comportamento em ratos submetidos à endotoxemia. Conforme demonstrado, o AM251, não alterou o tempo de imobilidade dos animais controle e diminuiu esse comportamento quando os animais foram tratados com LPS. Já, o WIN 55,212-2 e o VDM, não alteraram este efeito.

Nossos resultados demonstraram que a administração tanto de AM251, quanto de WIN 55,212-2 ou VDM, intracerebroventricular, não foram capazes de alterar a atividade locomotora, nem o tempo de imobilidade de animais tratados com LPS. Diante disso, podemos sugerir que o sistema endocanabinoide, via receptores CB1, não participou da modulação do comportamento doentio, no que diz respeito aos parâmetros de atividade locomotora e comportamento tipo-depressivo.

Sabe-se que durante o desafio imunológico com LPS, a regulação do eixo HHA, secreção hormonal, comportamento e proliferação celular, é mediada sobretudo pelas citocinas, responsáveis pela comunicação entre os sistemas imune e neuroendócrino (DANTZER, 2009). O papel desempenhado por elas, é fundamental para que o organismo responda de forma apropriada ao agente infeccioso, principalmente, no que diz respeito à modulação das alterações comportamentais promovidas neste contexto, como já descrito.

A produção de citocinas, aliada à uma maior síntese de prostaglandinas, leva ao aparecimento do comportamento doentio pela estimulação da atividade do eixo HHA e consequente aumento dos níveis de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e glicocorticóides (BANKS; ERICKSON, 2010; MCCUSKER; KELLEY, 2013). Um estudo sobre a modulação do sistema endocanabinoide sobre o eixo HHA, demonstrou que em situações normais, a ativação endógena do receptor CB1 é alta, enquanto que, durante situações de estresse, como o imunológico, é reduzida. Essa redução na ativação do receptor CB1, em situações estressantes, poderia resultar em aumento de atividade em aferências glutamatérgicas no PVN, permitindo ativar o eixo HHA (HALLER *et al.*, 2004; MANZANARES; CORCHERO; FUENTES, 1999; PATEL *et al.*, 2004). Mediante o exposto, podemos sugerir que a modulação negativa do sistema endocanabinoide sobre o eixo HHA, em situações normais, estaria inibida em situações de estresse, impedindo sua participação nas respostas comportamentais de locomoção e comportamento tipo-depressivo observadas no comportamento doentio.

### 5.3 INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM SULFETO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S) SOBRE AS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS À ENDOTOXEMIA

Em nosso trabalho, também investigamos a participação do sulfeto de hidrogênio, um neurotransmissor atípico, (produzido endogenamente no cérebro pela cistationina β-sintase - CBS), nas respostas comportamentais e imunes observadas durante a endotoxemia.

Nossos resultados mostraram que animais que receberam LPS e animais do grupo LPS+AOA, apresentaram aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado, revelando um efeito tipo-depressivo do LPS. Contudo, o uso de Na<sub>2</sub>S, alterou este efeito, aumentando o tempo de nado e reduzindo o tempo de imobilidade. Corroborando com estes achados, Wei *et al* (2018) demonstraram que animais submetidos ao estresse leve, crônico e imprevisível, exibiram respostas comportamentais semelhantes à depressão, representada pelo aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado e de suspensão da cauda. Ainda neste trabalho, o uso do NaHS (um doador de H<sub>2</sub>S) não apenas aliviou os comportamentos depressivos induzidos por esse tipo de estresse, como também aumentou a

expressão do Sirt-1 do hipocampo destes animais. Tang *et al* (2015) mostraram que ratos diabéticos pré-tratados com H<sub>2</sub>S, apresentaram redução do tempo de imobilidade no teste de nado forçado e do comportamento semelhante à ansiedade no LCE, além da diminuição dos níveis de glutatona e aumento dos níveis da superóxido dismutase, revelando um papel inibidor do H<sub>2</sub>S sobre o comportamento depressivo e no estresse oxidativo.

Quando avaliamos a atividade locomotora, notamos uma diminuição da distância percorrida no campo aberto em animais que receberam LPS e no grupo AOA+LPS e neste caso, o Na<sub>2</sub>S não foi capaz de alterar este comportamento induzido pela LPS. Contrastando com nosso resultado, Chen e colaboradores (2013), demonstraram que o tratamento crônico com um doador de H<sub>2</sub>S (NaHS; 5,6 mg/kg, i.p.) foi capaz de reduzir o comportamento tipo ansioso no teste de labirinto em cruz elevado. Outro estudo, reforçou este achado, demonstrando que o tratamento crônico i.p. com H<sub>2</sub>S, exerceu um efeito ansiolítico em ratos submetidos aos testes de campo aberto e LCE (DONATTI *et al.*, 2017). Diante disso, podemos sugerir que a forma de tratamento pode interferir nos resultados, quando o objetivo é investigar o papel do H<sub>2</sub>S na atividade locomotora. Os estudos citados, utilizaram um tratamento crônico, onde não foi induzido o comportamento doentio, além disso, a forma de administração de ambos foi intraperitoneal, já em nosso trabalho o tratamento foi agudo e a administração da droga foi feita intracerebroventricularmente. Outra diferença que merece destaque, é que estes trabalhos procuraram retratar o papel ansiolítico do H<sub>2</sub>S, enquanto que nosso estudo enfatizou o seu papel na mobilidade.

No teste de comportamento ingestivo realizado em nosso estudo, verificamos uma diminuição da ingestão alimentar em animais submetidos ao desafio imunológico, o que reafirma dados mostrados na literatura (SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2015) e a administração de AOA (inibidor de CBS) não foi capaz de alterar a redução da ingestão alimentar provocada pelo LPS. Quando injetamos Na<sub>2</sub>S (doador de H<sub>2</sub>S), intracerebroventricular, observamos que após 24 horas da injeção i.p. de LPS, ocorreu uma prevenção do quadro de anorexia, exibido pela endotoxina. Já no teste de interação social, observamos que o H<sub>2</sub>S foi capaz de prevenir a diminuição da interação total induzida pelo LPS, enquanto que o uso do inibidor não alterou as respostas observadas na redução da sociabilidade.

Trabalhos que abordem o pré-tratamento com sulfeto de hidrogênio e o comportamento doentio conjuntamente são escassos na literatura, contudo é possível encontrar estudos que demonstram o efeito do tratamento com H<sub>2</sub>S frente ao desafio imunológico com LPS, no que diz respeito à modulação da temperatura e da resposta imunológica. Podemos citar, o estudo de Fernández e pesquisadores (2016) que testaram o efeito modulador do H<sub>2</sub>S na hipotermia seguida de febre, induzida por choque séptico com alta dose de LPS e constataram que o grupo que recebeu AOA+LPS apresentou aumento dos valores de Tb durante a hipotermia e esta resposta foi acompanhada de aumento dos níveis de PGD<sub>2</sub> e de H<sub>2</sub>S, revelando o papel criogênico desta molécula.

Kwiatkoski e colaboradores (2013), estudaram a participação do H<sub>2</sub>S na AVPO, em animais submetidos à inflamação sistêmica com LPS. Eles demonstraram que a injeção i.c.v. de AOA, em animais endotoxêmicos, foi capaz de acentuar a resposta febril e a produção de PGE<sub>2</sub>. Para reforçar este achado, eles injetaram Na<sub>2</sub>S (doador de H<sub>2</sub>S), intracerebroventricular e constataram o inverso, ou seja, o sulfeto de hidrogênio foi capaz de amenizar a resposta febril e reduziu a produção de PGE<sub>2</sub>, apresentando um papel criogênico. Observaram ainda neste estudo, que os níveis de H<sub>2</sub>S e AMPc na AVPO, apresentaram-se reduzidos após desafio imunológico. Estes dados retratam, que a síntese de H<sub>2</sub>S é regulada negativamente durante a endotoxemia, favorecendo a síntese de PGE<sub>2</sub> e diminuindo os níveis de AMPc no hipotálamo.

Já é claro na literatura, que o comportamento doentio é uma resposta necessária do organismo, visando criar um ambiente desfavorável ao patógeno. Nela observamos a síntese de citocinas pró-inflamatórias, de PGEs e de outros mediadores inflamatórios que culminam na alteração do comportamento (CABRAL, GIUSTI-PAIVA, 2016; OLIVEIRA, *et al.*, 2020). Visto que nestes trabalhos citados anteriormente, a síntese de H<sub>2</sub>S é regulada negativamente durante a endotoxemia e que tal fato favorece a síntese de PGE, podemos sugerir que nossa administração de H<sub>2</sub>S a nível central, possa ter um papel importante na modulação do comportamento doentio, visto que animais que receberam o tratamento com o sulfeto de hidrogênio, antes da administração de LPS, apresentaram uma prevenção da alteração dos parâmetros analisados.

Em nosso estudo, verificamos ainda que os níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  aumentaram de modo significativo após a aplicação i.p. de LPS 200  $\mu$ g/Kg.

Corroborando com estes achados, Biesmans *et al* (2013) testaram as doses de 0,62 e 2,5 mg/Kg de LPS em camundongos e observaram um aumento significativo nas concentrações de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e INF- $\gamma$ . Yee e Prendergast (2010) administraram intraperitonealmente 150  $\mu$ g/Kg de LPS em ratos e também verificaram aumento sobre os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Outros estudos com diferentes doses de LPS também mostraram este mesmo efeito (ANDO *et al.*, 2000; YORULMAZ *et al.*, 2015).

Nosso tratamento com inibidor de CBS (AOA) ou Na<sub>2</sub>S, antes da aplicação de LPS, não foi capaz de atenuar este aumento sobre concentrações plasmáticas de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Nós sugerimos que a resposta observada, possa ter ocorrido devido a coleta periférica do sangue, ou seja, quando reconhecido pelo sistema imune, o LPS, ativa uma cascata imunológica, onde citocinas são sintetizadas e ao atingirem o SNC (pelas vias que já abordamos) estimularão a síntese de outras moléculas importantes na inflamação. Como nosso pré-tratamento é intracerebroventricular, sugerimos que o efeito neuromodulador do H<sub>2</sub>S esteja ocorrendo a nível central.

É sabido que a ação das citocinas ocorre de maneira conjunta, pois a deficiência em uma delas pode ser compensada por outra (DANTZER, 2009). O TNF- $\alpha$ , por sua vez, é conhecido como pirógeno endógeno, que age no eixo Hipotálamo- Hipófise e possui ações imunoestimulatórias, que desempenham papel importante no combate a infecções, provocando a liberação de neutrófilos, produção de superóxidos e ativação de macrófagos (DINARELLO, 2004). Já a produção de IL-1 $\beta$ , estimulada pela administração de LPS, como evidenciada em nossos resultados, atua na BHE, estimulando a síntese de prostaglandinas, as quais se difundem pelo parênquima e estimulam receptores nas regiões encefálicas, como a área pré-óptica (*preoptic área*- POA), núcleo paraventricular (*paraventricular nucleus*- PVN) e supraótico (*supraotic nucleus* - SON), conhecidas como regiões envolvidas na febre e respostas neuroendócrinas à ativação imune periférica (KONSMAN *et al.*, 2004).

Trabalhos anteriores nos permitem agrupar informações importantes a respeito do papel do H<sub>2</sub>S na resposta inflamatória. No estudo de Kwiatkoski *et al* (2013), o tratamento combinado de LPS e AOA, revelou que o H<sub>2</sub>S suprime a síntese de PGE<sub>2</sub> na AVPO durante a febre. Além disso, mostrou que este neuromodulador estimula a produção de AMPc, mas somente após a exposição ao LPS. Esta síntese aumentada de AMPc mediada por H<sub>2</sub>S também foi mostrada em outros estudos (KIMURA, 2000; NJIE-MBYE *et al.*, 2012; SHAO *et al.*, 2011). Foi proposto, que tal

efeito estimulador sobre a atividade da adenilato ciclase é mediado por canais  $K_{ATP}$  (NJIE-MBYE *et al.*, 2012) e que o subproduto da adenilato ciclase, o AMPc, foi relatado por aumentar a expressão de CBS em astrócitos (KIMURA *et al.*, 2012). Estudos de Nagai e colaboradores (2004) demonstraram ainda, que o sulfeto de hidrogênio modifica a potenciação de longo prazo do hipocampo e funciona como um neuromodulador.

Diante disso, propusemos investigar o papel do  $H_2S$  durante o comportamento doentio na ativação astrocitária. Para tal, quantificamos a expressão de GFAP no córtex pré-frontal e observamos que animais que receberam LPS apresentaram um aumento da expressão desta proteína e que houve uma tendência no aumento da expressão de GFAP em animais do grupo AOA+LPS. Já o pré-tratamento com sulfeto de hidrogênio, foi capaz de prevenir o aumento da expressão da proteína induzido pelo LPS. Corroborando com nosso resultado, Hu e estudiosos (2007) demonstraram que o sulfeto de hidrogênio preveniu, de forma dose-dependente, a microglia e os astrócitos da inflamação induzida por lipopolissacarídeo. Neste estudo, a análise de *western blotting* mostrou que  $H_2S$  exógeno e endógeno atenuou significativamente o efeito estimulador do LPS na expressão de óxido nítrico sintase induzível e a secreção do fator de necrose tumoral alfa induzida por LPS, outro indicador inflamatório.

Sabe-se que a ativação dos astrócitos pelo LPS é um dos principais eventos para o início e progresso da neuroinflamação. Uma vez ativados, os astrócitos são capazes de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias e iNOS (LU *et al.*, 2010). Corroborando com nossos achados Semmler e colaboradores (2005) demonstraram que ratos machos *wistar* apresentaram um aumento da expressão de GFAP no córtex, hipocampo e mesencéfalo após a administração intraperitoneal de LPS (10mg/ kg), indicando que a inflamação periférica também leva à ativação das células gliais.

É importante salientar que uma das consequências comportamentais observadas após a ativação tanto de microglia quanto de astrócitos é o desenvolvimento do comportamento doentio (DANTZER *et al.*, 2008). Deste modo, podemos afirmar que nossos achados dialogam, pois o aumento da expressão de GFAP nos grupos LPS e AOA+LPS é acompanhado pela alteração do comportamento e o oposto deste achado, é válido para animais do grupo  $NA_2S+LPS$ ,

ou seja, a prevenção da expressão de GFAP neste grupo, é acompanhada pela prevenção do comportamento doentio induzido pelo LPS.

## 6 CONCLUSÃO

- a) O presente trabalho permite-nos concluir, que o LPS induz o comportamento doentio, caracterizado por redução da atividade locomotora e exploratória e da motivação para escapar de situações aversivas, acompanhada pelo aumento de citocinas plasmáticas;
- b) Nossos resultados apontaram que o sistema endocanabinoide, via receptores CB1, não foi capaz de modificar as alterações induzidas pelo LPS. Sendo assim, sugerimos que este, não participa da modulação do comportamento doentio;
- c) Quanto ao H<sub>2</sub>S, podemos sugerir que ele modula o comportamento doentio, prevenindo as alterações comportamentais e a ativação astrocitária induzidas pelo LPS.

## REFERÊNCIAS

ABE, K.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. **J Neurosci**, v. 16, p.1066-1071, 1996.

ADAMCZYK, P. et al. Activation of endocannabinoid transmission induces antidepressant-like effects in rats. **J Physiol Pharmacol.**, v. 59, n. 2. P.217-228,2008.

AVITSUR, R.; YIRMIYA, R. The immunobiology of sexual behavior: gender differences in the suppression of sexual activity during illness. **Pharmacol Biochem Behav.**, Mount Scopus, v. 64, n.4, p.787-796, 1999.

AUBERT, A. Sickness and behavior in animals: a motivational perspective. **Neuroscience and Bio behavioral Reviews** v. 23, p. 1029-1036, 1999.

BAKER, D.; JACKSON, S. J.; Pryce, G. Cannabinoid control of neuroinflammation related to multiple sclerosis. **Br J Pharmacol.** v. 152, p. 649-654, 2007.

BANASIKOWSKI, T.J. et al. Repeated exposure of male mice to low doses of lipopolysaccharide: Dose and time dependent development of behavioral sensitization and tolerance in an automated light–dark anxiety test. **Behav Brain Res.** v. 286, p. 241-248, 2015.

BANKS, W.A.; ERICKSON, M.A. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. **Neurobiology of Disease.** v. 37, p.26-32, 2010.

BARANANO, D.E., FERRIS, C.D.; SNYDER, S.H. Atypical neural messengers. **Trends Neurosci**, v. 24, n.2, p. 99-106, 2001.

BASSI et al. Lipopolysaccharide-Induced Sickness Behavior Evaluated in Different Models of Anxiety and Innate Fear in Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, p. 359-369, 2012.

BATISTA, T.H.; GIUSTI-PAIVA, A.; VILELA, F.C. Maternal protein malnutrition induces autism-like symptoms in rat offspring. **Nutritional Neuroscience**, p. 1-9, 2018.

BENETTI, L.R. et al. Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice in vivo. **Eur J Pharmacol.**, v.698, n.3, p. 463-469, 2013.

BENEDETTI, F. et al. Anti-inflammatory effects of H<sub>2</sub>S during acute bacterial infection: a review. **Journal of Translational Medicine**, 2017.

BIESMANS, S. et al. Systemic Immune Activation Leads to Neuroinflammation and Sickness Behavior in Mice. **Hindawi Publishing Corporation: Mediators of inflammation**, 2013.

BIFULCO M, DI MARZO V. Targetting the endocannabinoid system in cancer therapy: a call for further research. **Nat Med**, v. 8, p. 547-550, 2002.

BISOGNO, T.; LIGRESTI, A.; DI MARZO, V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 81, n. 32, p. 224-238, 2005.

BLATTEIS, C. M. et al. Cytokines, PGE<sub>2</sub> and endotoxic fever: a re-assessment. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, Memphis, v. 76, p.1-18, 2005.

BLATTEIS, C.M. Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacology & Therapeutics**, v.111, p.194 - 223, 2006.

BRAHMACHARI, S.; FUNG, Y. K.; PAHAN, K. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. **J Neurosci**, v. 26, n. 18, p. 4930-4939, 2006.

BLOMQVIST, A.; ENGBLOM, D. Neural Mechanisms of Inflammation-Induced Fever. **Neuroscientist**. v.24, p. 381-399, 2018.

BURNSTOCK, G. Autonomic neurotransmission: 60 years since sir Henry Dale. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 1-30, 2009.

BURRELL, R. Human responses to bacterial endotoxin. **Circ. Shock**, v. 43, n.3, p.137-153, 1994.

CABRAL, L.D.M.; GIUSTI-PAIVA, A. The Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) antagonist capsazepine improves the impaired lung mechanics during endotoxemia. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. 2016.

CAMPOS, D. et al. Increased glutathione levels contribute to the beneficial effects of hydrogen sulfide and inducible nitric oxide inhibition in allergic lung inflammation. **Int Immunopharmacol.**, v. 39, p. 57-62, 2016.

CARLINI, E. A. The good and the bad effects of (-) trans-delta-9-tetrahydrocannabinol (Delta 9-THC) on humans. **Toxicol: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 44, n. 4, p. 461-467, 2004.

CHAOULOFF, F.; DURAND, M.; MORMEDE, P. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in rat light/dark and dark/light tests. **Behav Brain Res**, v. 85, p. 27-35, 1997.

CHEN, W. L. et al. Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of hydrogen sulfide in behavioral models of depression and anxiety. **Behavioural Pharmacology**, v. 24, p. 590-597, 2013.

CHUNYU, Z. et al. The regulatory effect of hydrogen sulfide on hypoxic pulmonary hypertension in rats. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.302, n. 4, p. 810-816, 2003.

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

COTA, D.; MARSICANO, G.; TSCHOP, M. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 423-431, 2003.

DANTZER, R. et al. Cytokines and sickness behavior. **Ann N Y Acad. Sci.** Bordeaux, v.840, p. 586-590, 1998.

DANTZER, R. et al. Molecular basis of sickness behavior. **Ann N Y Acad Sci.** Bordeaux, v. 856, p. 132-138, 1998.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and

implications. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 933, p. 222–234, 2001.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? **Brain, Behavior, and Immunity**, v.15, n.1, p.7-24, 2001.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. **Eur J Pharmacol.** v. 500, p.399- 411, 2004.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 46-56, 2008.

DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. **Immun Allerg Clin North Am.** v. 29, n. 2, p. 247-264, 2009.

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

DE PETROCELLIS, L.; CASCIO, M. G.; DI MARZO, V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, p. 765-774, 2004.

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

DI MARZO, V. et al. Endocannabinoid: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. **Trends in Neurosciences**, v. 21, p. 521-528, 1998.

DI MARZO, V.; BIFULCO, M.; DE PETROCELLIS, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploration. **Nature Reviews**, v. 3, p. 771-784, 2004.

DI MARZO, V.; MATIAS, I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. **Nature Neuroscience**, v. 8, p. 585-589, 2005.

DINARELLO, C. A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. **J Endotoxin Res.**, Denver, v. 10, n. 4, p. 201-222, 2004.

DONATTI, A. F. et al. Anxiolytic-like effect of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in rats exposed and re-exposed to the elevated plus-maze and open field tests. **Neurosci Lett.**, v.642, p.77-85, 2017.

DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, p. 688-693, 2005.

ENGBLOM, D. et al. Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain barrier. **J Mol Med**, Linköping, v. 80, p. 5-15, 2002.

FARINA, C.; ALOISI, F.; MEINL, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. **Trends Immunol**, v. 28, n. 3, p. 138-145, 2007.

FERNÁNDEZ, A.R.F. et al. Cryogenic role of central endogenous hydrogen sulphide in the rat model of endotoxic shock. **Brain Research**, v. 1650, p. 218-223, 2016.

FOX, A. et al. The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. **Pain**, v. 92, p. 91-100, 2001.

FRENOIS, F.; MOREAU, M.; O'CONNOR, J. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 5, p. 516-531, 2007.

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

GRANGER, J.I. et al. Sepsis-induced morbidity in mice: effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain. **Psychoneuroendocrinology**. v. 38, n. 7, p. 1047-1057, 2013.

GRIEBEL, G. et al. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 9, p. 6370–6375, 2002.

GLASS, C. K. et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, v.140, n.6, p.918-934, 2010.

GÓMEZ, R. et al. A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. **J Neurosci.**, v.22, n. 21, p. 9612-9617, 2002.

GUO, W.; CHENG, Z. Y.; ZHU, Y. Z. Hydrogen sulfide and translational medicine. **Acta Pharmacol Sin.**, v. 34, n. 10, p. 1284-1291, 2013.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 12, n. 2, p. 123-137, 1988.

HALLER, J. et al. Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behavior in mice. **Eur J Neurosci.**, v. 19, p. 1906-1912, 2004.

HENRY, C. J.; HUANG, Y.; WYNNE, A. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, 2008.

HERKENHAM, M. et al. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 5, p. 1932-1936, 1990.

HOLLIS, J.H. et al. Central interleukin-10 attenuates lipopolysaccharide-induced changes in food intake, energy expenditure and hypothalamic Fos expression. **Neuropharmacology** v. 58, p. 730-738, 2010.

HORI, T. et al. Hypothalamic mechanisms of pain modulatory actions of cytokines and prostaglandin E2. **Ann N Y Acad Sci**, Fukuoka, v. 917, p. 106-120, 2000.

HU, L.F. et al. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia. **Journal of Neurochemistry**, v. 100, p. 1121-1128, 2007.

HUANG, W.J.; CHEN, W.W.; ZHANG, X. Endocannabinoid system: Role in depression, reward and pain control (Review). **Molecular Medicine Reports**, 2016.

JAMSHIDI, N.; TAYLOR, D. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. **Br J Pharmacol**, v. 134, n. 6, p. 1151, 2001.

JIANG, L.H. et al. Effects of exogenous hydrogen sulfide on apoptosis proteins and oxidative stress in the hippocampus of rats undergoing heroin withdrawal. **Arch Pharm Res.**, v. 34, n. 12, p.2155-2162, 2011.

KASPAREK, M.S. et al. Gasotransmitters in the gastrointestinal tract. **Surgery**, v.143, p.455-459, 2008.

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

KENT, S. et al. Sickness behavior as a new target for drug development. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, n. 1, p. 24-28, 1992.

KENT, S. et al. Mechanisms of sickness-induced decreases in food-motivated behavior. **Neurosci Biobehav Rev**, Stanford, v. 20, n. 1, p. 171-175, 1996.

KIMURA, H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 267, p. 129-133, 2000.

KIMURA, H.; SHIBUYA, N.; KIMURA, Y. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant. **Antioxid. Redox Signal**, v. 17, n. 45-57, 2012.

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

KIRKEDAL, C. et al. A dual inhibitor of FAAH and TRPV1 channels shows dose-dependent effect on depression-like behaviour in rats. **Acta Neuropsychiatr.**, v. 29, n. 6, p. 324-329, 2017.

KLEIN, T.W.; NEWTON, C.; FRIEDMAN, H. Cannabinoid receptors and the cytokine network. **Adv Exp Med Biol.**, v. 437, p. 215-222, 1998.

KLEIN, T.W. Delta 9-tetrahydrocannabinol treatment suppresses immunity and early IFN-gamma, IL-12, and IL-12 receptor beta 2 responses to Legionella pneumophila infection. **J Immunol.**, 2000, v.164, n.12, p.6461-6466, 2000.

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

KOCH, J.E.; MATTHEWS, S.M. Delta9-tetrahydrocannabinol stimulates palatable food intake in Lewis rats: effects of peripheral and central administration. **Nutr Neurosci.**, v. 4, n. 3, p. 179-187, 2001.

KONSMAN, J.P.; VIGUES, S.; MACKERLOVA, L. et al. Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: Relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. **J Comp Neurol.** v. 472, n. 1, p. 113-129, 2004.

KOPF, B.S. et al. Evidence that PGE2 in the dorsal and median raphe nuclei is involved in LPS-induced anorexia in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.99, n.3, p.437-443, 2011.

KRISHNADAS, R.; CAVANAGH, J. Depression: an inflammatory illness? **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 83, n. 5, p. 495-502, 2012.

KWIATKOSKI, M. et al. Hydrogen sulfide as a cryogenic mediator of hypoxia-induced anapnyxia. **Neuroscience**, v. 201, p. 146-156, 2012.

KWIATKOSKI, M. et al. Hydrogen sulfide inhibits preoptic prostaglandin E2 production during endotoxemia. **Exp. Neurol.** v. 240, p. 88-95, 2013.

LAGO, E. et al. Cannabinoids ameliorate disease progression in a model of multiple sclerosis in mice, acting preferentially through CB1 receptor-mediated anti-inflammatory effects. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 2299-2308, 2012.

LENT, R. Neurociência da mente e do comportamento. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, 2008.

LEONARD, B. E. The immune system, depression and the action of antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, Galway, v. 25, p. 767-780, 2001.

LEUSSINK, V.I. Symptomatic therapy in multiple sclerosis: the role of cannabinoids in treating spasticity. **Ther Adv Neurol Disord**, v. 5, n. 5, p. 255-266, 2012.

LI, H.B. et al. Antistress effect of TRPV1 channel on synaptic plasticity and spatial memory. **Biol Psychiatry**. v. 64, p. 286-292, 2008.

LI, R. et al. The effects of apigenin on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuros Letters**. v. 594, p. 17-22, 2015.

LIU, G.X. et al. Reduced Anxiety and Depression-Like Behaviors in Mice Lacking GABA Transporter Subtype 1. **Neuropsychopharm.** v. 32, p. 1531-1539, 2007.

MAKRIYANNIS, A.; MECHOULAM, R.; PIOMELLI, D. Therapeutic opportunities through modulation of the endocannabinoid system. **Neuropharmacology England**, jun. 2005.

MANZANARES, J.; CORCHERO, J.; FUENTES, J.A. Opioid and cannabinoid receptor mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in rats. **Brain Res**, v. 839, p. 173-179, 1999.

MARTIN, G.S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.10, n.6, p.701-706, 2013.

MARTINEZ, M. et al. Does the neuroprotective role of anandamide display diurnal variations? **Int J Mol Sci**, v. 14, p. 23341-23355, 2013.

MARSICANO, G.; LUTZ, B. Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 29, n. 3, p. 27-46, 2006.

MATIAS I, DI MARZO V. Endocannabinoids and the control of energy balance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 18, p. 27-37, 2007.

MERROUN, I. et al. Influence of intracerebroventricular or intraperitoneal administration of cannabinoid receptor agonist (WIN 55,212-2) and inverse agonist (AM 251) on the regulation of food intake and hypothalamic serotonin levels. **Br J Nutr.**, v. 101, n. 10, p. 1569-1578, 2009.

McCUSKER, R.H.; KELLEY, K.W. Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, p.84-98, 2013.

MOLTZ, H. Fever: causes and consequences. **Neurosc BioBehav Rev.** v. 17, p. 237-269, 1993.

MOORE, P.K. et al. Hydrogen sulphide from the smell of the past to the mediator of the future? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 24, p. 609-611, 2003.

MOREIRA, F.A.; WOTJAK, C.T. Cannabinoids and anxiety. **Curr Top Behav Neurosci.**, v.2, p.429-450, 2010.

MORRISON, S.F.; NAKAMURA, K. Central neural pathways for thermoregulation. **Frontiers in Bioscience**, v. 16, p. 74-104, 2011.

MORAIS, H. et al. Anandamide reverses depressive-like behavior, neurochemical abnormalities and oxidative-stress parameters in streptozotocin-diabetic rats: Role of CB1 receptors. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26. p.1590-1600, 2016.

NAGAI, Y. et al. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. **FASEB Journal**, v.18, n.3, p. 557-559, 2004.

NAVARRO, M. et al. Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR141716A induces anxiety-like responses in the rat. **Neuroreport**, v. 8, p. 491-496, 1997.

NJIE-MBYE, Y.F. et al. Mechanism of action of hydrogen sulfide on cyclic AMP formation in rat retinal pigment epithelial cells. **Exp. Eye Res**, v. 98, p. 16-22, 2012.

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

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

NOLDUS, L.P.J.J.; SPINK, A.J.; TEGELENBOSCH, R.A. EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. **Behavior Research Methods, Instruments and Computers**. v.33, n.3, p.398-414, 2001.

NORDEN, D. M. et al. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. **Glia**, v. 64, n. 2, p. 300-316, 2016

O'CONNOR, J.C.; LAWSON, M.A.; ANDRÉ, C. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 5, p. 511–522, 2009.

OLIVEIRA, M.K. et al. Simvastatin attenuated sickness behavior and fever in a murine model of endotoxemia. **Life Sciences**, v. 254, 2020.

OKA, T. et al. Relationship of EP (1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. **J Comp Neurol**, v. 428, n. 1, p. 20-32, 2000.

OKAMOTO, Y. et al. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 5298-5305, 2004.

PADOVAN, C.M.; GUIMARAES, F.S. Behavioral effects in the elevated plus maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: influence of restraint stress. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 67, n.2, p.325-330, 2000.

PAGOTTO U, et al. Normal human pituitary adenomas express cannabinoid receptor type 1 and synthesize endogenous cannabinoid: first evidence for a direct role of cannabinoids on hormone modulation at the human pituitary level. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, p. 287-2696, 2001. 2006

PAGOTTO, U. et al. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. **Endocrine Reviews**, v. 27, p. 73-100, 2006.

PAIVA, N. P.; GIUSTI-PAIVA, A. Influência do sistema endocanabinóide sobre o *sickness behavior* induzido pela endotoxemia em ratos. **Dissertação de Mestrado**, 2013.

PANIKASHVILI D, et al. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. **Nature**, v. 413, p.527-531, 2001.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 5<sup>a</sup> ed. **New York: Academic Press**, 2005.

PATEL, S. et al. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress induced activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. **Endocrinology**, v. 145, p. 5431-5438, 2004.

PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. **J. Pathol**, v. 204, n.4, p. 428-437, 2004.

PENÃ, M.C.S. et al. Activational role of cannabinoids on movement. **European Journal of Pharmacology**, v. 391, p. 269-274, 2000.

PESTONJAMASP, V. K; BURSTEIN, S. H. Anandamide synthesis is induced by arachidonate mobilizing agonists in cells of the immune system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1394, p. 249-260, 1998.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 11, p. 873-884, 2003.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 229, n. 2, p. 327-36, 1977.

RAWLS, S. M. et al. GABA<sub>A</sub> receptors modulate cannabinoid-evoked hypothermia. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 78, p. 83-91, 2004.

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

RIVEST, S. How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n.8, p. 761-788, 2001.

ROMANOVSKY, A.A. Thermoregulatory manifestations of systemic inflammation: lessons from vagotomy. **Auton Neurosci**. v.85, n. 1-3, p. 39-48, 2000.

ROMANOVSKY, A. A. Signaling the brain in the early sickness syndrome: are sensory nerves involved? **Front Biosci. Phoenix**, v. 9, p. 494-504, 2004.

ROMANOVSKY, A. A. et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recente discoveries and revisions. **Front Biosci.**, Phoenix, v. 10, p. 2193-2216, 2005.

ROMANOVSKY, A. A.; STEINER, A. A.; MATSUMURA, K. Cells that trigger fever. **Cell Cycle**, Phoenix, v. 5, p. 2195-2197, 2006.

RODNIGHT, R. et al. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 3, p. 325-338, 1997.

RORATO, R. et al. Cholecystokinin and hypothalamic corticotrophin-releasing factor participate in endotoxin-induced hypophagia. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 4, p. 439-450, 2010.

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

RUSSO, C.D. et al. Evidence that hydrogen sulphide can modulate hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: in vivo and in vitro studies in the rat. **J. Neuroendocrinol.**, v.12, p. 225-233, 2000.

SAITO, V. M.; WOTJAK, C. T.; MOREIRA, F. A. Exploração farmacológica do sistema endocanabinóide: novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, p. 557-514, 2010.

SHAO, J.L. et al. H<sub>2</sub>S protects hippocampal neurons from anoxia-reoxygenation through cAMP-mediated PI3K/Akt/p70S6K cell-survival signaling pathways. **J Mol Neurosci**, v. 43, p.453-460, 2011.

SEMMLER, A. et al. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. **J Chem Neuroanat**, v. 30, n. 2, p.144-157, 2005.

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

SINK, K. S. et al. The novel cannabinoid CB1 receptor neutral antagonist AM4113 suppresses food intake and food-reinforced behaviour but does not induce signs of nausea in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 946-955, 2008.

SONCINI, R. et al. Dipyrone attenuates acute sickness response to lipopolysaccharide in mice. **Neurosci Lett**, v. 516, n. 1, p. 114-118, 2012.

STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. Fever and anapyrexia in systemic inflammation: intracellular signaling by cyclic nucleotides. **Front Biosci**, Phoenix, v. 8, p. S1398-1408, 2003.

TAMAKI, Y.; NAKAYAMA, T. Effects of air constituents on thermosensitivities of preoptic neurons: hypoxia versus hypercapnia. **Pflug. Arch**, v. 409, p. 1-6, 1987.

TANG, X. Q. et al. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity. **Neurotox Res.**, v.19, n. 3, p. 403-411, 2011.

TANG, Z.J. et al. Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of hydrogen sulfide in streptozotocin-induced diabetic rats through inhibition of hippocampal oxidative stress. **Behav Pharmacol.**, v.26, n.5, p.427-435, 2015.

TAZAWA, R. et al. Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 203, p. 190-199, 1994.

THIEMANN, G. et al. Modulation of anxiety by acute blockade and genetic deletion of the CB(1) cannabinoid receptor in mice together with biogenic amine changes in the forebrain. **Behav Brain Res.**, v. 200, n. 1, p. 60-67, 2009.

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

TURNBULL, A.V.; LEE, S.; RIVIER, C. Mechanisms of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stimulation by immune signals in the adult rat. **Ann N Y Acad Sci.** v. 840, p. 434-443, 1998.

TREZZA, V.; VANDERSCHUREN, L. J. Bidirectional cannabinoid modulation of

social behavior in adolescent rats. **Psychopharmacology**, v. 197, n. 2, p. 217-227, 2008.

VERTY, A.; MCGREGOR, I.; MALLET, P. The dopamine receptor antagonist SCH 23390 attenuates feeding induced by  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol. **Brain Res**, v. 1020, n. 1-2, p. 188-95, 2004.

VERTY, A. et al. Consumption of high carbohydrate, high fat, and normal chow is equally suppressed by a cannabinoid receptor antagonist in non-deprived rats. **Neurosci Lett**, v. 354, n. 3, p. 217-220, 2004.

VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nat Rev Neurosci**, v.6, n.8, p.626-40, 2005.

WAGNER, J. A. et al. Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid CB1 receptors. **The European Journal of Pharmacology**, v. 423, p. 203-210, 2001.

WANG, R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? **FASEB J.**, v.16, p. 1792-1798, 2002.

WHITEMAN, M. et al. The effect of hydrogen sulphide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. **Antioxid. Redox. Signal**, v. 12, p. 1147-1154, 2010.

WENGER, T. et al. The central cannabinoid receptor inactivation suppresses endocrine reproductive functions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 284, p. 363-368, 2001.

WEI, H. J. et al. Hydrogen sulfide inhibits homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal apoptosis in rat hippocampus via upregulation of the BDNF-TrkB pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.35, p. 707-715, 2014.

WILLIAMS, C.M.; KIRKHAM, T.C. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. **Psychopharmacology (Berl)**, v.143, n. 3, p. 315-317, 1999.

WU, W. et al. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by cAMP response element and mRNA stability in a human airway epithelial cell line exposed to zinc. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, v. 231, p. 260-266, 2008.

YEE, J. R.; PRENDERGAST, B. J. Endotoxin elicits ambivalent social behaviors. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 7, p. 1101-1105, 2012.

YORULMAZ, H. et al. Effect of simvastatin on mitochondrial enzyme activities, ghrelin, hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in hepatic tissue during early phase of sepsis. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 3, p. 3640-3650, 2015.

ZHANG, J.; RIVEST, S. Metabolites in the Brain During Systemic Infection: Is Survival Possible Without Arachidonate? **Physiology**, v. 18, p. 137-142, 2003.

## ANEXO A- CARTA DE APROVAÇÃO CEUA 30/2016



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
**Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG**  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG CEP 37130-000  
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Participação do sistema endocanabinóide sobre o sickness behavior em ratos", registrada com o nº 30/2016, sob a responsabilidade de Alexandre Giusti Paiva – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS, em 26/09/2016.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 26/09/2016 a 30/08/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	630
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 27 de setembro de 2016.

*Estela Regina de Oliveira*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Estela Regina de Oliveira  
 Coordenadora CEUA-UNIFAL

## ANEXO B- CARTA DE APROVAÇÃO CEUA 40/2018



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG  
 Rua Gabriel Monteiro de Silva, 759 - Alfenas/MG - CEP 37130-002  
 Fone: (35) 3299-1000 Fax: (35) 3299-1062

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



### CERTIFICATE

We hereby certify that the proposal entitled "The role of hydrogen sulfide on behavioral and neuroimunoendocrine changes during endotoxemia in rats", registration number 40/2018, under the responsibility of Alexandre Giusti Paiva, which implies production, maintenance or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans), for the purpose of scientific research (or teaching), is in compliance with Law no. 11794, published on October 8<sup>th</sup>, 2008, with Decree no. 6899, published on July 15<sup>th</sup>, 2009, and with the guidelines issued by the National Council on the Control of Animal Experimentation (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA), and was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA-UNIFAL) (Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas).

Purpose: ( ) Teaching	(X) Scientific research
Expiration date	05/01/2020
Species/strain/breed	Wistar rat / Outbred
Number of animals	276
Sex	Male
Origin	Central Vivarium UNIFAL-MG

Alfenas, December 07, 2018.

Leonardo Augusto de Almeida PhD  
 CEUA/UNIFAL Coordinator

## ANEXO C- TABELAS ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tabela 1 - Análise de Variância de uma via para o Teste de Ingestão Alimentar, em animais tratados com veículo ou LPS (Valor de F).

<b>Parâmetros</b>	<b>6 horas</b>	<b>24 horas</b>
<b>Ingestão alimentar(g)</b>	F <sub>3,16</sub> =6,266 P=0,0051	F <sub>3,16</sub> =33,57 P<0,0001

Fonte - da autora.

Tabela 2 - Análise de Variância de uma via para o Teste de Campo Aberto, em animais tratados com veículo ou LPS (Valor de F).

<b>Parâmetros</b>	<b>Distância percorrida</b>	<b>Tempo de Imobilidade</b>
<b>2 horas</b>	F <sub>3,31</sub> =9,823 P=0,0001	F <sub>3,31</sub> =4,833 P<0,0076

Fonte - da autora.

Tabela 3 - Análise de Variância de uma via para o Teste de Interação Social, em animais tratados com veículo ou LPS (Valor de F).

<b>Parâmetros</b>	<b>Tempo de Imobilidade</b>
<b>2 horas</b>	F <sub>3,20</sub> =21,65 P<0,0001

Fonte - da autora.

Tabela 4 - Análise estatística - Teste *t student's* para o Teste de Nado Forçado, em animais tratados com veículo ou LPS.

<b>Parâmetros</b>	<b>Tempo de <i>floating</i></b>	<b>Tempo de <i>Climbing</i></b>	<b>Tempo de <i>swimming</i></b>
<b>Salina</b>	39,13 ± 5,397	58,13 ± 11,39	181,3 ± 9.625
<b>200 µg/Kg</b>	106,5 ± 11,06	51 ± 7,531	138 ± 7

Fonte - da autora.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG**  
**Pró-Reitoria de Graduação**



**CERTIFICADO**

Certificamos que a acadêmica Danyelle Silva Amaral do curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, defendeu o Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “PARTICIPAÇÃO DA VIA HEMEOXIGENASE/CO NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DURANTE A ENDOTOXEMIA INDUZIDA POR LPS”, sob a orientação da Profa. Merelym Ketterym de Oliveira, e assim concluiu a disciplina TCC II, tendo sido aprovada.

A banca Examinadora foi constituída pela Profa. Merelym Ketterym de Oliveira (Presidente) e pelos membros titulares Profa. Tatiane Helena Batista e Profa. Viviana Carolina Trujillo Rojas.

Alfenas, 17 de Dezembro de 2019.

Prof. Dr. Vinícius Vinícius Xavier da Silva  
Comissão do TCC - Ciências Biológicas

Prof. Dra. Lívia Maria Rosatto Moda  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas Bacharelado

## CERTIFICADO

Certificamos que a acadêmica **Ana Carolina dos Santos Machado** do Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, defendeu o Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “**Participação do Sistema Purinérgico sobre o Comportamento Doentio em ratos**” sob a orientação da **Ms. Merelym Ketterym de Oliveira**, e assim concluiu a disciplina de TCC II. A banca examinadora foi realizada no dia 23 de agosto de 2019 e constituída pela **Ms. Merelym Ketterym de Oliveira (Presidente)** e pelos membros titulares **Ms. Fernando Vitor Vieira** e **Ms. Viviana Carolina Trujillo Rojas**.

Alfenas, 23 de agosto de 2019



Prof. Dra . Andrea M. Amarante Paffaro  
Presidente da Comissão de TCC do Curso de Biomedicina