

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL- MG**

**MERELYM KETTERYM DE OLIVEIRA**

***SICKNESS BEHAVIOR* EM CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM  
INIBIDOR DA HMG-CoA REDUTASE**

**Alfenas/MG**

**2016**

**MERELYM KETTERYM DE OLIVEIRA**

***SICKNESS BEHAVIOR* EM CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM  
INIBIDOR DA HMG-CoA REDUTASE**

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

Área de concentração:  
Neuroimunoendocrinologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva.

**Alfenas/MG**

**2016**

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

Oliveira, Merelym Ketterym de.

Sickness Behavior em camundongos pré-tratados com inibidor da HMG-CoA Redutase. / Merelym Ketterym de Oliveira -- Alfenas/MG, 2016.

92 f.

Orientador: Alexandre Giusti-Paiva.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Comportamento de Doença. 2. Sinvastatina. 3. Endotoxemia.  
I. Paiva, Alexandre Giusti. II. Título.

CDD-571

MERELYM KETTERYM DE OLIVEIRA

**SICKNESS BEHAVIOR EM CAMUNDONGOS PRÉ-TRATADOS COM  
INIBIDOR DA HMG-CoA REDUTASE**

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

Aprovado em: 14.03.2016

Professor: Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Instituição: UNIFAL-MG

Professor: Dr. Marcelo Lourenço da Silva

Instituição: UNIFAL-MG

Professora: Dra. Carla Speroni Ceron

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



Assinatura:



Assinatura:



Dedico a finalização desta etapa da minha vida à Deus e aos meus pais, 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, deram broncas e me acolheram quando o mundo virou as costas para os meus problemas.

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 Mestre estaria limitado se tivesse que cuidar do Luiz Gustavo sem sua ajuda.

Ao meu filho Luiz Gustavo, por ser minha inspiração e abrilhantar minha vida com seu carinho!

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.

À Dr<sup>a</sup>. Fabiana Giusti, Mara Ávila, Sílvia Enes, Ana Laura Carvalho, Wesley Fernandes, Tatiane Helena, Vanessa Veronesi, Ana Cláudia e Luciana Costa pelo apoio, confraternizações, cafés e pela paciência. Em especial, agradeço a Layla Cabral, que se dedicou a me ensinar sem medir esforços, sempre pronta a ajudar, você ocupa um lugar especial em meu coração, nunca conseguirei retribuir tudo que fez por mim. Aos companheiros de laboratório, Rafaela Santos, por ser minha amiga e sempre me apoiar (amodoro você) e Hérick Oliveira, pelos dias em ótima companhia em Belo Horizonte e pelas horas de risadas, que foram muitas!

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

À UNIFAL e FAPEMIG, pelo apoio financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas, por tornar-me mestre.

## RESUMO

Comportamento doentio (*sickness behavior*) é a expressão usada para definir o conjunto das alterações comportamentais que são desencadeadas durante um processo infeccioso. Além disso, estas alterações são consideradas como respostas adaptativas do animal com a finalidade de combater a infecção, propiciando desta forma, um ambiente apropriado ao estabelecimento de uma resposta imune eficaz e desfavorável ao patógeno. Diversos estudos tem abordado os efeitos pleiotrópicos da sinvastatina, isto é, efeitos que estão além de sua função hipocolesterolêmica. Dentre estes efeitos, podemos citar sua ação antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora e antitrombogênica. Partindo dessas assertivas, o intuito deste trabalho foi investigar a influência da sinvastatina sobre o comportamento doentio. Inicialmente, testamos as doses de 100, 200 e 500 µg/Kg de lipopolissacarídeo (LPS), 2, 6 e 24 horas após a aplicação. Feito isso, os camundongos *Swiss* foram pré-tratados durante sete dias com veículo ou Sinvastatina 10 mg/Kg ou Sinvastatina 40 mg/Kg através de gavagem (p.o.) e no oitavo dia, receberam a dose de 200 µg/kg de LPS ou solução salina (i.p.) e as respostas comportamentais foram avaliadas após 2 horas. Nos camundongos pré-tratados com a sinvastatina 10 mg/Kg, não observamos diferença significativa em relação ao grupo veículo+LPS em nenhum dos aparatos e parâmetros analisados. Contudo, nos animais pré-tratados com a sinvastatina 40 mg/Kg observou-se redução do tempo de latência e aumento no número de cruzamentos e do tempo de permanência no lado claro no Teste Claro-Escuro, diminuição do número de *floatings* no Nado Forçado e do tempo de imobilidade no Teste de Suspensão pela Cauda e aumento do número de cruzamentos centrais, periféricos e totais e de *rearings* no Teste de Campo Aberto. Quanto aos níveis séricos das citocinas dosadas, notamos que o pré-tratamento com a sinvastatina nas doses de 10 e 40 mg/Kg, não foi capaz de atenuar o aumento de TNF- $\alpha$  induzido pelo LPS, todavia, as concentrações plasmáticas de IL-1 $\beta$ , apresentaram-se aumentadas com o pré-tratamento com a sinvastatina 10 mg/Kg e reduzidas quando os animais foram pré-tratados com a sinvastatina 40 mg/Kg. Na telemetria, pudemos notar uma hipotermia branda seguida de febre em animais que receberam veículo+LPS e sinvastatina

10+LPS. Já em animais que receberam sinvastatina 40+LPS, observamos a hipotermia, porém não seguida de quadro febril. Estes resultados demonstram que o pré-tratamento com a sinvastatina 40 mg/Kg (durante 7 dias), antes de aplicação i.p. de LPS, é capaz de modificar as respostas comportamentais ao desafio imunológico, sugerindo que este fármaco influencia a manifestação do comportamento doentio durante a endotoxemia.

Palavras-chave: Comportamento doentio. Sinvastatina. Endotoxemia.

## ABSTRACT

Sickness behavior is the term used to define the set of behavioral changes that are triggered during an infectious process. Furthermore, these changes are considered the animal's adaptive responses in order to fight the infection, providing thereby an environment suitable for the establishment of an effective and unfavorable immune response to the pathogen. Several studies have addressed the pleiotropic effects of simvastatin, ie, effects that are beyond their hypocholesterolemic function. Among these effects, we can mention its antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory and anti-thrombogenic action. Based on these assertions, the aim of this study was to investigate the influence of simvastatin on the sickness behavior. Initially, we tested doses of 100, 200 and 500  $\mu\text{g} / \text{kg}$  of lipopolysaccharide (LPS), 2, 6 and 24 hours after application. Then, the Swiss mice were pre-treated for seven days with vehicle or Simvastatin 10  $\text{mg}/\text{kg}$  or Simvastatin 40  $\text{mg}/\text{kg}$  via gavage (p.o.) and on the eighth day, they received a dose of 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  LPS or solution saline (i.p.) and behavioral responses were evaluated after 2 hours. In mice pretreated with simvastatin 10  $\text{mg}/\text{kg}$ , no significant difference from the vehicle+LPS group in any of the apparatuses and analyzed parameters. However, in animals pretreated with simvastatin 40 $\text{mg}/\text{kg}$  there was a reduction of latency and increase in the number of crossings and the time spent in the light side in Bright-Dark Test, decreased floatings number in Forced Swimming and the immobility time in Tail Suspense Test and increased number of central, peripheral and total crossings and rearings in Open Field Test. The serum levels of the measured cytokines, we note that pre-treatment with simvastatin at doses of 10 and 40  $\text{mg}/\text{kg}$ , was not able to attenuate the increase in TNF- $\alpha$  induced by LPS, however, the plasma concentrations of IL- 1 $\beta$  showed increased up to the pre-treatment with simvastatin 10  $\text{mg}/\text{kg}$  and reduced when animals were pre-treated with simvastatin 40  $\text{mg}/\text{kg}$ . In telemetry, we noticed a mild fever followed by hypothermia in animals that received LPS+vehicle and simvastatin 10+ LPS. Already in animals that received simvastatin 40+LPS, hypothermia observed but is not followed by fever. These results demonstrate that pre-treatment with simvastatin 40 $\text{mg}/\text{kg}$  (for 7 days) before application i.p. LPS is able to modify the

behavioral responses to immune challenge, suggesting that this drug influences the manifestation of sickness behavior during endotoxemia.

Keywords: Sickness behavior. Simvastatin. Endotoxemia.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenvolvimento de febre após infecção.....	24
Figura 2 - Diversas estatinas e sua homologia com a molécula de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A.....	26
Figura 3 - Via de síntese do colesterol.....	27
Figura 4 - Fórmula estrutural da simvastatina.....	29
Figura 5 - Imagens do Teste Claro-Escuro.....	35
Figura 6 - Imagens do Teste de Campo Aberto.....	37
Figura 7 - Receptor de telemetria ( <i>Data Science</i> ) conectado ao computador.....	37
Figura 8 - Transmissor de temperatura (probe) / Demonstração do programa utilizado para coleta dos dados de temperatura, os quais são exibidos graficamente no monitor e armazenados em arquivo digital.....	38
Figura 9 - Efeitos do LPS sobre o Teste Claro-Escuro, analisado 2 horas após aplicação de LPS.....	41
Figura 10 - Efeitos do LPS sobre o Teste Claro-Escuro, analisado 6 horas após aplicação de LPS.....	42
Figura 11 - Efeitos do LPS sobre o Teste Claro-Escuro, analisado 24 horas após aplicação de LPS.....	43
Figura 12 - Efeitos do LPS sobre o Teste Nado Forçado, analisado 2 horas após aplicação de LPS.....	44
Figura 13 - Efeitos do LPS sobre o Teste Nado Forçado, analisado 6 horas após aplicação de LPS.....	45
Figura 14 - Efeitos do LPS sobre o Teste Nado Forçado, analisado 24 horas após aplicação de LPS.....	45
Figura 15 - Efeitos do LPS sobre o Teste de Suspensão pela Cauda, analisados 2, 6 e 24 horas após aplicação de LPS.....	46
Figura 16 - Efeitos do LPS sobre o Teste de Campo Aberto, analisado 2 horas após aplicação de LPS.....	47

Figura 17 - Efeitos do LPS sobre o Teste de Campo Aberto, analisado 6 horas após aplicação de LPS.....	48
Figura 18 - Efeitos do LPS sobre o Teste de Campo Aberto, analisado 24 horas após aplicação de LPS.....	49
Figura 19 - Efeitos do LPS sobre o número de <i>rearings</i> no Teste de Campo Aberto, analisados 2, 6 e 24 horas após aplicação de LPS.....	50
Figura 20 - Efeito do pré-tratamento com a sinvastatina 10 mg/Kg sobre o Teste Claro-escuro durante endotoxemia.....	51
Figura 21 - Efeito do pré-tratamento com a sinvastatina 40 mg/Kg sobre o Teste Claro-escuro durante endotoxemia.....	52
Figura 22 - Efeito do pré-tratamento com a sinvastatina nas doses de 10 e 40 mg/Kg sobre o Teste de Nado Forçado pela cauda durante endotoxemia.....	53
Figura 23 - Efeito do pré-tratamento com a sinvastatina nas doses de 10 e 40 mg/Kg sobre o Teste de Suspensão pela Cauda pela cauda durante endotoxemia.....	54
Figura 24 - Efeito do pré-tratamento com a sinvastatina 10 mg/Kg sobre o Teste de Campo Aberto durante endotoxemia.....	55
Figura 25 - Efeito do pré-tratamento com a sinvastatina 40 mg/Kg sobre o Teste de Campo Aberto durante endotoxemia.....	56
Figura 26 - Efeitos do pré-tratamento com a sinvastatina 40 mg/Kg sobre a temperatura corporal durante a endotoxemia.....	58
Figura 27 - Índice térmico em animais pré- tratados com sinvastatina 40mg/Kg.....	59
Figura 28 - Concentração plasmática de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ , em animais pré-tratados com sinvastatina 10mg/Kg.....	60
Figura 29 - Concentração plasmática de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ , em animais pré-tratados com sinvastatina 40mg/Kg.....	61
Figura 30 - Indução do <i>Sickness Behavior</i> .....	89
Figura 31 - Efeito do pré-tratamento com a sinvastatina sobre o <i>Sickness Behavior</i> .....	90
Figura 32 - Efeito do pré-tratamento com a sinvastatina sobre a febre induzida pela endotoxemia.....	90

Figura 33 - Efeito do pré-tratamento com a sinvastatina sobre a concentração de citocinas plasmáticas durante endotoxemia.....	91
--	----

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	- Dose e horário de aplicação de LPS.....	33
Quadro 2	- Pré-tratamento com sinvastatina ou veículo e Tratamento com LPS ou veículo.....	34
Tabela 1	- Análise de Variância de uma via para o Teste Claro-Escuro em animais tratados com veículo ou LPS (Valor de F).....	85
Tabela 2	- Análise de Variância de uma via para o Teste Campo Aberto em animais tratados com veículo ou LPS (Valor de F).....	85
Tabela 3	- Análise de Variância de uma via para o Teste de Suspensão pela Cauda em animais tratados com veículo ou LPS (Valor de F).....	85
Tabela 4	- Análise de Variância de uma via para o Teste de Nado Forçado em animais tratados com veículo ou LPS (Valor de F).....	85
Tabela 5	- Análises de variância de duas vias no Teste Claro-Escuro, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 10mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	86
Tabela 6	- Análises de variância de duas vias no Teste Claro-Escuro, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 40mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	86
Tabela 7	- Análises de variância de duas vias no Teste Campo Aberto, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 10mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	86
Tabela 8	- Análises de variância de duas vias no Teste Campo Aberto, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 40mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	87

Tabela 9 - Análises de variância de duas vias no Teste de Suspensão pela Cauda, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 10 ou 40mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	87
Tabela 10 - Análises de variância de duas vias no Teste de Nado Forçado, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 10 ou 40mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).....	87
Tabela 11 - Análises de variância de duas vias, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 10 mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico) na dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .....	88
Tabela 12 - Análises de variância de duas vias, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 40 mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico) na dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .....	88
Tabela 13 - Análises de variância de duas vias, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 40 mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico) - área sobre a curva (índice térmico).....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS

APO/HA	-	Área pré-óptica
AUC	-	Área sobre a curva
AVP	-	Vasopressina
BHE	-	Barreira Hematoencefálica
cm	-	centímetros
COX 2	-	Ciclooxigenase 2
CRF	-	Fator liberador de corticotrofina
Dimetilalil-PP	-	Dimetilalil pirofosfato
ETs	-	Endotelinas
EUA	-	Estados Unidos da América
FDA	-	<i>Food and Drug Administration</i>
FPP	-	Farnesil pirofosfato
g	-	gramas
GDP	-	Guanosina Difosfato
Geranil-PP	-	Geranil pirofosfato
GGPP	-	Geranilgeranil pirofosfato
GTP	-	Guanosina Trifosfato
GTPase	-	Guanosina Trifosfato Hidrolase
h	-	Horas
HDL	-	Lipoproteínas de alta densidade
HMG	-	3-hidróxi-3-metilglutaril
HMG-CoA	-	3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A
HMG-CoA Redutase	-	3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A Redutase
i.c.v.	-	Intracerebroventricular
i.p.	-	Intraperitoneal
IL-10	-	Interleucina-10
IL-1ra	-	Antagonista do receptor de Interleucina 1
IL-6	-	Interleucina-6
INF- $\gamma$	-	Interferon-gama
iNOS	-	Óxido nítrico sintetase induzível

Isopentenil-PP	-	Isopentenil pirofosfato
L-arginina/NO/GMPc	-	L-argininina/Óxido nítrico/GMPcíclico
LBP	-	Proteína de ligação ao lipopolissacarídeo
LDL	-	<i>Low Density Lipoprotein</i>
IL-1 $\beta$	-	Interleucina-1 Beta
LPS	-	Lipopolissacarídeo
m	-	Metro
ml/Kg	-	mililitro por Kilograma
NF- $\kappa$ B	-	fator nuclear kappa B
NMDA	-	N-metil-D-aspartato
° C	-	Graus Celsius
p.o.	-	Gavagem
PGE2	-	Prostaglandina E2
PPAR- $\gamma$	-	<i>Peroxisome proliferator-activated-gamma</i>
s	-	Segundos
Sinv.	-	Sinvastatina
SNC	-	Sistema Nervoso Central
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>
VLDL	-	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
$\alpha$ -MSH	-	Hormônio Estimulante $\alpha$ -melanócitos
$\mu$ g/Kg	-	Micrograma por Kilograma

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
2.1	COMPORTAMENTO DOENTIO.....	20
2.2	ESTATINAS.....	25
2.3	SINVASTATINA.....	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1	ANIMAIS.....	32
4.2	SUBSTÂNCIAS.....	32
4.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	32
<b>4.3.1</b>	<b>Indução do <i>sickness behavior</i> por aplicação de lps.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Pré-tratamento com sinvastatina.....</b>	<b>33</b>
4.4	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	34
<b>4.4.1</b>	<b>Claro-escuro.....</b>	<b>34</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Nado forçado.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Suspensão pela cauda.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Campo aberto.....</b>	<b>36</b>
4.5	TEMPERATURA CORPORAL.....	37
4.6	DOSAGEM DE CITOCINAS.....	39
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
5.1	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LPS SOBRE O COMPORTAMENTO.....	40
<b>5.1.1</b>	<b>Claro-escuro.....</b>	<b>40</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Nado forçado.....</b>	<b>43</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Suspensão pela cauda.....</b>	<b>46</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Campo aberto.....</b>	<b>46</b>

5.2	INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM SINVASTATINA NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS À ENDOTOXEMIA.....	50
5.2.1	<b>Claro-escuro</b> .....	50
5.2.2	<b>Nado forçado</b> .....	52
5.2.3	<b>Suspensão pela cauda</b> .....	53
5.2.4	<b>Campo aberto</b> .....	54
5.3	INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM SINVASTATINA NA FEBRE INDUZIDA POR LPS.....	56
5.4	INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM SINVASTATINA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS PLASMÁTICAS DURANTE A ENDOTOXEMIA.....	59
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	62
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	70
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	71
	<b>APÊNDICES</b> .....	85
	<b>ANEXO</b> .....	92

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos de Burrell nos mostram que injeções periféricas de Lipopolissacarídeo (LPS- componente da parede celular de bactérias gram-negativas), mimetizam várias das respostas de fase aguda observadas nas infecções sem causar infecção do hospedeiro. Sendo assim o LPS é reconhecido pelo sistema imune como um patógeno e é capaz de produzir a inflamação (BURRELL, 1994).

A ativação do sistema imune em resposta a esta infecção mimetizada, produz alterações neuroendócrinas como: alterações da secreção hormonal, supressão do apetite (anorexia), febre, anedonia, e comportamentais: sonolência, redução da atividade motora, redução da atividade exploratória e o estado depressivo. O conjunto destas alterações, que levam o animal a um quadro típico, que chamamos de comportamento doentio (*sickness behavior*) (DANTZER et al., 2001).

Ramachandra et al., (1992) descreve que em resposta a um estímulo infeccioso (administração de endotoxinas), o sistema imune desencadeia a produção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e conforme elucidado por Turnbull e Rivier (1999), durante o desenvolvimento deste processo inflamatório/infeccioso, a produção das citocinas, apresenta-se extremamente elevada.

Atualmente, as estatinas (proveniente da cultura de fungos) têm sido amplamente estudadas, pois possuem como propriedade comum, a inibição da síntese do colesterol endocelular (GIANNINI et al., 1999). O colesterol é incorporado ao organismo através da alimentação ou sintetizado a partir da acetil-CoA e tem como precursor o mevalonato. As estatinas competem com a enzima HMG-CoA redutase, impedindo que o HMG-CoA se transforme em ácido mevalônico, que normalmente é transformado em colesterol após sucessivas reações (GIUSTI-PAIVA et al., 2004).

Os cinco agentes hipolipêmicos mais importantes, clinicamente, dentro desse grupo são: a atorvastatina, a fluvastatina, a lovastatina, a pravastatina e a sinvastatina (CARVALHO; CAMPO, 2007).

O fármaco sinvastatina, alvo de nosso estudo, além de sua função na via biossintética do colesterol, possui ação anti-inflamatória. Ela é capaz de modificar as interações entre o endotélio e os leucócitos, alterando as respostas dessas células e também modula a sinalização das células inflamatórias, repercutindo na redução da liberação de citocinas e de proteínas da fase aguda da inflamação (GIANNINI et al., 1999).

Diante dessas assertivas a respeito da ação anti-inflamatória das estatinas e sabendo que injeções periféricas de LPS mimetizam uma infecção gerando um processo inflamatório, este estudo permitiu investigar o efeito do pré-tratamento com a sinvastatina sobre o comportamento doentio induzido por endotoxemia.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir, será explicitado o que a literatura relata sobre o assunto em questão. A revisão bibliográfica foi dividida em: Comportamento doentio; Estatinas; Sinvastatina.

### 2.1 COMPORTAMENTO DOENTIO

Lipopolissacarídeo é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas, o qual é reconhecido por células imunes. Estruturalmente é constituído por uma unidade glicídica associada ao lipídio A (centro biologicamente ativo da molécula). Como esta toxina é apolar, seu transporte na corrente sanguínea ocorre por lipoproteínas de alta densidade (HDL), ocorrendo desta forma a formação do complexo HDL-LPS, o qual desempenha papel importante na modulação da resposta imunológica (FREUDENBERG et al., 2001).

Injeções periféricas desta toxina são capazes de mimetizar uma infecção, gerando um processo inflamatório (BURRELL, 1994). Ao ser reconhecido por células do sistema imune, o LPS estimula a liberação de citocinas como: interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6); mediadores pró-inflamatórios como: prostaglandinas (PG), histamina e serotonina (KELMER, 2009); óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e ciclooxigenase 2 (COX 2) (NISHIO et al., 2013). A produção das citocinas apresenta-se extremamente elevada durante o desenvolvimento de um processo inflamatório ou infeccioso (TURNBULL; RIVIER, 1999).

A liberação destes mediadores, leva informações ao cérebro, alcançando direta ou indiretamente neurônios e células de apoio (micróglia e astrócitos) e promove alterações no sistema nervoso autônomo e endócrino, de forma a regular a resposta do indivíduo à infecção (MARTIN et al., 2013).

Com a ativação do sistema imune, algumas respostas são desencadeadas como: ativação do sistema complemento e do eixo HHA

resultando em aumento da produção de glicocorticóides, leucocitose, alterações metabólicas, aumento da produção de proteínas de fase aguda (haptoglobina, proteína C-reativa, ceruloplasmina e outras), redução da concentração plasmática de ferro e zinco e aumento da concentração de cobre, anorexia e febre (BLATTEIS, 2006; TURNBULL; RIVIER, 1999).

Estas respostas estimuladas com a ativação das células do sistema imune são denominadas respostas de fase-aguda (KUSHNER,1988), elas são seguidas por inibição da secreção de alguns hormônios em uma fase tardia, como por exemplo a vasopressina (AVP) (CARNIO et al., 2006; GIUSTI-PAIVA et al., 2002). Os mecanismos que controlam a secreção destes hormônios ainda não estão muito bem esclarecidos, mas é sabido que a produção de neuromoduladores inibitórios no hipotálamo é responsável pela diminuição da secreção de hormônios neurohipofisários durante a fase inicial e inibição da secreção destes hormônios numa fase tardia (GIUSTI-PAIVA et al., 2002; MORETO et al., 2006).

Estudos da década de 90 foram importantes para o melhor entendimento das alterações comportamentais decorrentes da resposta de fase aguda, frente a patógenos. Johnson et al., (1993) conseguiram demonstrar que a magnitude das respostas comportamentais dependiam do local de atuação do LPS. Ele constatou que o LPS quando administrado intraperitonealmente (i.p.), em pássaros, era capaz de reduzir a ingestão de alimentos e as concentrações plasmáticas de ferro e zinco, mas de aumentar a sonolência e a concentração plasmática de corticosterona. O pesquisador também aplicou a toxina intracerebroventricularmente (i.c.v.) e observou que as respostas desencadeadas eram alteradas quando a administração era central.

As citocinas são moléculas protéicas grandes e hidrofílicas que não atravessam a barreira hematoencefálica (BHE). Trabalhos anteriores elucidaram que a sinalização das citocinas na corrente sanguínea se dá por diferentes mecanismos, pois elas são capazes de atingir o sistema nervoso central (SNC) através de transportadores específicos localizados na barreira hematoencefálica ou podem passar para o cérebro através dos órgãos circunventriculares, desencadeando respostas adaptativas. A sinalização pode ser realizada ainda, pelos nervos periféricos (vago, glossofaríngeo e hipoglosso) ou pela produção

de prostaglandinas na interface entre o cérebro e a corrente sanguínea (ENGBLOM et al., 2002).

Diferentes estudos demonstraram que ao retirar terminações das aferências vagais e administrar citocinas i.p., ocorre prevenção da febre e redução dos efeitos comportamentais (semelhantes à ansiedade e depressão) e diminuição da hiperalgesia (BLUTHE et al., 1996; OPP; TOTH, 1998; WATKINS et al., 1994). Contudo, outros estudos esclareceram que estas aferências não são de grande importância para o processo inflamatório/infeccioso. A divergência destes estudos provavelmente encontra-se no emprego de diferentes doses de citocinas administradas, bem como uso de diferentes vias de administração (ENGBLOM et al., 2002). Outros trabalhos trazem ainda que, a liberação de citocinas cerebrais pode ocorrer pelas células gliais ou neuronais, por mecanismo não conhecido, que então atuam por efeito autócrino ou parácrino (LECHAN et al., 1990).

Em resposta às alterações a nível imunológico e endócrino frente a um estímulo infeccioso-inflamatório, observamos respostas comportamentais e termorregulatórias no animal, como: mal-estar, diminuição da ingestão de alimentos, anorexia, diminuição do comportamento exploratório e social, perda do apetite sexual, pilo ereção e febre (AUBERT, 1999). Ao conjunto destas manifestações comportamentais, caracterizada como um estratégia para poupar energia, intitula-se comportamento doentio (*Sickness behavior*) (AVITSUR; YIRMIYA, 1999; BLATTEIS et al., 2005; DANTZER et al., 1998 a, 1998 b; DANTZER et al., 2001; HORI et al., 2000; KENT et al., 1996; KLUGER, 1991; LEONARD, 2001; ROMANOVSKY, 2004; ROMANOVSKY et al., 2006; STEINER; BRANCO, 2003). O comportamento doentio é entendido por Hart (1998), como uma resposta adaptativa do animal com fins de combater a infecção, criando desta forma um ambiente apropriado ao estabelecimento de uma resposta imune eficaz e desfavorável ao patógeno.

Segundo Moltz (1993) as alterações comportamentais que surgem na endotoxemia são essenciais para a sobrevivência do animal, bem como as respostas termorregulatórias que levam à febre, tendo em vista a criação de um ambiente desfavorável ao patógeno e o aumento da eficácia da resposta imune.

Devido à grande complexidade de interações entre os sistemas imune e endócrino, surgem estas respostas comportamentais, na qual diversas

moléculas participam como prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), cicloxigenase, óxido nítrico e principalmente as citocinas (DANTZER, 2009; DE PAIVA et al., 2010). As citocinas participam da comunicação entre os sistemas imune e neuroendócrino, da atividade do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) e do comportamento (DANTZER et al., 1998).

O LPS estimula a liberação das citocinas por células do sistema imunológico e estas são responsáveis por induzir a produção de prostaglandinas, em especial a PGE<sub>2</sub>. Ela ativa neurônios termossensíveis, na área pré-óptica (POA), gerando um estado febril (BLATTEIS, 2006). Este estado febril potencializa a imunidade inata e a imunidade adaptativa. Nesta, ele induz a proliferação de linfócitos e aumenta a produção de anticorpos e naquela é capaz de aumentar a capacidade fagocítica de neutrófilos (KLUGER, 1986).

Estudos sobre a estimulação térmica esclareceram que o resfriamento da POA desencadeia o aumento da temperatura corporal, por evocar respostas de retenção de calor como: vasoconstrição cutânea, pilo ereção e alterações comportamentais de conservação de calor. Após esse fase, ocorrem respostas de produção de calor, como: termogênese provocada por tremores e pelo aumento da atividade metabólica do tecido adiposo marrom e termogênese química, decorrente da elevação dos níveis de hormônios metabólicos (tiroxina (T<sub>4</sub>), catecolaminas e glicocorticoides). Contudo, o aquecimento da POA promove sudorese, vasodilatação cutânea, e respostas comportamentais que favorecem a perda de calor (BOULANT, 1998).

O estado febril está sujeito a um sistema de modulação endógeno, ele conta com mecanismos inibitórios específicos para a ação das citocinas que incluem a existência de proteínas ligantes circulantes, de receptores solúveis e, no caso da IL-1, de um antagonista endógeno do seu receptor, o IL-1ra (LUHESHI; ROTHWELL, 1996).

Existem também criógenos endógenos que limitam as elevações na temperatura corporal, impedindo que valores de temperatura atingidos comprometam as funções vitais do organismo. Entre eles estão: os glicocorticóides, a AVP, o hormônio estimulante  $\alpha$ -melanócitos ( $\alpha$ -MSH) e a IL-10 (KASTING, 1989; LEDEBOER et al., 2002; MARTIN, 1998; NAVA et al., 1997).

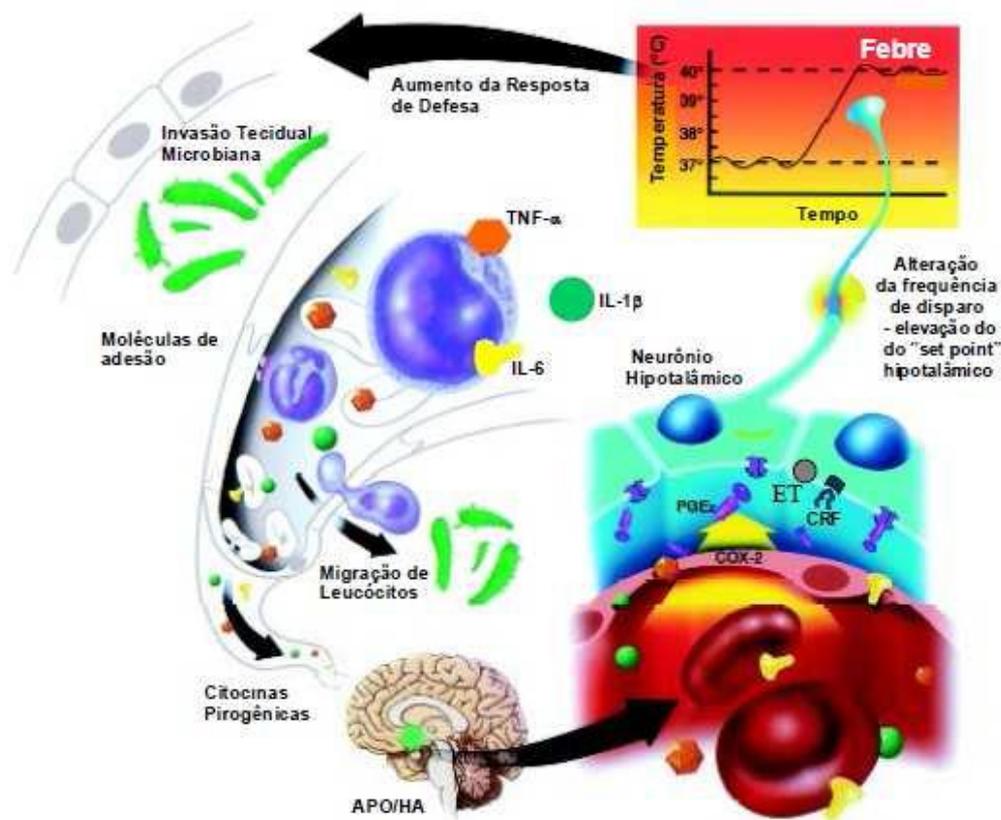


Figura 1 - Desenvolvimento de febre após infecção.

Fonte: ARONOFF, D.M.; NEILSON, E.G., 2001 apud SOARES, D.M., 2008.

Nota: Após a invasão tecidual por um agente infeccioso, inicia-se uma resposta inflamatória que ativa as células endoteliais locais e os leucócitos circulantes. Ocorre então, o extravasamento de leucócitos para o tecido inflamado, os quais ativados, liberam citocinas pirogênicas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, que depois de atingirem a circulação, estimulam a produção das PGs, ETs e/ou do CRF, no sistema nervoso central. Os mediadores centrais produzidos alteram a frequência de disparo dos neurônios da POA/HA, resultando na elevação do "set point" termorregulatório. Atinge-se o estado febril através da efetuação de respostas fisiológicas e comportamentais do

Aronoff e Neilson (2001) demonstraram, conforme ilustrado na Figura 1, que a invasão de um tecido por um agente infeccioso, desencadeia uma resposta inflamatória e esta resposta ativa leucócitos circulantes e células do endotélio local. Para ativação destes leucócitos é necessário ocorrer seu extravasamento para o tecido inflamado, e este extravasamento é dependente de uma interação, que é regulada por várias citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão entre as células do endotélio. A liberação de citocinas pirogênicas (TNF- $\alpha$ , IL- 1 $\beta$ , IL-6) ocorre com a ativação dos leucócitos, que ao atingirem a circulação estimulam a produção das PGEs, ETs e/ou do CRF, no sistema nervoso central, é importante salientar que o SNC também pode receber, por meio de conexões

neuronal, sinais inflamatórios periféricos (como por exemplo, através do nervo vago).

A partir da produção de mediadores centrais, ocorre alteração da frequência de disparo dos neurônios da POA e efetuação de respostas fisiológicas e comportamentais do organismo, com o objetivo de aumentar a produção/conservação de calor, resultando em estado febril devido elevação do “set point” termorregulatório. A febre é capaz de exacerbar a resposta inflamatória sistêmica em resposta à infecção, por aumentar a função leucocitária (ARONOFF; NEILSON, 2001).

## 2.2 ESTATINAS

As estatinas são drogas provenientes da cultura de fungos, empregadas no tratamento de hipercolesterolemia. Elas tem se destacado por seus efeitos pleiotrópicos, ou seja, efeitos que vão além do seu papel principal, ser hipocolesterolêmico. Dentre estes efeitos podemos elencar o papel anti-inflamatório, imunomodulador, antitrombogênico da droga e a melhora da disfunção endotelial (PATHAK et al., 2013).

Os estudos sobre as estatinas iniciaram-se no início da década de 70 por Akyra Endo, o qual descreveu a primeira estatina, nomeada de compactina, um composto isolado do fungo *Penicillium citrinum* que revelou ser potente em inibir a síntese de colesterol *in vitro* e *in vivo*. Ainda na mesma década, o laboratório farmacêutico Merck, isolou uma estrutura do fungo *Aspergillus terreus* (mais tarde chamada de lovastatina), que mostrou resultados significativos *in vitro* reduzindo os níveis de LDL circulante (ENDO, 2010).

Em setembro de 1987, após inúmeros testes clínicos que elucidaram a diminuição do colesterol em pacientes com hipercolesterolemia, houve a aprovação da lovastatina pela agência regulamentadora de fármacos e alimentos dos EUA, o FDA (*Food and Drug Administration*), tornando-se a primeira estatina a ser comercializada. Desde então, foram introduzidas ao mercado 6 estatinas, incluindo 2 estruturas semi-sintéticas (sinvastatina e

pravastatina) e 4 estruturas sintéticas (fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina).

A respeito de sua absorção no organismo, é importante salientar que maioria das estatinas (com exceção da pravastatina e parcialmente da rosuvastatina) sofre metabolismo de primeira passagem, fazendo com que a biodisponibilidade sistêmica seja de 5 a 30% da dose administrada (SIRTORI, 2014). As estatinas são predominantemente metabolizadas pela família de enzimas citocromo P450 e a principal via de eliminação é pela bile, após o metabolismo hepático (SCHACHTER, 2005).

As estatinas possuem a fórmula estrutural semelhante à 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG) como pode ser observado na Figura 2, apresentando alta afinidade pela 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase (SHITARA; SUGIYAMA, 2006).

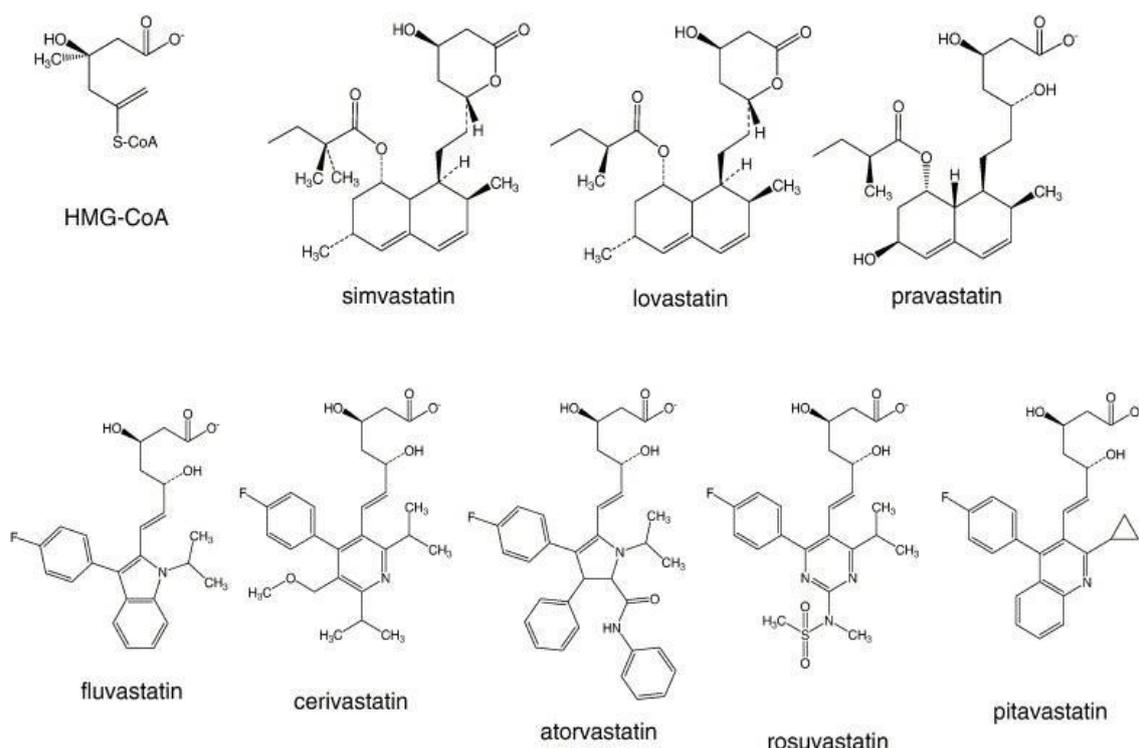


Figura 2 - Diversas estatinas e sua homologia com a molécula de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A.

Fonte: Adaptado de Shitara e Sugiyama (2006).

A HMG-CoA redutase é uma enzima essencial para a síntese de mevalonato, o qual é necessário na síntese do colesterol, como pode ser

observado na Figura 3. Bloqueando esta via de produção, as estatinas são capazes de inibir a síntese de colesterol e de metabólitos intermediários essenciais na prenilação de pequenas GTPases (SHITARA; SUGIYAMA, 2006).

As pequenas GTPases são proteínas monoméricas, inativas quando ligadas a guanosina difosfato (GDP) e ativas quando ligadas a guanosina trifosfato (GTP) e estão divididas em cinco superfamílias: Ras (regula a expressão gênica), Rho (participa da organização do citoesqueleto e da expressão gênica, RAn (regula o transporte nucleocitoplasmático e a organização de microtúbulos), Rab e Sar1/Arf (importantes no tráfico de vesículas) (TAKAI et al., 2001; WENNERBERG; DERK, 2004).

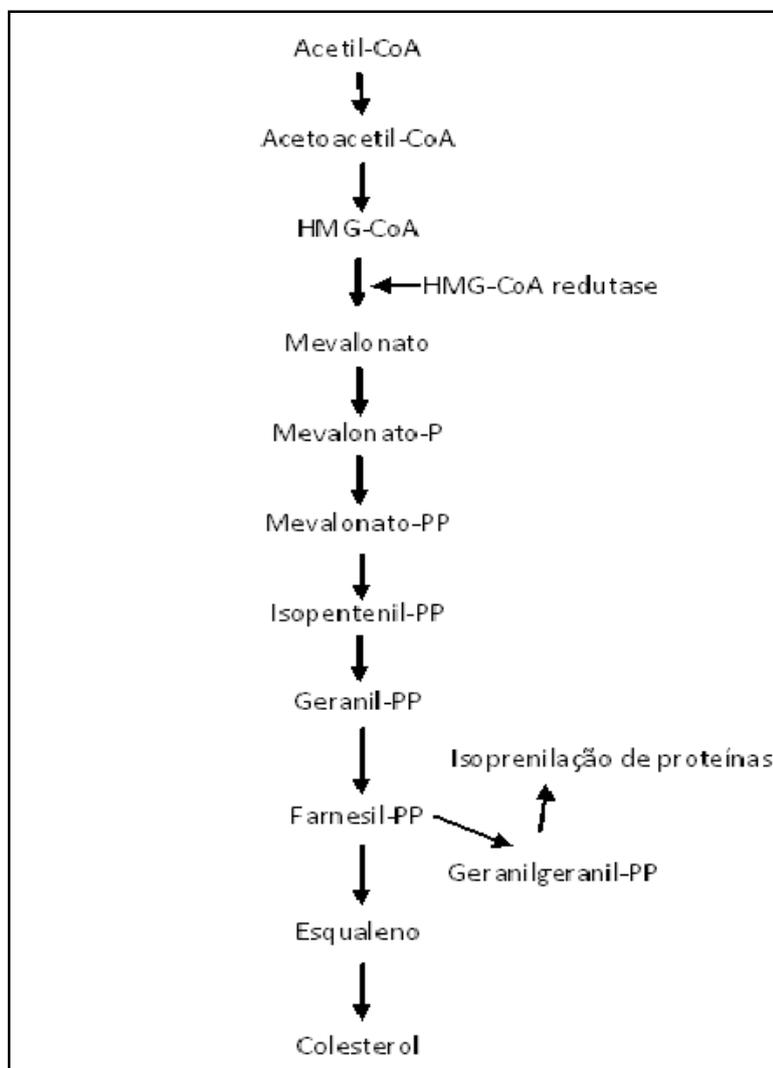


Figura 3 - Via de síntese do colesterol.  
Fonte: Adaptado de Shitara e Sugiyama (2006).

Quanto ao mevalonato, além de sua função na via biossintética do colesterol, produz compostos intermediários como: isopentenil pirofosfato (isopentenil-PP), dimetilalil pirofosfato (dimetilalil-PP), geranyl pirofosfato (geranyl-PP), farnesil pirofosfato (FPP) e geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). Dentre estes compostos intermediários produzidos, podemos destacar o FPP e o GGPP, os quais desempenham papéis importantes em várias modificações pós-transducionais de proteínas intracelulares, através da Rho GTPase (guanosina trifosfato hidrolase). Eles promovem interação proteína-proteína, participam de várias atividades celulares (apoptose, crescimento e diferenciação celular, expressão gênica, transportes nuclear, proteico e lipídico) e influenciam vias de sinalização inflamatória (CASEY; SEABRA, 1996).

Com isso, podemos afirmar que o tratamento com as estatinas previne a formação do mevalonato, pois estas drogas competem com o sítio de ligação da enzima HMG-CoA redutase, impedindo a ligação da enzima ao seu sítio, resultando na redução de radicais isoprenóides produzidos (FPP e GGPP) e consequentemente na diminuição da prenilação de proteínas de membrana que regulam a comunicação celular na resposta inflamatória (DIOMEDE et al., 2001; MCFARLANE et al., 2002).

Dentre as estatinas citadas, a sinvastatina foi o alvo de nosso estudo, no próximo subtítulo abordaremos com mais detalhes suas propriedades pleiotrópicas.

### 2.3 SINVASTATINA

A sinvastatina é um hipocolesterolêmico da classe das estatinas, cuja ação é associada à inibição da HMG-CoA redutase, resultando na redução do colesterol: LDL, VLDL e triglicerídeos plasmáticos (BARACAT et al., 2006). Respondendo ao nível reduzido de colesterol livre, fatores de transcrição aumentam a síntese de receptores de LDL, mas reduzem sua degradação. Dessa forma, um número maior de receptores na superfície dos hepatócitos são capazes de aumentar a remoção de LDL do sangue, diminuindo seus níveis séricos (CAMPO; CARVALHO, 2007).

A sinvastatina é um pró-fármaco, administrado sob a forma de uma lactona farmacologicamente inativa, que precisa ser hidrolisada predominantemente no fígado, para tornar-se ativa e agir como um potente inibidor da HMG CoA redutase. (MALENOVIC et al., 2008). Esta hidrólise para torná-la farmacologicamente ativa, ocorre pela ação de enzimas conhecidas como carboxiesterases inespecíficas, presentes em menor concentração no plasma, intestino e no fígado. O metabolismo oxidativo da sinvastatina no fígado humano é promovido por enzimas do citocromo P450 (CYP) principalmente pela CYP 3A (CYP 3A4 e CYP 3A5) (GROZDANIS et al., 2008).

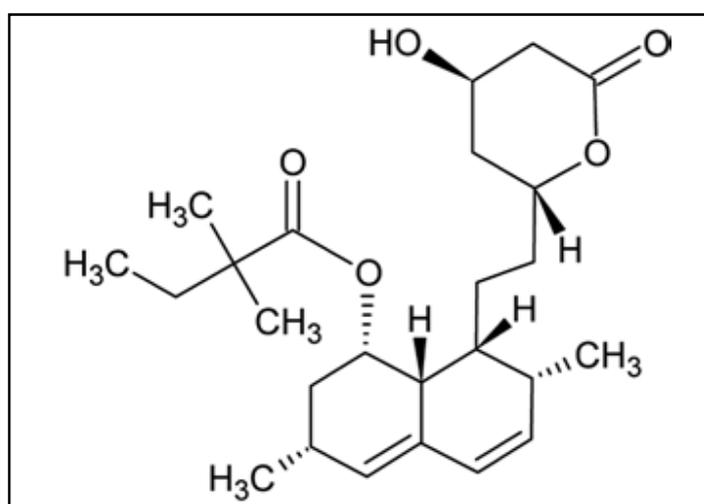


Figura 4 - Fórmula estrutural da sinvastatina.  
Fonte: Adaptado de Shitara e Sugiyama (2006).

Malenovic et al., (2008) demonstraram que as concentrações plasmáticas da sinvastatina após administração de doses terapêuticas orais, são muito baixas (em torno de 5%) devido a ação enzimática mediada no fígado e intestino pelo citocromo P450. Sabe-se ainda que o pico de concentração tecidual da droga ocorre entre 30 minutos a 2 horas após administração, concentrando-se preferencialmente no fígado (SHITARA; SUGIYAMA, 2006).

Além de seus efeitos hipocolesterolêmicos, a sinvastatina possui efeitos pleiotrópicos, ou seja, efeitos que estão além de sua função na via biossintética do colesterol, estudos apontam para sua ação antioxidante, imunomoduladora e anti-inflamatória (FARMER, 2000).

Os efeitos anti-inflamatórios da sinvastatina foram demonstrados em diversos modelos experimentais e doenças. Zhang et al., (2005) mostraram que a sinvastatina é capaz de aumentar os níveis de IL-10 e atenuar a produção de

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 nas regiões do miocárdio sem infarto e infartadas, reduzindo a deposição de colágeno no miocárdio não-infartado e melhorando a função ventricular esquerda. Além disso, Sheng et al., (2009) constataram que a sinvastatina marcadamente inibe a expressão de TLR4, TNF- $\alpha$  e IL-6 no miocárdio após o infarto do miocárdio. Dantas et al., (2010) descobriram que o pré-tratamento com a sinvastatina atenua inflamação induzida pela ciclofosfamida em ratos, através da redução significativa nível plasmático de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-1 $\beta$ ).

Hao et al., (2013) demonstraram que camundongos que receberam instilação intratraqueal de LPS, mas que concomitantemente foram tratados com células progenitoras endoteliais e sinvastatina apresentaram melhor recuperação de lesão aguda pulmonar do que os animais que receberam apenas células progenitoras endoteliais.

Araújo-Filho et al., (2010) trataram ratos *Wistar* diabéticos (induzida por estreptozotocina) com sepse abdominal com sinvastatina 20 mg/dia via oral, e observaram a redução da mortalidade e dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, procalcitonina, leucócitos e neutrófilos. Ando et al., (2000) trataram camundongos com estatina antes da aplicação intraperitoneal de LPS e constataram que após duas horas, estes animais expressaram níveis séricos reduzidos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e aumento na sobrevivência dos animais tratados. Corroborando com estes achados, testes realizados por Najad et al., (2013) em ratos que foram submetidos à ligação de artéria coronária descendente anterior (esquerda) e pré-tratados com sinvastatina por injeção intraperitoneal, apresentaram redução dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 no miocárdio, evidenciando a ação anti-inflamatória deste fármaco.

Como pôde ser observado, são diversos os trabalhos que evidenciam a ação anti-inflamatória da sinvastatina, através de seu tratamento ou pré-tratamento em diferentes modelos experimentais. Mas apesar desse vasto conhecimento, ainda são escassos na literatura, dados consistentes a respeito do efeito do pré-tratamento com a sinvastatina sobre o comportamento doente induzido por endotoxemia. Por esse motivo nosso estudo fez-se importante, permitindo investigar e avaliar a influência que este fármaco exerce sobre o *sickness behavior*, a temperatura corporal e a concentração plasmática das citocinas pró-inflamatórias de camundongos pré-tratados com a sinvastatina.

### 3 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo seguem descritos abaixo.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do pré-tratamento com sinvastatina sobre o *sickness behavior* induzido por endotoxemia em camundongos

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito de diversas doses de LPS (100, 200 ou 500 µg/Kg) assim como elaborar curva temporal (2, 6 ou 24h) em que o animal apresente as alterações comportamentais para os testes estudados;
- b) Avaliar a influência do pré-tratamento com sinvastatina (10 e 40 mg/Kg) nas respostas comportamentais à endotoxemia;
- c) Avaliar a influência do pré-tratamento com sinvastatina (10 e 40 mg/Kg) na febre induzida por LPS;
- d) Avaliar a influência do pré-tratamento com sinvastatina (10 e 40 mg/Kg) sobre a concentração de citocinas plasmáticas durante a

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nos tópicos a seguir será explicitada a metodologia e a análise estatística utilizada.

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos adultos machos da linhagem *Swiss* pesando entre 25 e 35g, 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 fotoperíodo definido de 12 horas, com as luzes acesas às 07:00. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Alfenas, sob o número de protocolo 564/2014.

### 4.2 SUBSTÂNCIAS

Lipopolissacarídeo proveniente de *Escherichia coli* (sorotipo 026: B6 – Sigma Aldrich, USA), aplicado intraperitonealmente (ip.) em dose única e diluído em NaCl 0,9%. Sinvastatina em pó, diluída em Polietilenoglicol e administrada por gavagem (p.o). Pentabiótico (Fort Dodge Saúde Animal LTDA), Tribromoetanol (TBE-Sigma) e soro fisiológico 0,9% (Isofarma).

### 4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

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

### 4.3.1 Indução do *sickness behavior* por aplicação de Lps

Para determinar a dose e o horário de aplicação de LPS mais conveniente afim 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 submetidos a testes comportamentais após 2, 6 e 24 horas da aplicação. A administração do LPS ou do veículo foi realizada por via intraperitoneal, em dose única, compondo dessa forma 4 grupos experimentais:

Quadro 1 - Dose e horário de aplicação de LPS.

2 horas	6 horas	24 horas
Salina	Salina	Salina
LPS 100 µg/Kg	LPS 100 µg/Kg	LPS 100 µg/Kg
LPS 200 µg/Kg	LPS 200 µg/Kg	LPS 200 µg/Kg
LPS 500 µg/Kg	LPS 500 µg/Kg	LPS 500 µg/Kg

Fonte: Da autora.

### 4.3.2 Pré-tratamento com sinvastatina

A sinvastatina apresentada na forma de pó, foi diluída em polietilenoglicol (DAHAN; HOFFMAN, 2006; HEIMBACH; FLEISHER; KADDOUMI, 2007; LACERDA; LIONZO, 2011; VANDERBIST; SERENO; BAUDIER, 2004). Aplicada nas doses de 10 mg/Kg e 40 mg/Kg (BRACHT et al., 2013; CASTRO, 2009; MACEDO et al., 2015; PAUMELLE et al., 2006; SILVA et al., 2014).

Após a diluição do fármaco foi administrado ao animal: sinvastatina 10 mg/Kg ou sinvastatina 40 mg/Kg ou veículo, através de gavagem (p.o.), por um período de 7 dias, no período da manhã (BECK, 2007; MOREIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2004). No oitavo dia, foi injetado intraperitonealmente (ip.) LPS (200 µg/Kg) ou veículo (tratamento), e após 2 horas da aplicação os testes foram realizados. A dose e horário de LPS utilizados nesta etapa, já haviam sido

determinadas, conforme descrito anteriormente. Os animais foram divididos em 6 grupos como descrito na tabela a seguir:

Quadro 2 - Pré-tratamento com sinvastatina ou veículo e Tratamento com LPS ou veículo.

Pré-tratamento (7 dias)	Tratamento (8º dia)
Veículo (p.o.)	Salina (ip.)
Veículo (p.o.)	LPS (ip.)
Sinvastatina 10 mg/Kg (p.o.)	Salina (ip.)
Sinvastatina 10 mg/Kg (p.o.)	LPS (ip.)
Sinvastatina 40 mg/Kg (p.o.)	Salina (ip.)
Sinvastatina 40 mg/Kg (p.o.)	LPS (ip.)

Fonte: Da autora.

#### 4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

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

##### 4.4.1 Claro-escuro

No teste claro-escuro podemos avaliar comportamentos semelhantes à ansiedade no animal. Os camundongos foram colocados em um aparato (dimensões de 48x24x24cm) dividido em duas câmaras, uma clara e outra escura, sendo ambas conectadas por uma comunicação central (8x8cm). O animal foi introduzido no lado claro e avaliados os seguintes parâmetros: o tempo de Latência (a entrada do animal com as quatro patas no compartimento escuro pela primeira vez), o número de cruzamentos realizados (o número de vezes que o animal saiu do lado escuro para explorar o lado claro) e o tempo de permanência do animal no lado claro. A avaliação do teste foi de 5 minutos e registrada por filmadora (CRAWLEY, 1981).

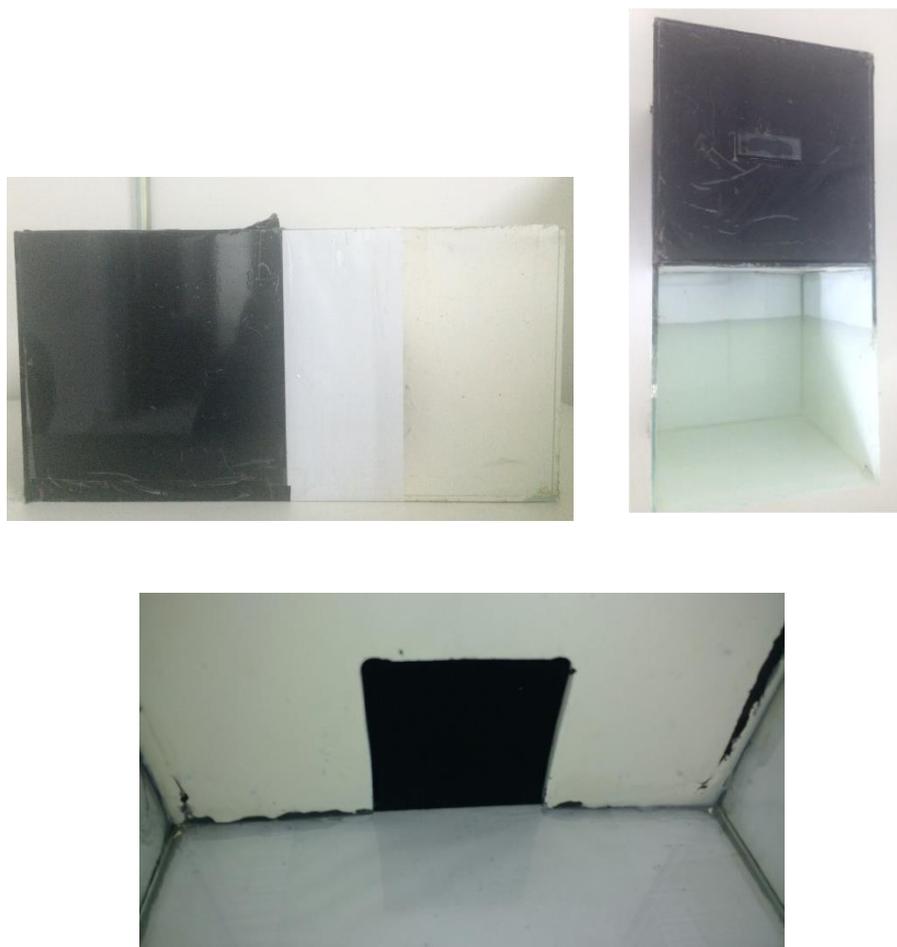


Figura 5 - Imagens do Teste Claro-Escuro.  
Fonte: Da autora.

#### 4.4.2 Nado forçado

Este teste é usado para verificar sintomas semelhantes à depressão em roedores. Para a realização do teste, utilizou-se um béquer cilíndrico de 12 cm de diâmetro, contendo água à temperatura de  $\pm 25^{\circ}\text{C}$ . O volume de água permitiu ao animal nadar ou boiar sem encostar as patas ou a cauda no fundo do recipiente. O animal foi colocado para nadar por um período de 6 minutos, contudo, considerou-se apenas os 4 minutos finais para avaliação do teste, o qual foi registrado por meio de filmagem.

Avaliou-se os seguintes parâmetros a cada 5 segundos: *floating* (número de vezes que o animal flutua, sem apresentar movimentos); *swimming* (quando

o animal se movimenta e realiza rotações no aparato) e *climbing* (onde se observa tentativas de escape do aparato, escalando suas paredes) (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977).

#### **4.4.3 Suspensão pela cauda**

Neste teste podemos analisar o comportamento semelhante a depressão no animal. Os camundongos foram suspensos pela cauda, por meio de fitas adesivas fixadas a 1 cm do final da cauda, e posicionados em um suporte localizado a 1m do solo. O teste foi registrado através de filmagem por um período de 6 minutos e avaliou-se o tempo de imobilidade do animal (STERU et al., 1985).

#### **4.4.4 Campo aberto**

A avaliação do teste de campo aberto permitiu verificar sinais de ansiedade em roedores. O animal foi colocado no centro de um aparato circular (30 cm de diâmetro), cujo piso é dividido em quadrantes, sendo 4 centrais e 8 periféricos. Foi considerado cruzamento periférico, a entrada do animal com as quatro patas em alguma das oito áreas periféricas e cruzamento central, quando o animal entrou com as quatro patas em alguma das áreas centrais. O registro do teste foi realizado através de filmagem durante 5 minutos. Observou-se o número de cruzamentos centrais, o número de cruzamentos periféricos, rearings e o número de cruzamentos totais (centrais + periféricos) (WILCONSON et al., 2007; TOYAMA, 2012).



Figura 6 - Imagens do Teste de Campo Aberto.  
Fonte: Da autora.

#### 4.5 TEMPERATURA CORPORAL



Figura 7 - Receptor de telemetria (*Data Science*) conectado ao computador.  
Fonte: Da autora.

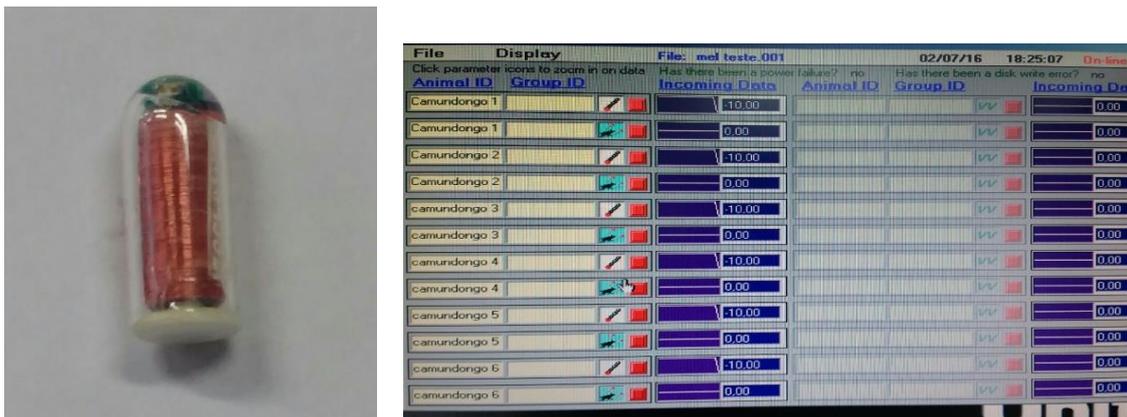


Figura 8 - Transmissor de temperatura (probe) / Demonstração do programa utilizado para coleta dos dados de temperatura, os quais são exibidos graficamente no monitor e armazenados em arquivo digital.

Fonte: Da autora.

Para aferir a temperatura corporal os camundongos foram submetidos à implantação de um transmissor de temperatura no interior da cavidade peritoneal, através de um procedimento cirúrgico. Este procedimento foi realizado sob anestesia intraperitoneal com Tribromoetanol (TBE) 250 mg/kg e após a implantação do transmissor o animal recebeu pentabiótico intramuscular, 3,75 mg/kg.

Através de uma incisão abdominal, o transmissor de temperatura (série 4000 E-Mitter; Mini Mitter, Bend, OR) foi inserido na cavidade peritoneal. (O músculo e a pele foram suturados separadamente com fio de algodão). Com intuito de evitar a hipotermia pós-cirúrgica, todos os animais foram expostos à temperatura de 32°C durante a recuperação da anestesia (STEINER et al., 2011).

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em caixas individuais nas mesmas condições anteriormente citadas. Após um período de sete dias, as caixas foram colocadas sobre o receptor de telemetria (*Data Science*) conectado a um computador. Depois da aplicação de veículo ou LPS, o registro da temperatura corporal foi feito em intervalos de 10 minutos, durante 8 horas. Os dados foram colhidos, exibidos graficamente no monitor e armazenados em arquivo digital.

Calculou-se a temperatura basal através das médias das temperaturas aferidas nos 30 minutos antes do início do experimento. A diferença entre a temperatura basal média e a temperatura obtida a cada intervalo nos forneceu o delta de temperatura. Os dados obtidos foram demonstrados em gráfico linear e

as estatísticas, pela área sob a curva (AUC) que corresponderam ao índice térmico para cada intervalo.

#### 4.6 DOSAGEM DE CITOCINAS

Os animais foram anestesiados com TBE (250 mg/kg; 0,1mL/g) e o sangue coletado pela técnica retro-orbital, foi submetido a 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.

#### 4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados utilizando-se o programa do software GraphPad versão 5.0 e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). 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, o pré-tratamento (p.o. com sinvastatina ou veículo) e o desafio imunológico (tratamento com solução salina ou com LPS) foram utilizados como fatores para análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância foi baseado em valores de p inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão expostos a seguir.

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

A seguir, será explicitado os dados obtidos nos testes comportamentais em animais submetidos à endotoxemia.

#### 5.1.1 Claro-escuro

Os animais submetidos ao teste claro-escuro após 2 horas de aplicação do LPS (Figura 9), apresentaram aumento significativo do tempo de latência, nas doses de 200 e 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (ambas  $p < 0,05$ ) e no tempo de permanência no lado claro do aparato, para as doses de 200 ( $p < 0,05$ ) e 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao controle, observa-se também uma redução no número de transições do lado claro para o lado escuro (cruzamentos) para todos os grupos tratados com LPS, em relação ao grupo tratado com salina (100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  -  $p < 0,05$  / 200 e 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  -  $p < 0,001$ ).

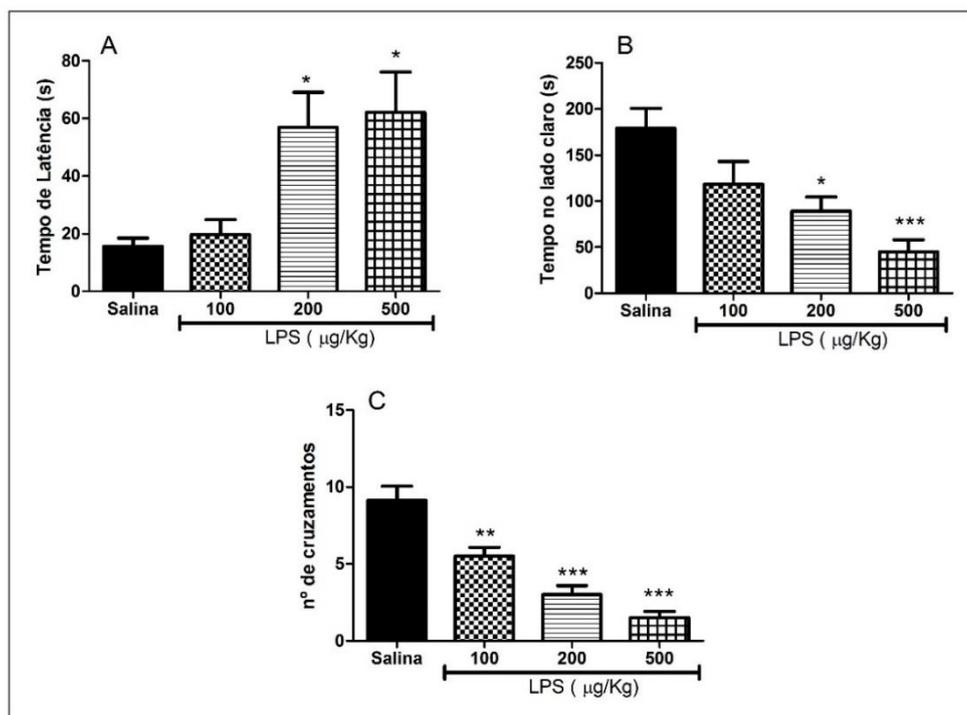


Figura 9 - Efeitos do LPS sobre o Teste Claro-Escuro, analisado 2 horas após aplicação de LPS.

Fonte: Da autora.

Nota: Observamos em A, tempo de latência do animal (s), em B, o tempo de permanência no lado claro do aparato (s) e em C, o número de transições do lado claro para o lado escuro (cruzamentos) do animal (n=8). Estatística: ANOVA – uma via, com pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  comparados ao controle (salina).

Seis horas após a aplicação do LPS (Figura 10), os animais não apresentaram diferença significativa para os parâmetros: tempo de latência e permanência no lado claro, contudo ainda é possível notar uma redução quanto ao número de transições para as doses de 200 ( $p < 0,05$ ) e 500 µg/Kg ( $p < 0,001$ ) comparadas ao controle.

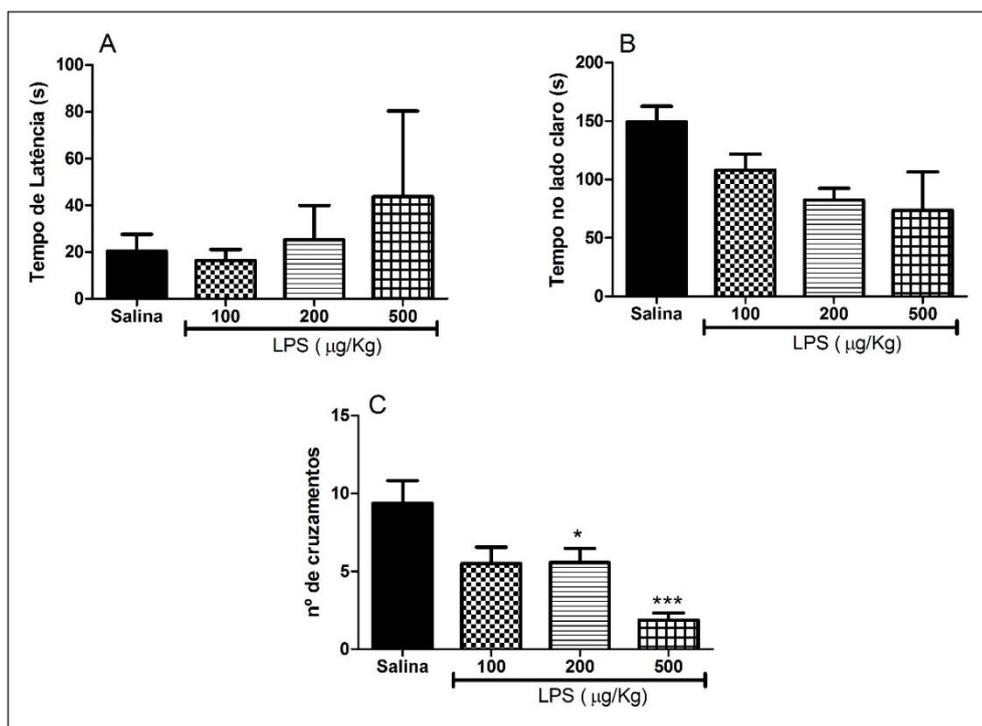


Figura 10 - Efeitos do LPS sobre o Teste Claro-Escuro, analisado 6 horas após aplicação de LPS.

Fonte: Da autora.

Nota: Observamos em A, tempo de latência do animal (s), em B, o tempo de permanência no lado claro do aparato (s) e em C, o número de transições do lado claro para o lado escuro (cruzamentos) do animal (n=7-8). Estatística: ANOVA – uma via, com pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  comparados ao controle (salina).

Em 24 horas, não notamos diferença significativa em nenhum dos parâmetros analisados (Figura 11). (Anexos-Tabela 1)

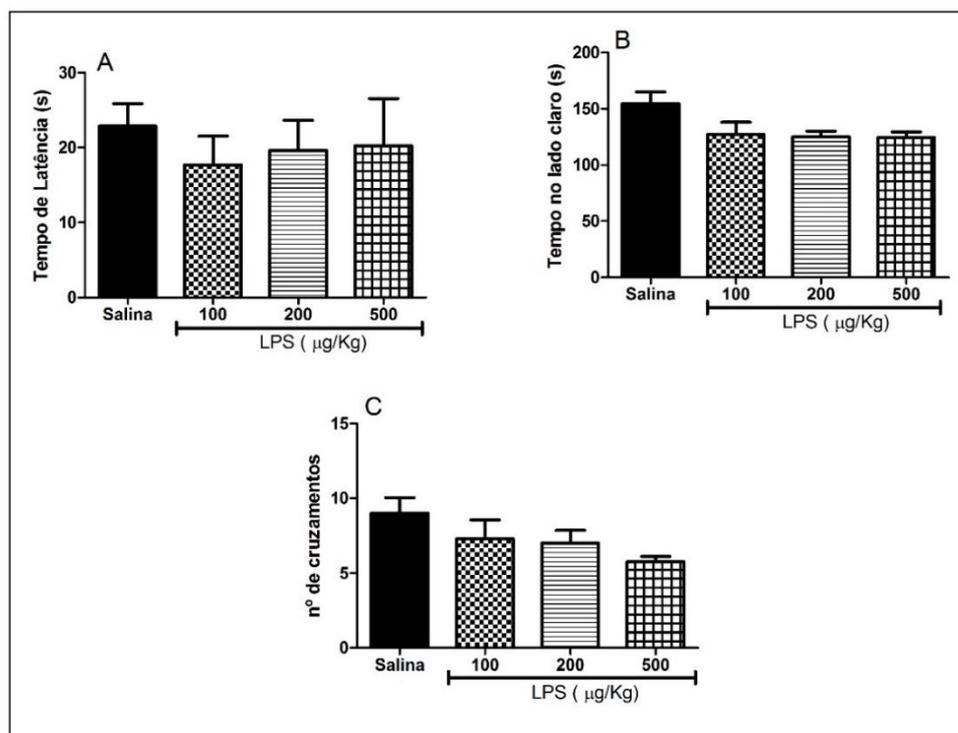


Figura 11 - Efeitos do LPS sobre o Teste Claro-Escuro, analisado 24 horas após aplicação de LPS.

Fonte: Da autora.

Nota: Observamos em A, tempo de latência do animal (s), em B, o tempo de permanência no lado claro do aparato (s) e em C, o número de transições do lado claro para o lado escuro (cruzamentos) do animal (n=7-8). Estatística: ANOVA – uma via, com pós-teste de Tukey.

### 5.1.2 Nado forçado

Os animais submetidos ao teste de nado forçado após 2 horas da aplicação de LPS (Figura 12), apresentaram redução no número de *swimmings* em todas as doses testadas (100 µg/Kg -  $p < 0,05$  / 200 e 500 µg/Kg-  $p < 0,001$ ) e essa redução também é visível quanto ao número de *climbings*, quando comparamos ao grupo controle (100 µg/Kg -  $p < 0,01$  / 200 e 500 µg/Kg-  $p < 0,001$ ). Quanto à imobilidade (*floating*), observamos um aumento do número de eventos em animais que receberam as doses de 100, 200 e 500 µg/Kg ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  respectivamente) em relação ao grupo que recebeu salina.

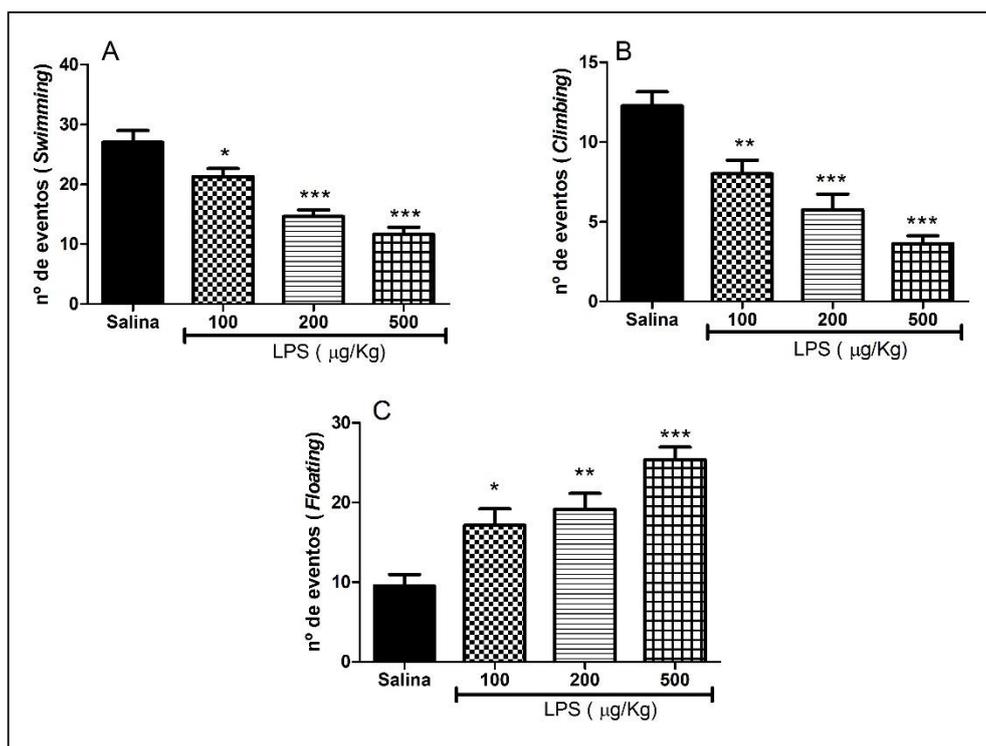


Figura 12 - Efeitos do LPS sobre o Teste Nado Forçado, analisado 2 horas após aplicação de LPS.

Fonte: Da autora.

Nota: Observamos em A, o número de *swimmings*, em B, *climbings* e em C, o número de *floatings* (n=8). Estatística: ANOVA – uma via, com pós-teste de Tukey, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  comparados ao controle (salina).

Decorridas 6 horas da aplicação (Figura 13), os animais apresentaram diminuição do número de *swimmings* na dose de 500 µg/Kg ( $p < 0,01$ ) e *climbings*, para as doses de 200 e 500 µg/Kg ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  respectivamente) e aumento do número de *floatings* em todas as doses testadas quando comparadas ao controle (100 e 200 µg/Kg,  $p < 0,05$  para ambas, 500 µg/Kg,  $p < 0,001$ ). No teste realizado após 24 horas da administração de LPS (Figura 14), os animais não exibiram diferença significativa em nenhuma das doses e isto pôde ser observado nos três parâmetros analisados. (Anexos-Tabela 4)

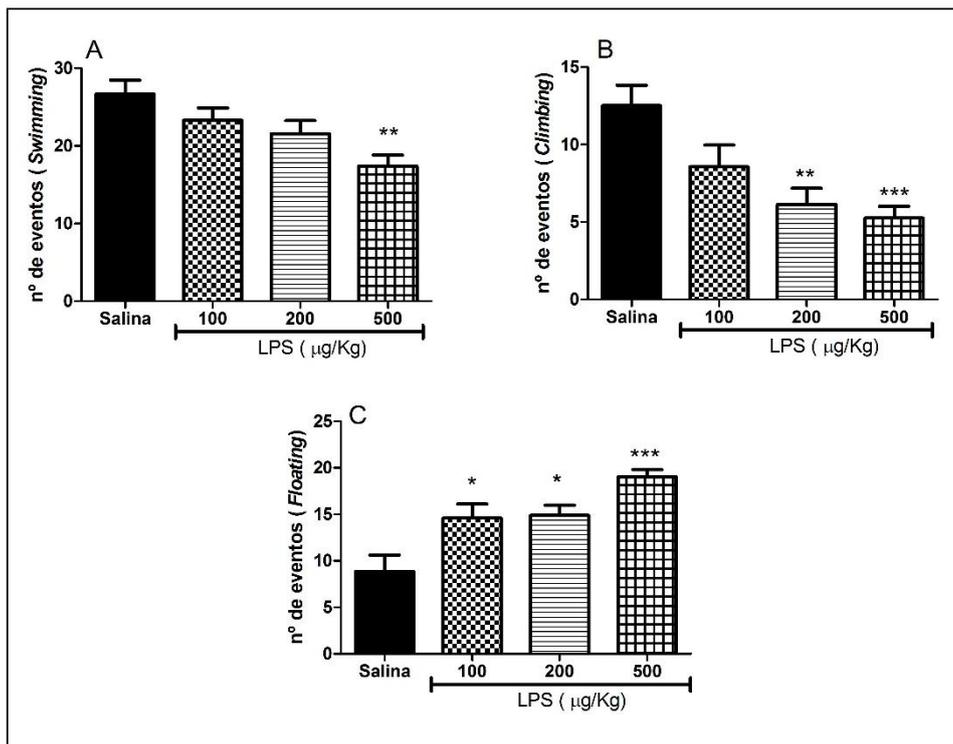


Figura 13 - Efeitos do LPS sobre o Teste Nado Forçado, analisado 6 horas após aplicação de LPS.

Fonte: Da autora.

Nota: Observamos em A, o número de *swimmings*, em B, *climbings* e em C, o número de *floatings* (n=6-8). Estatística: ANOVA – uma via, com pós-teste de Tukey. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 comparados ao controle (salina).

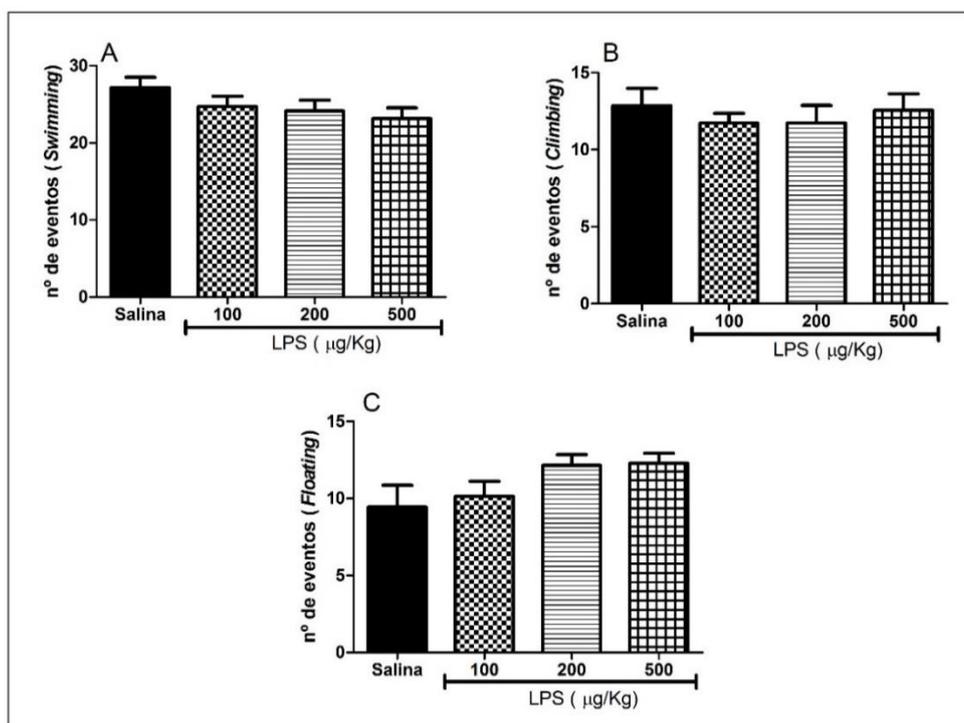


Figura 14 - Efeitos do LPS sobre o Teste Nado Forçado, analisado 24 horas após aplicação de LPS.

Fonte: Da autora.

Nota: Observamos em A, o número de *swimmings*, em B, *climbings* e em C, o número de *floatings* (n=7). Estatística: ANOVA – uma via, com pós-teste de Tukey.

### 5.1.3 Suspensão pela cauda

Neste teste observamos aumento do tempo de imobilidade após 2 horas da aplicação de LPS, para doses de 200 ( $p < 0,01$ ) e 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao controle. Depois de 6 horas, é possível notar um aumento significativo no tempo de imobilidade com a administração da dose de 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo tratado com salina, contudo não observamos diferença significativa para este parâmetro passadas 24 horas da aplicação do LPS (Figura 15). (Anexos-Tabela 3)

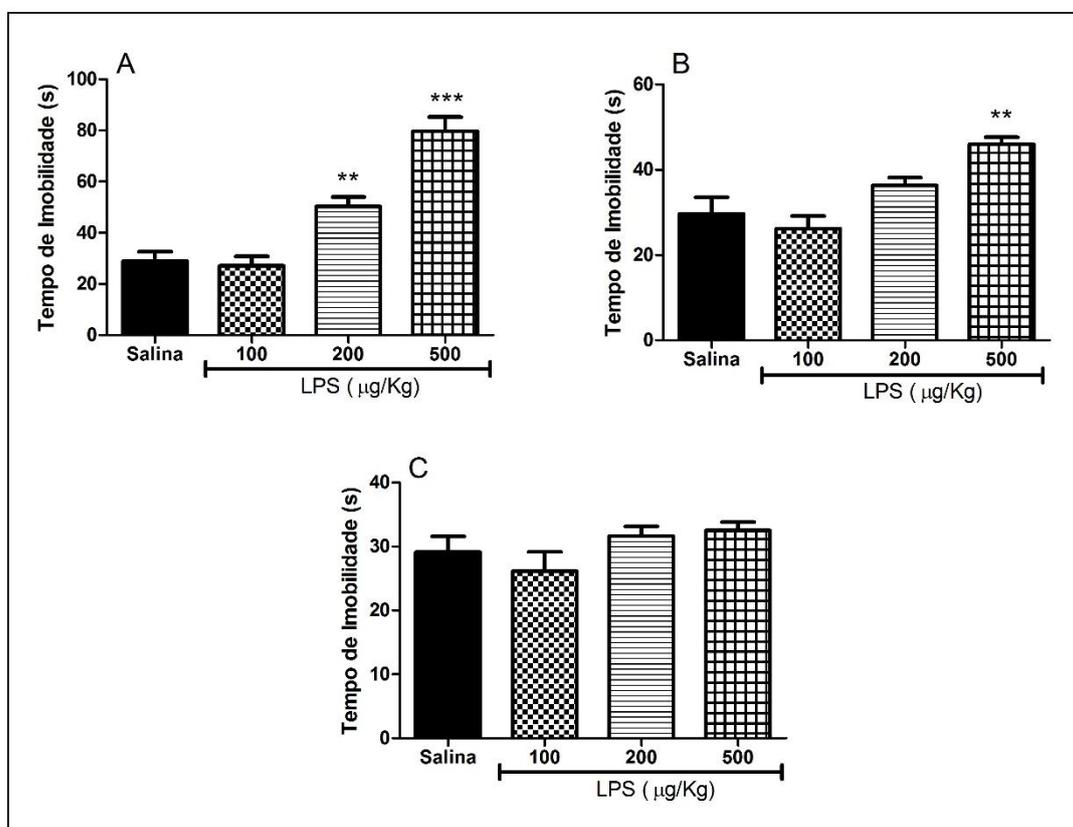


Figura 15 - Efeitos do LPS sobre o Teste de Suspensão pela Cauda.

Fonte: Da autora.

Nota: Observamos o tempo de imobilidade, em segundos, 2 horas após aplicação de LPS em A, 6 horas após em B e 24 horas depois em C ( $n=8$ ). Estatística: ANOVA – uma via, com pós-teste de Tukey. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  comparados ao controle (salina).

### 5.1.4 Campo aberto

Observamos na Figura 16, que os animais submetidos ao Teste de Campo Aberto, após duas horas de aplicação do Lipopolissacarídeo, apresentaram redução no número de cruzamentos periféricos para todas as doses experimentadas (100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  –  $p<0,05$  e 200 e 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  -  $p<0,001$ ) quando comparadas ao grupo controle. A redução significativa também é notada, quanto ao número de cruzamentos centrais para as doses de 200 e 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  ( $p<0,05$  e  $p<0,001$  respectivamente) e para os cruzamentos totais em todas as doses testadas (100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  –  $p<0,05$  e 200 e 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  -  $p<0,001$ ) em relação ao controle.

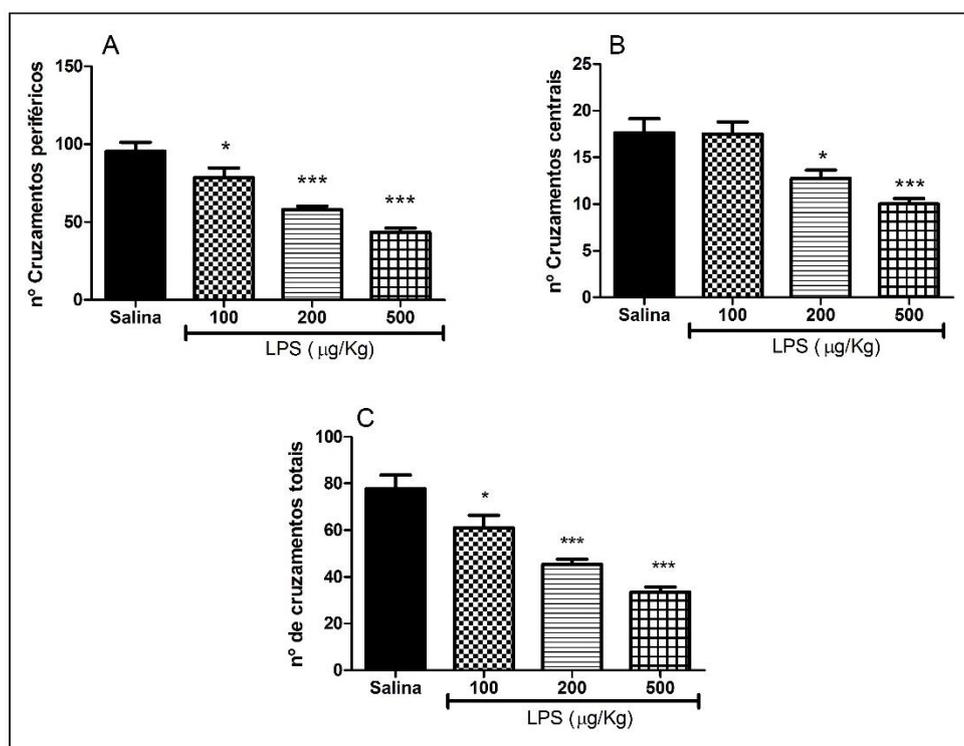


Figura 16 - Efeitos do LPS sobre o Teste de Campo Aberto.

Fonte: Da autora.

Nota: Observamos o número de cruzamentos periféricos em A, o número de cruzamentos centrais em B e o número de cruzamentos totais em C, 2 horas após aplicação de LPS ( $n=8$ ). Estatística: ANOVA – uma via, com pós-teste de Tukey. \* $p<0,05$ , \*\*\* $p<0,001$  comparados ao controle (salina).

Passadas seis horas da aplicação de LPS (Figura 17), os animais apresentaram diminuição significativa no número de cruzamentos periféricos, centrais e totais. Contudo, essa redução pode ser observada apenas nas doses de 200 e 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  ( $p<0,05$  e  $p<0,001$  respectivamente) para cruzamentos periféricos, 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  ( $p<0,01$ ) em cruzamentos centrais e 200 e 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$

( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$  respectivamente) para cruzamentos totais, quando comparadas ao grupo dos animais tratados com salina.

Após vinte e quatro horas, conforme pode ser observado na Figura 18, a redução é persistente na dose de 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  ( $p < 0,05$ ) para cruzamentos periféricos e nas doses de 200 e 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  ( $p < 0,01$  em ambas) para os cruzamentos totais em relação ao grupo controle.

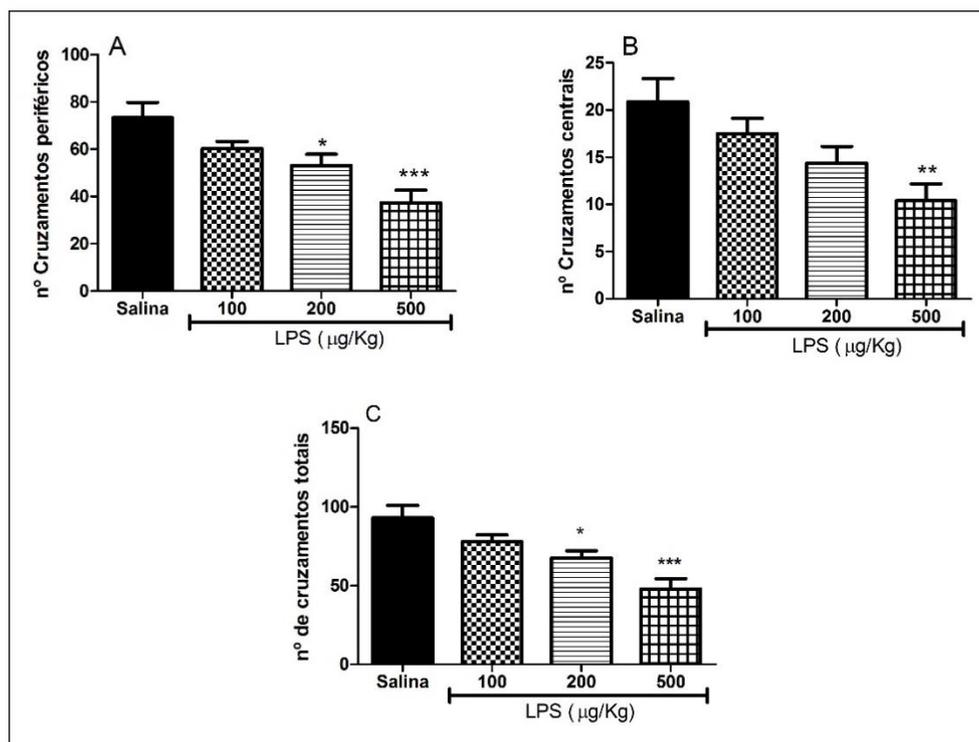


Figura 17 - Efeitos do LPS sobre o Teste de Campo Aberto.

Fonte: Da autora.

Nota: Observamos o número de cruzamentos periféricos em A, o número de cruzamentos centrais em B e o número de cruzamentos totais em C, 6 horas após aplicação de LPS ( $n=8$ ). Estatística: ANOVA – uma via, com pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  comparados ao controle (salina).

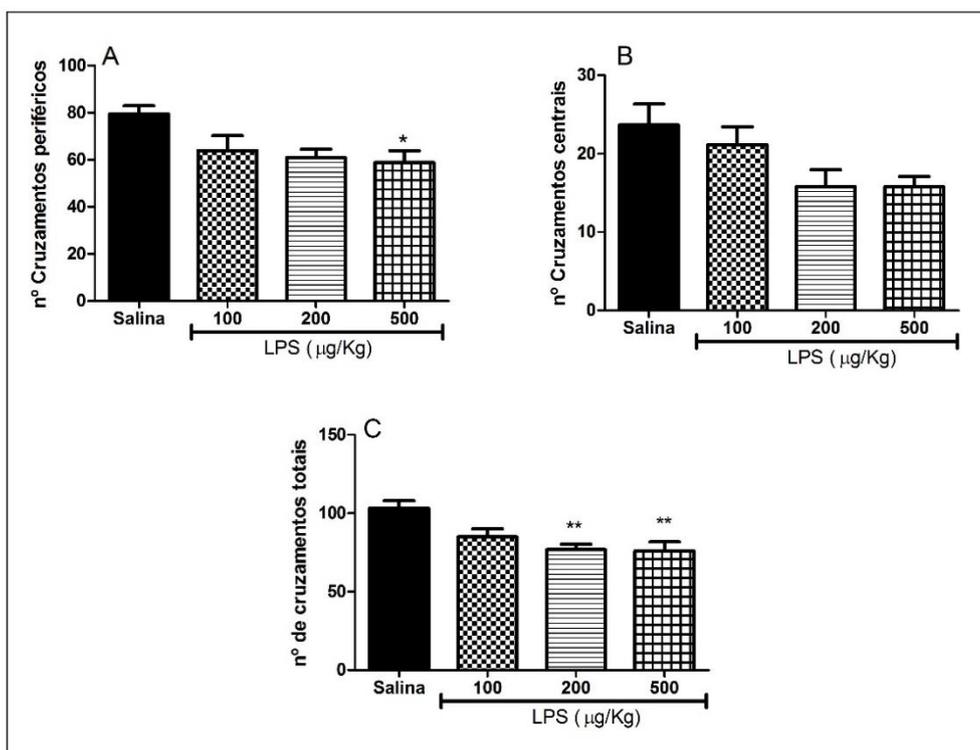


Figura 18 - Efeitos do LPS sobre o Teste de Campo Aberto.

Fonte: Da autora.

Nota: Observamos o número de cruzamentos periféricos em A, o número de cruzamentos centrais em B e o número de cruzamentos totais em C, 24 horas após aplicação de LPS (n=8). Estatística: ANOVA – uma via, com pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  comparados ao controle (salina).

Quanto ao número de *rearings*, observamos uma redução significativa em animais que receberam LPS nas doses de 200 e 500 µg/Kg ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$  respectivamente) após duas horas da aplicação, comparados ao controle. Essa diminuição também é notada nas doses de 200 e 500 µg/Kg ( $p < 0,01$  em ambas), seis horas após a injeção i.p. de LPS e depois de vinte horas, não é observada nenhuma diferença quanto ao número de *rearings*, em nenhuma das doses administradas (Figura 19). (Anexos-Tabela 2)

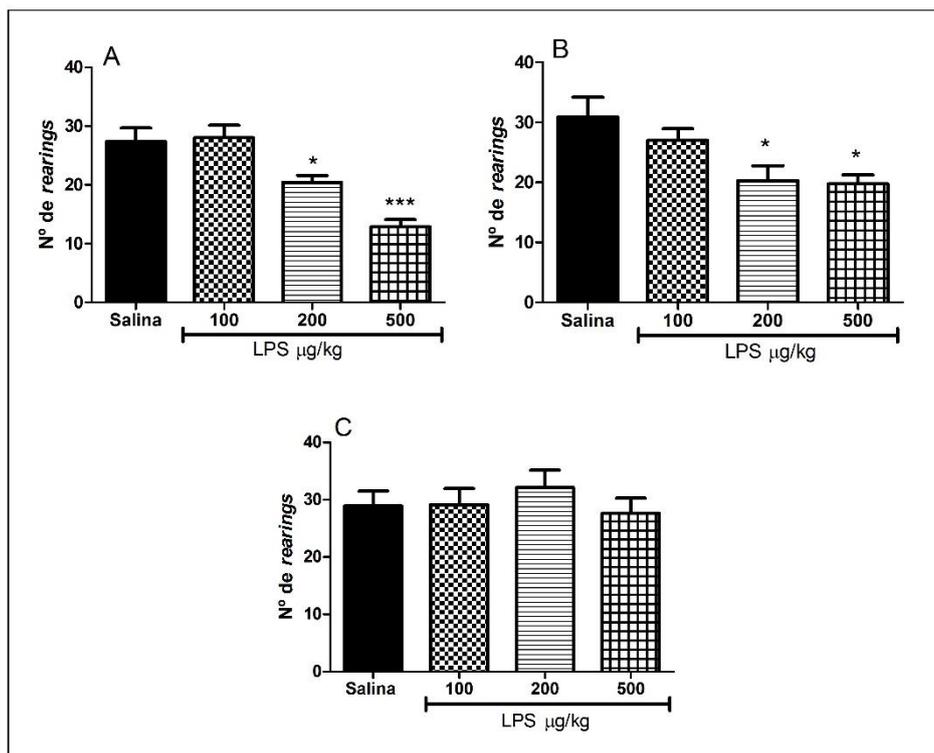


Figura 19 - Efeitos do LPS sobre o Teste de Campo Aberto.

Fonte: Da autora.

Nota: Observamos o número de *rearings* após 2 horas de aplicação do LPS em A, depois de 6 horas, em B e após 24 horas em C (n=8). Estatística: ANOVA – uma via, com pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,01$  comparados ao controle (salina).

## 5.2 INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM SINVASTATINA NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS À ENDOTOXEMIA

A seguir, será explicitado os dados obtidos nos testes comportamentais em animais pré-tratados com sinvastatina.

### 5.2.1 Claro-escuro

Neste teste observamos que os animais pré-tratados com a sinvastatina na dose de 10 mg/Kg com posterior aplicação ip. de LPS (Figura 20), apresentaram aumento significativo ( $p < 0,001$ ) do tempo de latência em relação

ao grupo veículo + salina (controle). Contudo para os parâmetros, tempo de permanência no lado claro e número de transições do lado claro para o lado escuro (cruzamentos), notou-se uma redução ( $p < 0,001$  para ambas) quando comparamos ao controle, isto é, o comportamento semelhante à ansiedade observado com a aplicação de LPS foi persistente e o pré-tratamento com a sinvastatina 10 mg/Kg não foi capaz de reverter o quadro de *sickness behavior*. (Anexos-Tabela 5)

Quando a dose de sinvastatina utilizada passa a ser 40 mg/Kg (Figura 21), é possível observar uma reversão do comportamento doente, com redução do tempo de latência ( $p < 0,001$ ) e aumento significativo para o número de transições e tempo de permanência no lado claro ( $p < 0,001$  em ambas) em relação ao grupo veículo + LPS. (Anexos-Tabela 6)

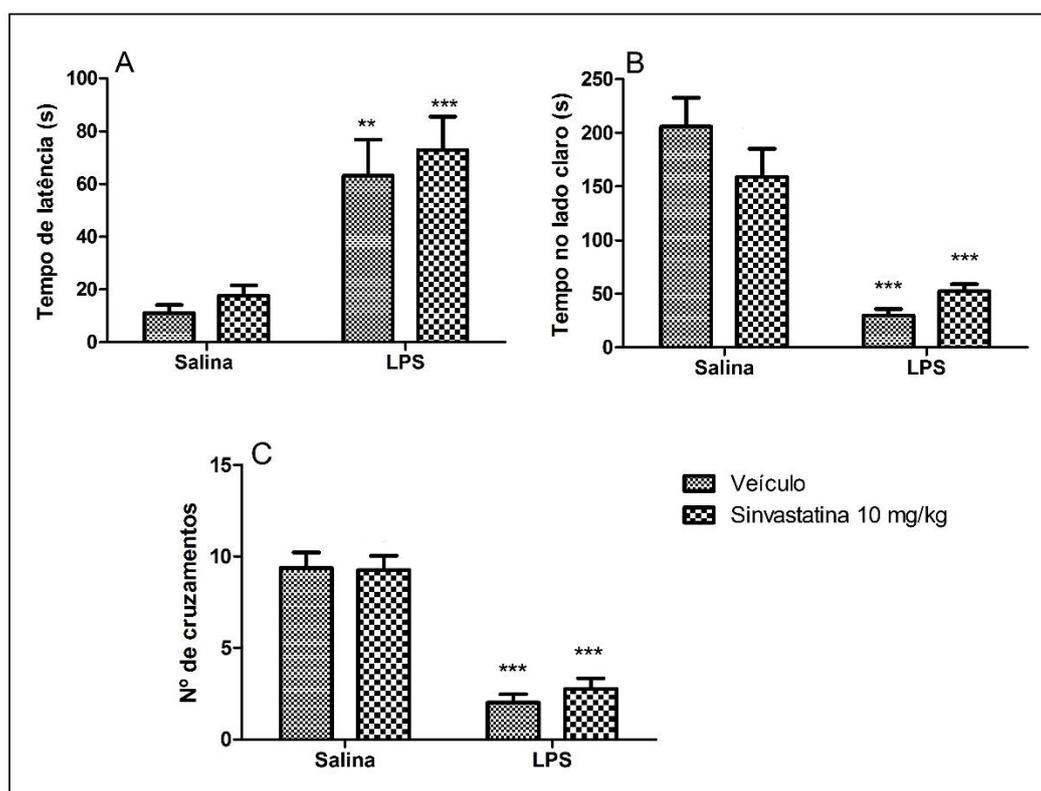


Figura 20 - Efeito do pré-tratamento com a sinvastatina 10 mg/Kg sobre o Teste Claro-escuro durante endotoxemia.

Fonte: Da autora.

Nota: Em A temos o tempo de latência, em B, o tempo de permanência no lado claro e em C, o número de transições do lado claro para o lado escuro (cruzamentos) do animal ( $n=8$ ). Estatística: ANOVA – duas vias, com pós-teste de Tukey. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  comparados ao controle.

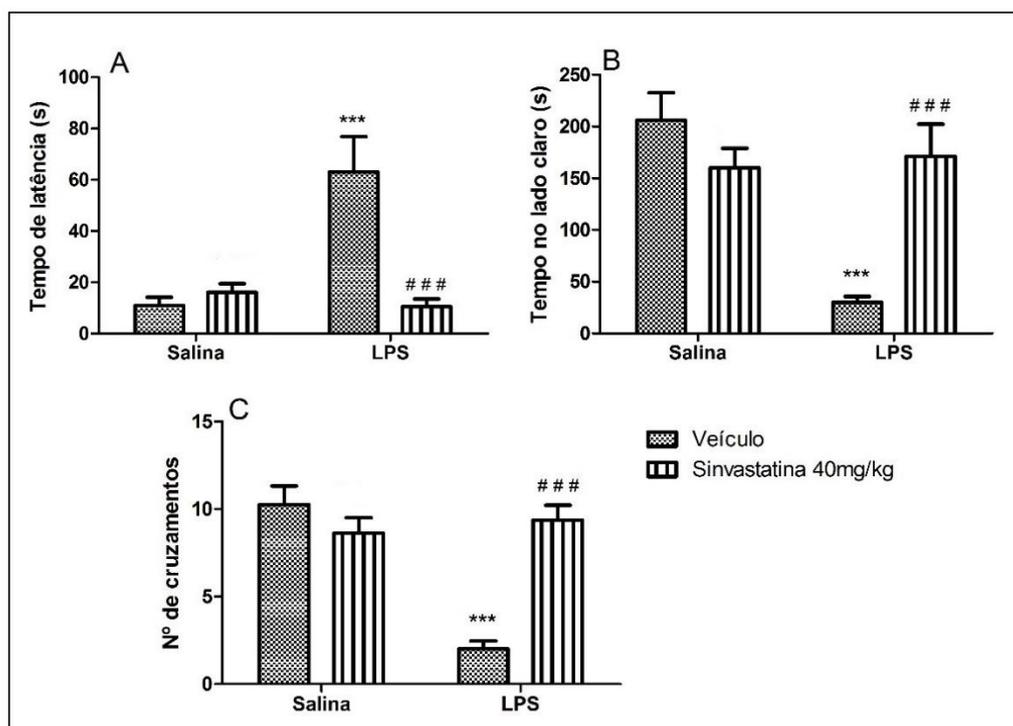


Figura 21 - Efeito do pré-tratamento com a simvastatina 40 mg/Kg sobre o Teste Claro-escuro durante endotoxemia.

Fonte: Da autora.

Nota: Em A, temos o tempo de latência, em B, o tempo de permanência no lado claro e em C, o número de transições do lado claro para o lado escuro (cruzamentos) do animal (n=8). Estatística: ANOVA – duas vias, com pós-teste de Tukey. \*\*\*p<0,001 comparados ao controle. ###p<0,001 comparados ao grupo veículo + LPS.

## 5.2.2 Nado forçado

Na figura 22, podemos observar o parâmetro *floating* (nº de vezes que o animal está boiando) no teste de nado forçado. Nele notamos que apenas animais que receberam o pré-tratamento com a simvastatina 40 mg/Kg, antes da aplicação de LPS, apresentaram redução do número de *floatings* (p<0,001) em relação ao grupo veículo+LPS, ou seja, apenas esta dose do fármaco foi capaz de atenuar o comportamento semelhante ao depressivo. (Anexos-Tabela 10)

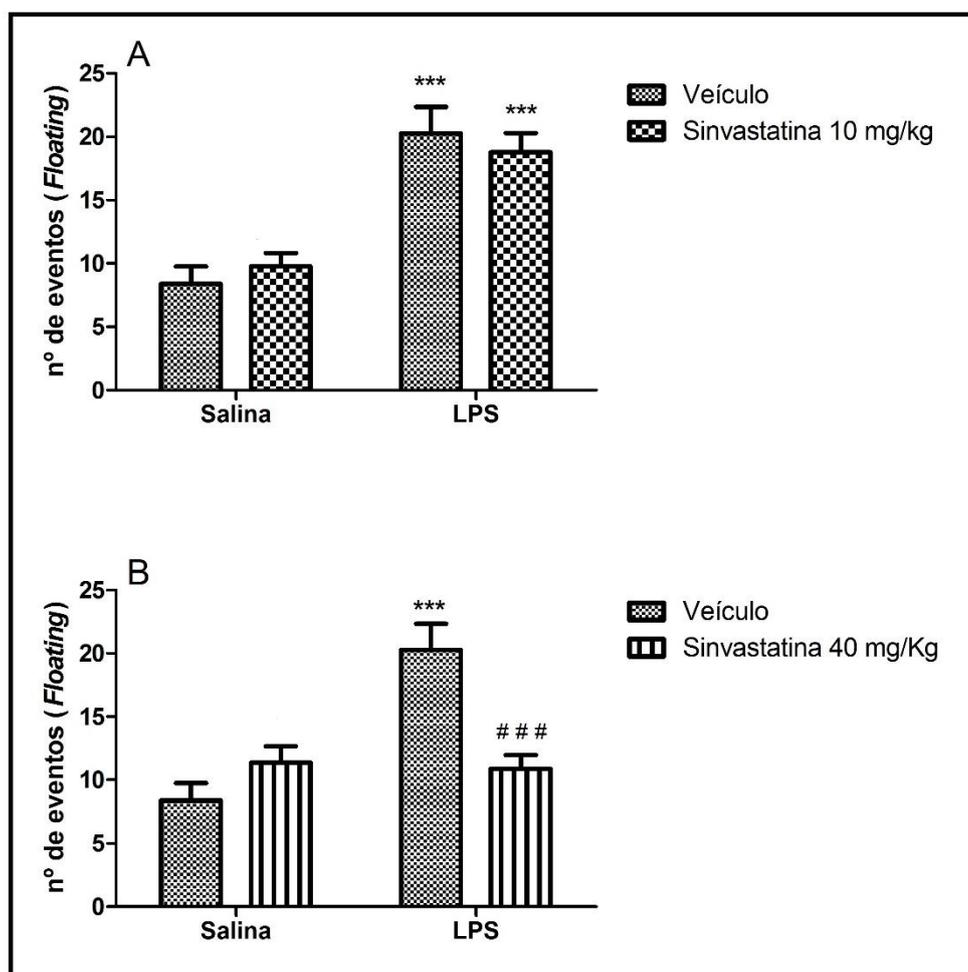


Figura 22 - Efeito do pré-tratamento com a simvastatina 10 e 40 mg/Kg sobre o Teste de Nado Forçado durante endotoxemia.

Fonte: Da autora.

Nota: Observamos em A o número de *floatings* em animais pré-tratados com simvastatina 10 mg/Kg e em B, pré-tratados com simvastatina 40 mg/Kg (n=8). Estatística: ANOVA – duas vias, com pós-teste de Tukey. \*\*\*p<0,001 comparado ao grupo controle. ##p<0,01, ### p<0,001 comparado ao grupo veículo + LPS.

### 5.2.3 Suspensão pela cauda

Após duas horas de aplicação do LPS, os animais pré-tratados com simvastatina 10 mg/Kg submetidos a este teste, apresentarem aumento (p<0,001) do tempo de imobilidade quando comparados ao grupo dos animais controle, porém ocorreu uma redução significativa (p<0,001) do tempo de imobilidade, em animais que receberam a simvastatina por 7 dias na dose de 40

mg/Kg, em relação ao grupo que recebeu veículo + LPS (Figura 23). (Anexos-Tabela 9)

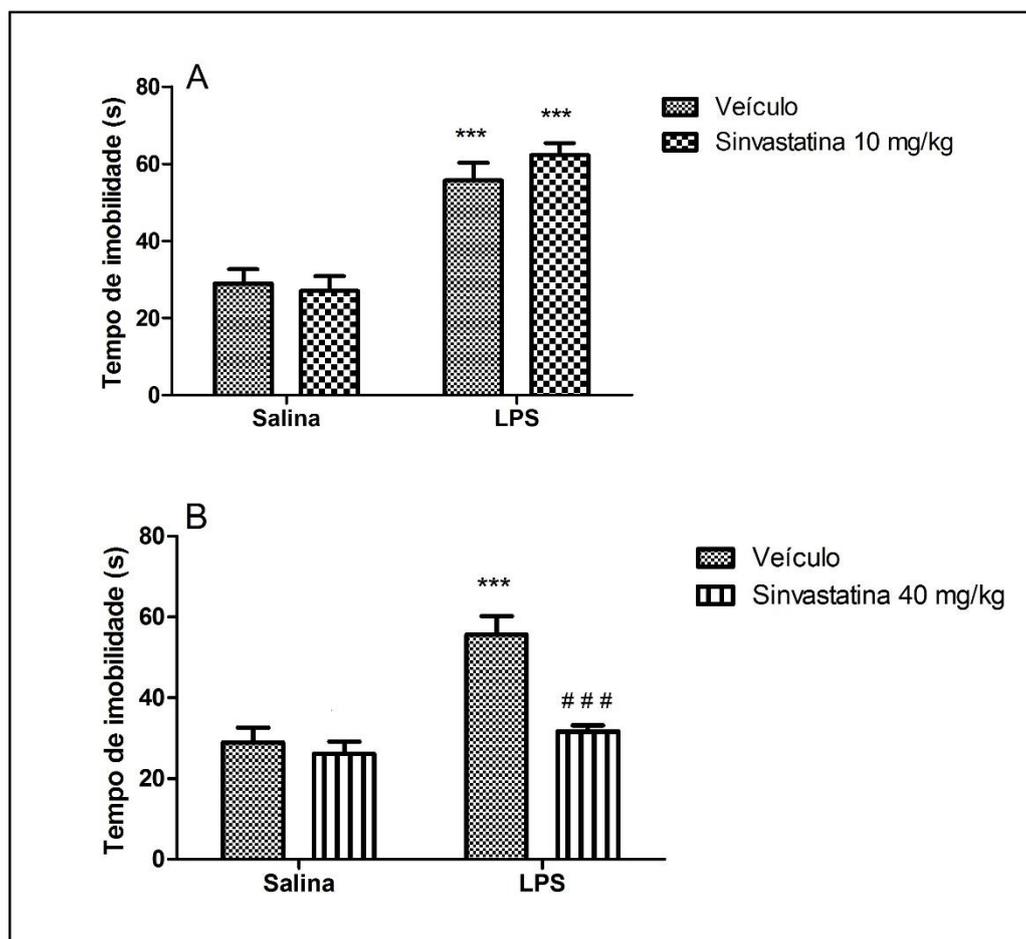


Figura 23 - Efeito do pré-tratamento com a simvastatina 10 e 40 mg/Kg sobre o Teste de Suspensão pela cauda durante endotoxemia.

Fonte: Da autora.

Nota: Observamos em A o tempo de imobilidade dos animais pré-tratados com simvastatina 10 mg/Kg e em B, pré-tratados com simvastatina 40 mg/Kg (n=8). Estatística: ANOVA – duas vias, com pós-teste de Tukey. \*\*\*p<0,001 comparado ao grupo controle, ###p<0,001 comparado ao grupo veículo + LPS.

#### 5.2.4 Campo aberto

Neste teste podemos observar que passadas duas horas da injeção i.p. de LPS, os animais pré-tratados com simvastatina 10 mg/kg por sete dias (Figura 24), apresentaram redução no número de cruzamentos periféricos (p<0,001), no número de cruzamentos centrais (p<0,001), no número de cruzamentos totais

( $p < 0,001$ ) e no número de *rearings* comparado ao grupo controle e dessa forma, podemos notar que a dose de 10 mg/Kg da droga, não foi capaz de reverter o *sickness behavior* induzido pelo LPS. Contudo, ao pré-tratar os animais com a sinvastatina na dose de 40 mg/Kg (Figura 25), nota-se uma reversão do quadro doentio, com aumento significativo quanto ao número de cruzamentos periféricos ( $p < 0,001$ ), cruzamentos centrais ( $p < 0,001$ ), cruzamentos totais ( $p < 0,001$ ) e número de *rearings* ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo tratado com veículo+LPS. (Anexos-Tabela 7 e 9)

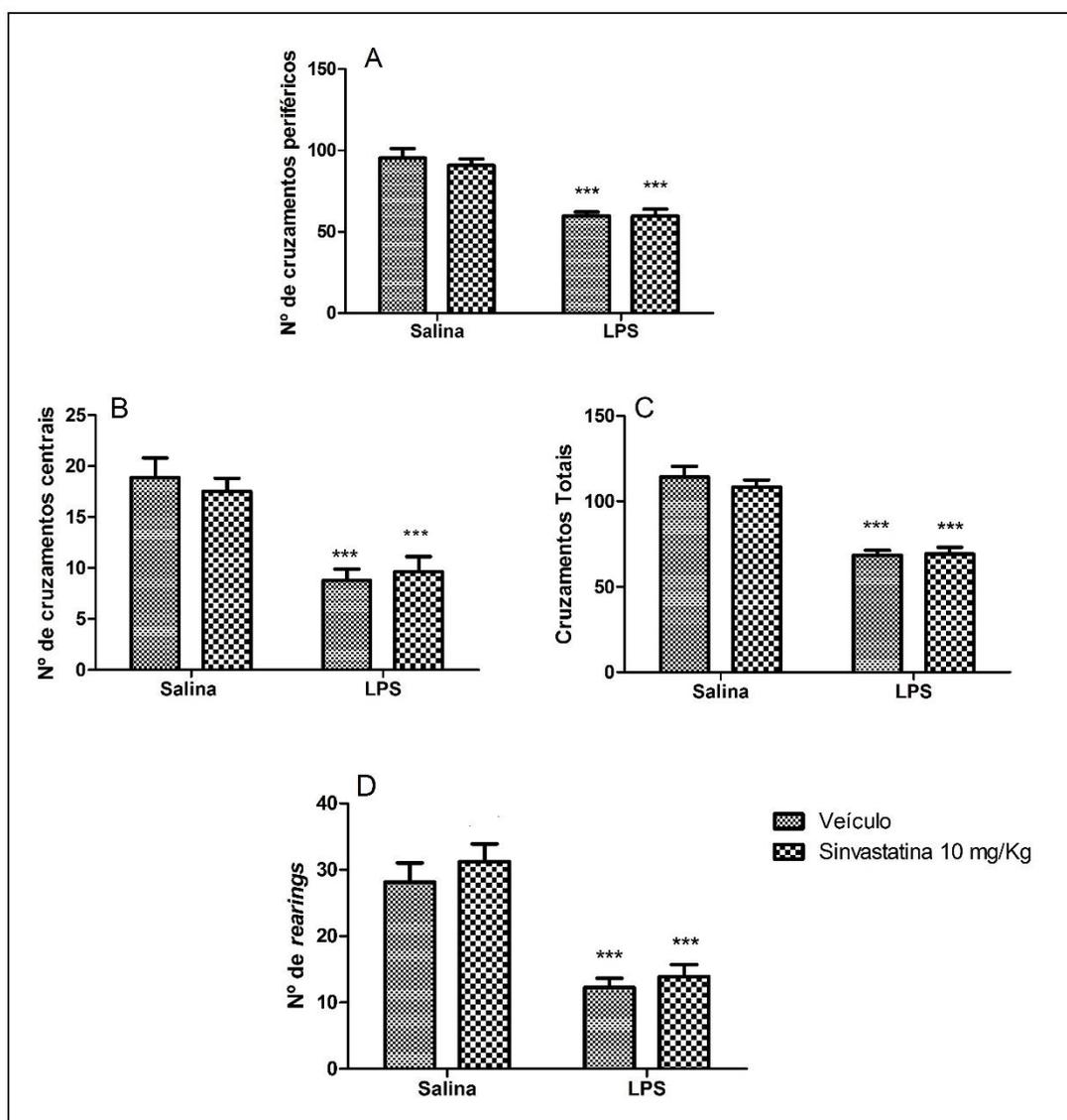


Figura 24 - Efeito do pré-tratamento com a sinvastatina 10 mg/Kg sobre o Teste de Campo Aberto durante endotoxemia.

Fonte: Da autora.

Nota: Em A temos o número de cruzamentos periféricos, em B, o número de cruzamentos centrais, em C, o número de cruzamentos totais e em D, o número de *rearings* (n=8). Estatística: ANOVA – duas vias, com pós-teste de Tukey. \*\*\* $p < 0,001$  comparados ao controle.

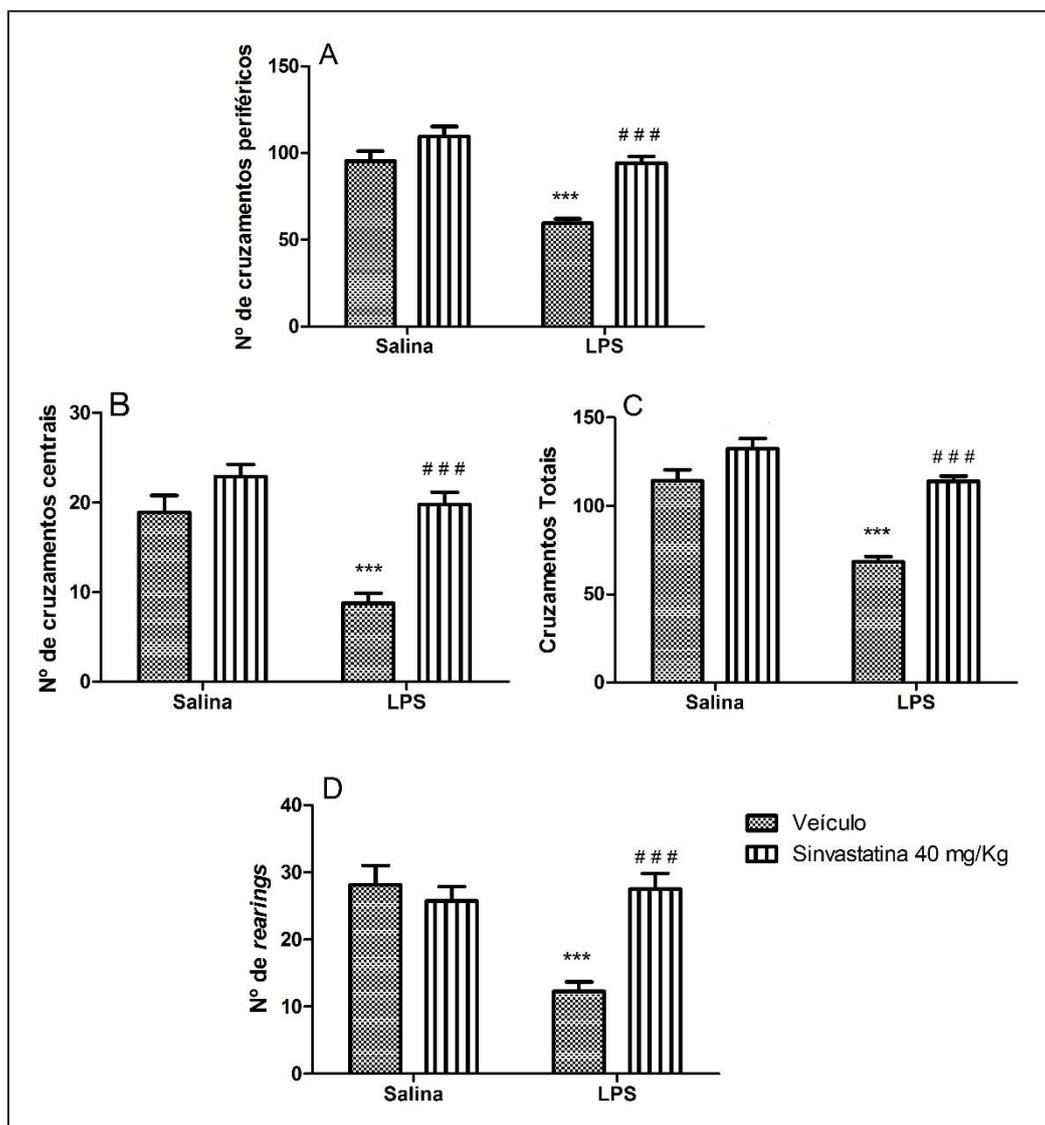


Figura 25 - Efeito do pré-tratamento com a sinvastatina 40 mg/Kg sobre o Teste de Campo Aberto durante endotoxemia.

Fonte: Da autora.

Nota: Em A temos o número de cruzamentos periféricos, em B, o número de cruzamentos centrais, em C, o número de cruzamentos totais e em D, o número de *rearings*. Estatística: ANOVA – duas vias, com pós-teste de Tukey. \*\*\* $p < 0,001$  comparados ao controle. ###  $p < 0,001$  comparados ao grupo veículo + LPS.

### 5.3 INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM SINVASTATINA NA FEBRE INDUZIDA POR LPS

Quanto à temperatura corporal, os animais submetidos à telemetria, que receberam apenas veículo+LPS, apresentaram uma hipotermia branda seguida de febre, uma resposta semelhante a esta, também pôde ser observada em

camundongos que receberam a sinvastatina 10 mg/Kg e posterior aplicação de LPS, ou seja, o pré-tratamento com a sinvastatina nesta dose, não foi capaz de reverter a hipotermia e o quadro febril.

Em contrapartida, camundongos pré-tratados com a sinvastatina 40 mg/Kg e submetidos à endotoxemia induzida pelo LPS (Figura 26), apresentaram um quadro de hipotermia, contudo ele não foi seguido de febre.

O índice térmico (área sob a curva) do intervalo entre 30 a 180 minutos apresentou-se reduzido no grupo sinvastatina40+LPS ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle. Contudo, no intervalo entre 330 a 480 minutos, o índice térmico aumentou no grupo veículo+LPS em relação ao controle ( $p < 0,001$ ) e diminuiu no grupo sinvastatina40+LPS ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao veículo+LPS (Figura 27). (Anexos-Tabela 13)

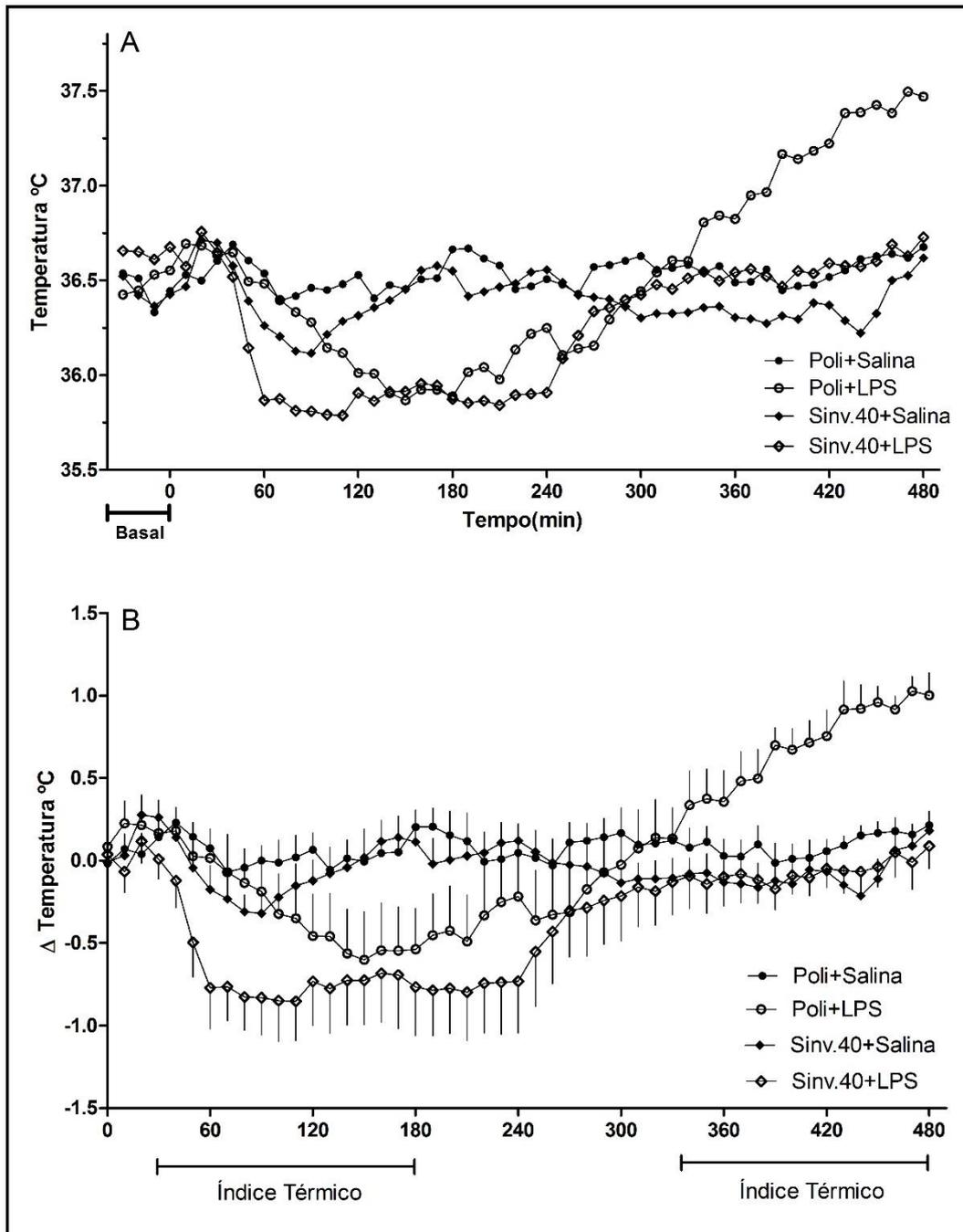


Figura 26 - Efeitos do pré-tratamento com a simvastatina 40 mg/Kg sobre a temperatura corporal (A) e o delta da temperatura (B) durante a endotoxemia (n=11-12).  
Fonte: Da autora.

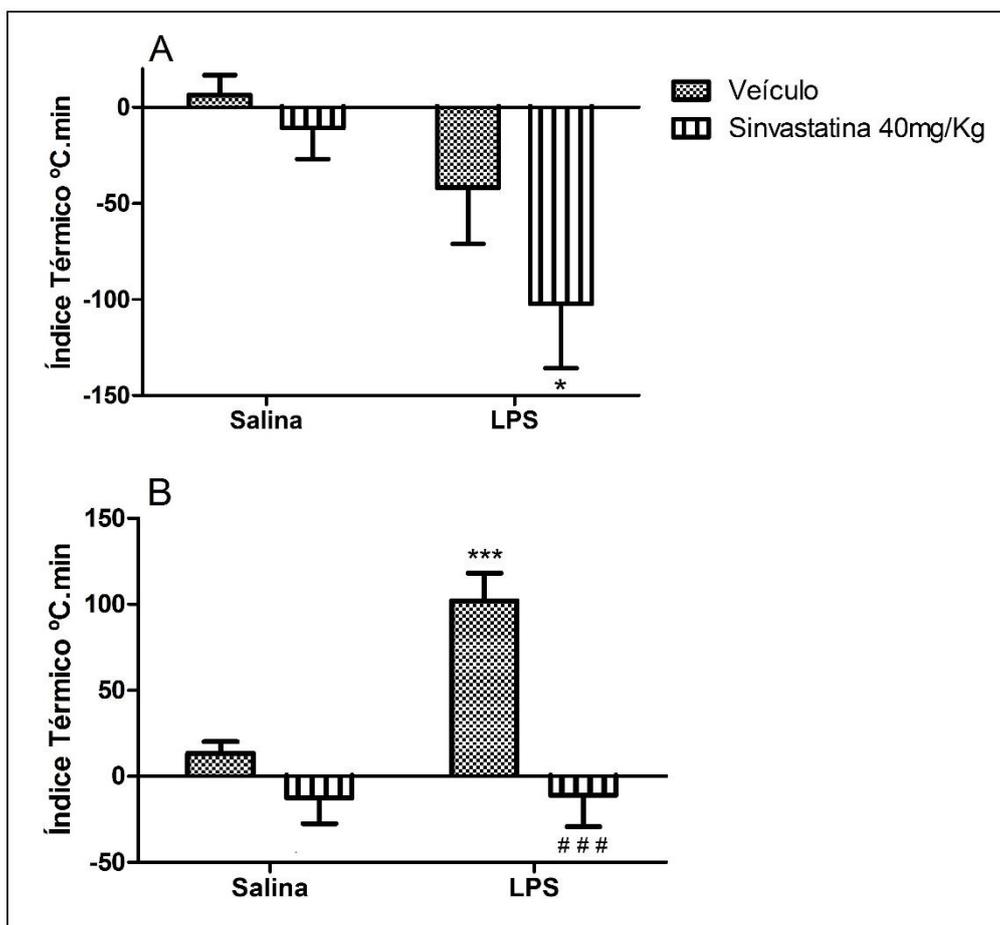


Figura 27 - Índice térmico em animais pré- tratados com sinvastatina 40mg/Kg.

Fonte: Da autora.

Nota: Em A temos o intervalo de 30 a 180 minutos após a aplicação de LPS e em B, o intervalo de 330 a 480 minutos após a aplicação de LPS (n=11-12). Estatística: ANOVA – duas vias, com pós-teste de Tukey. \*p<0,05, \*\*\*p<0,001 comparados ao controle. ### p<0,001 comparado ao grupo veículo + LPS.

#### 5.4 INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO COM SINVASTATINA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS PLASMÁTICAS DURANTE A ENDOTOXEMIA

Os animais que receberam o pré-tratamento com sinvastatina na dose 10 mg/Kg e posteriormente, aplicação de LPS (Figura 28), apresentaram aumento nos níveis séricos de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (p<0,01 e p<0,05 respectivamente) quando comparados ao grupo controle. Já os animais que receberam pré-tratamento com a sinvastatina de 40 mg/Kg e injeção i.p. de LPS (Figura 29), apresentaram níveis séricos de IL-1 $\beta$  semelhantes ao controle e aumento nos níveis de TNF- $\alpha$

( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo tratado com veículo+salina. (Anexos-Tabela 11 e 12)

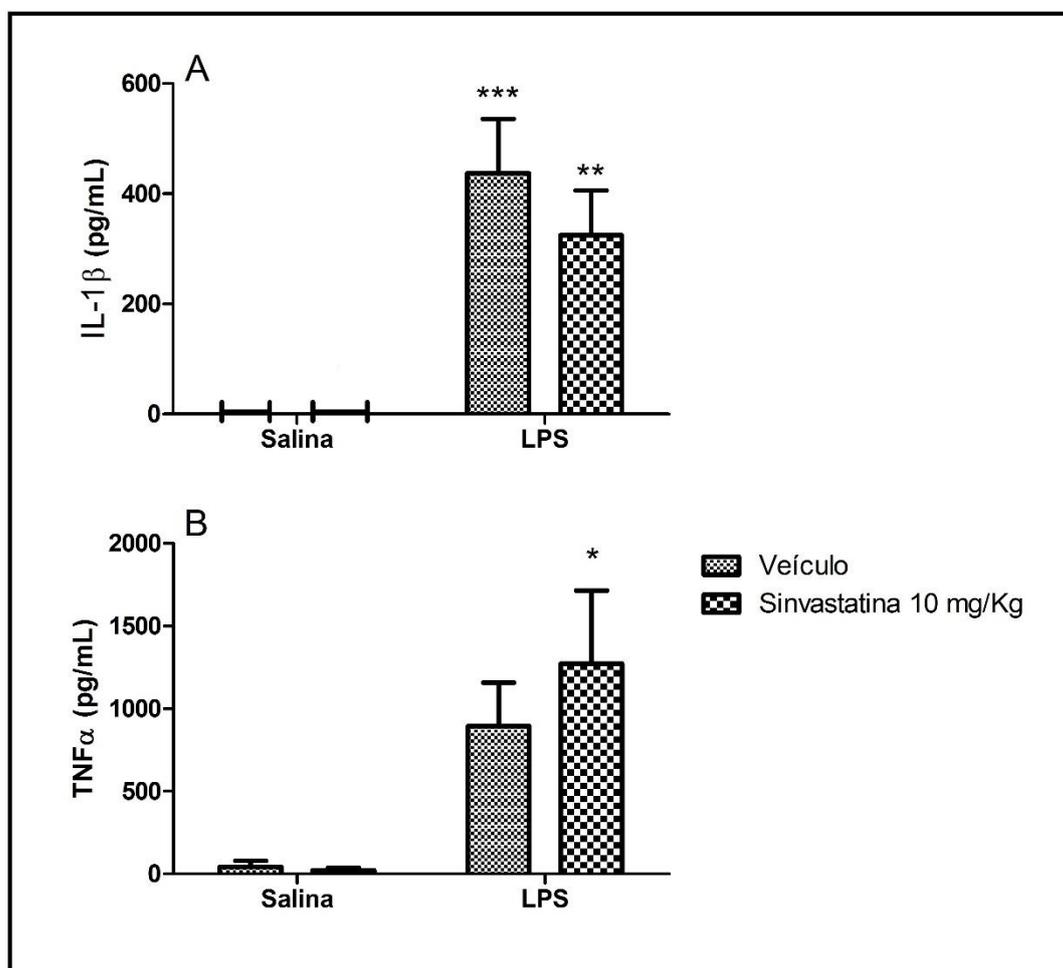


Figura 28 - Concentração plasmática de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , em animais pré-tratados com simvastatina 10mg/Kg.

Fonte: Da autora.

Nota: Estatística: ANOVA – duas vias, com pós-teste de Tukey (n=6). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  comparados ao controle (veículo+salina).

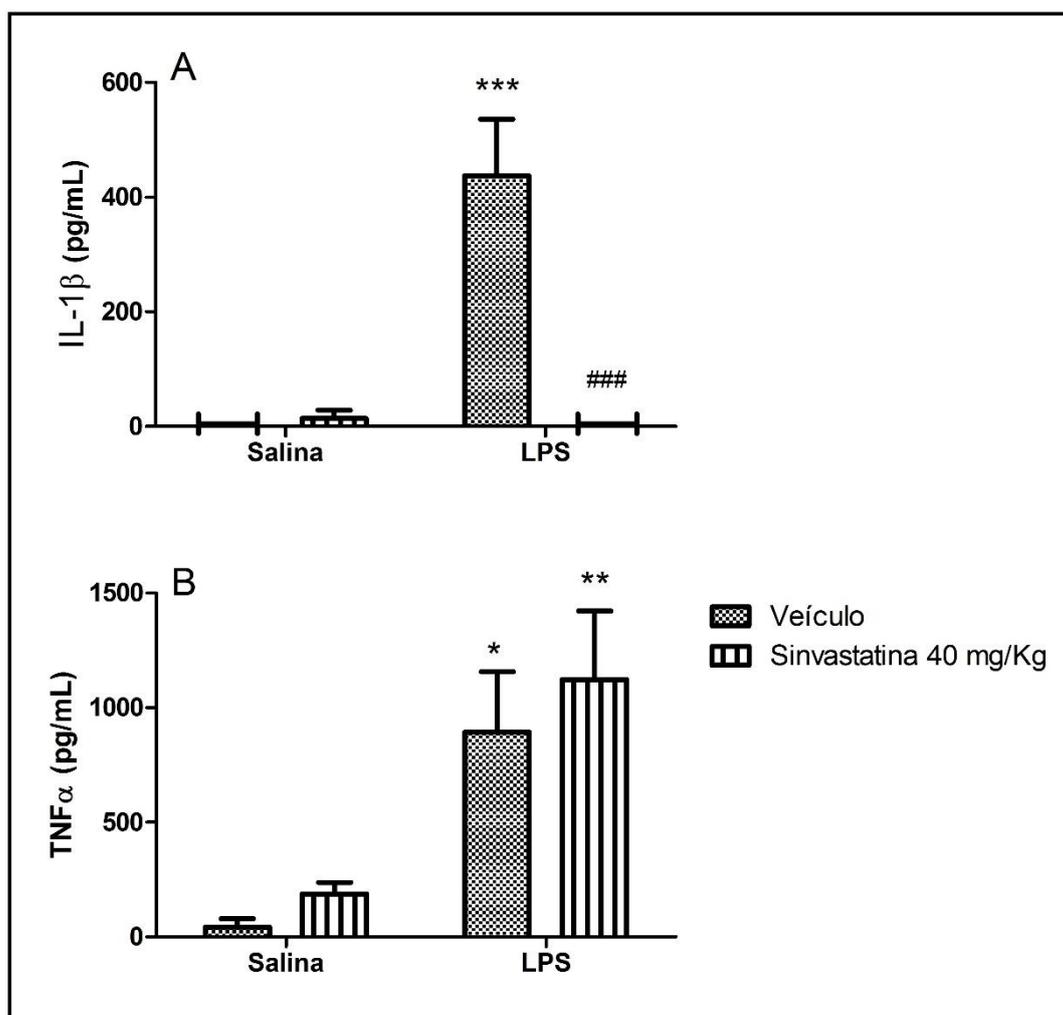


Figura 29 - Concentração plasmática de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , em animais pré-tratados com sinvastatina 40mg/Kg.

Fonte: Da autora.

Nota: Estatística: ANOVA – duas vias, com pós-teste de Tukey (n=6). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 comparados ao controle (veículo+salina). ###p<0,001 comparados ao grupo veículo + LPS. Fonte: da Autora

## 6 DISCUSSÃO

O LPS é um potente ativador do sistema imune. Numerosos estudos tem mostrado que a administração sistêmica de LPS em animais, leva a um estado comportamental caracterizado por sintomas como: letargia, redução da atividade locomotora e do apetite e aumento de sensibilidade à dor (HART, 1988; KENT et al., 1992). De acordo com estudos de prévios do laboratório, o *sickness behavior* é um estado motivacional no qual o animal está empenhado a evitar gasto energético (de PAIVA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2013; SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2015). Vários destes sintomas são muito semelhantes aos sintomas clinicamente relevantes na depressão em seres humanos (DANTZER et al., 2008; KRISHNADAS; CAVANAGH, 2012). Portanto, a administração sistêmica de LPS vem sendo utilizada como um dos modelos experimentais para estudar a inflamação associada à depressão em roedores (FRENOIS; MOREAU; O'CONNOR, 2007; HENRY; HUANG; WYNNE, 2008; O'CONNOR; LAWSON; ANDRÉ, 2009).

Neste sentido, testes comportamentais como claro-escuro, nado forçado, suspensão pela cauda e campo aberto realizados neste estudo, permitiram averiguar comportamento doentio (análogos aos efeitos ansiogênicos e depressivos) em animais que receberam administração sistêmica de LPS (CHAOULOFF; DURAND; MORMEDE, 1997; DE PAIVA et al., 2010; DUNN; SWIERGIEL, 2005; PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977; SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2015).

Os dados apresentados em nosso estudo com diferentes doses e horários de administração de LPS, permitiram-nos ter uma visão temporal da resposta comportamental à esta endotoxina. A partir deles, foi possível afirmar que o ápice da resposta comportamental acontece as 2h, conforme descrito por NOLDNER e SCHOTZ (2007), sendo que ela se atenua com o passar do tempo até se tornar imperceptível, 24h após a aplicação.

Nossos testes mostraram que os animais que receberam o LPS na dose de 200 µg/Kg e foram submetidos aos testes acima citados, duas horas após a aplicação i.p., reduziram a capacidade exploratória/locomotora, caracterizando um quadro de comportamento doentio. Estes dados corroboram com os estudos

de Bassi et al., (2012), que 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. Silva e Giusti-Paiva (2015) também utilizaram a dose de 200 µg/Kg de LPS, para avaliar a endotoxemia em camundongos com hipotireoidismo e constataram que nestes animais o *sickness behavior* é atrasado.

Nossos resultados também revelaram que o pré-tratamento por sete dias com a sinvastatina na dose de 10 mg/Kg não foi capaz de reverter o comportamento doentio induzido pelo LPS em nenhum dos aparatos testados, contudo, quando o pré-tratamento foi realizado com a dose de 40 mg/Kg, observamos uma reversão do *sickness behavior*.

Qing et al., (2009) demonstraram que a administração de sinvastatina 1 mg/Kg por 28 dias, através de gavagem, em ratos, não alterou de forma significativa o comportamento do animal nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado, todavia, com a administração da sinvastatina 10 mg/Kg pelo mesmo período, foi possível observar um aumento da velocidade e da distância percorrida pelo animal no campo aberto e no tempo de permanência no braço aberto no labirinto em cruz elevado.

Young-Xu et al., (2003) demonstraram que o uso a longo prazo de estatinas parece estar associado com um menor risco de ansiedade e depressão em pacientes de ambulatório clínico de cardiologia. Outro estudo mostrou, que indivíduos que fazem uso de estatina, podem ter um risco menor de desenvolver depressão do que indivíduos não-usuários de estatina (YANG; JICK; JICK, 2003). Além disso, outras pesquisas expuseram que o uso de estatina está associado com redução significativa no risco de depressão, em pessoas que têm uma história de doença arterial coronariana (OTTE; ZHAO; WHOOLEY, 2012; STAFFORD; BERK, 2011).

Renshaw et al., (2009) foram os primeiros a testar o possível efeito antidepressivo das estatinas em um modelo comportamental animal. Eles trataram ratos com lovastatina por 30 dias e demonstraram através do teste de nado forçado, que este tratamento potencializou o efeito antidepressivo da dose sub-terapêutica de fluoxetina, com expressiva diminuição do tempo gasto em

estado de imobilidade no teste, observaram também, que o tratamento apenas com a lovastatina não foi eficaz, sugerindo que a dose de lovastatina utilizada (2mg/kg/dia) pode ter sido muito baixa para mostrar os próprios efeitos comportamentais da lovastatina neste estudo. Em outras pesquisas, observou-se também a redução do tempo de imobilidade neste teste, em ratos tratados com sinvastatina (CAN et al., 2012; KILIC et al., 2012).

Elbatsh (2015) observou através do teste de nado forçado uma redução do comportamento depressivo, em ratos diabéticos que receberam a sinvastatina oralmente na dose de 10 mg/Kg, por 14 dias. Ele constatou também, que esta redução observada no teste, parece estar relacionada com mudanças bioquímicas nos níveis sanguíneos de corticosterona e concentração de serotonina no hipocampo.

Shahsavarian et al., (2014) estudaram o efeito semelhante à depressão em camundongos tratados com atorvastatina por gavagem, 1 hora antes do teste e demonstraram que ela atua reduzindo o tempo de imobilidade nestes animais, através do receptor ativado por proliferação de peroxissoma-gama (peroxissome proliferator-activated-gamma/ PPAR- $\gamma$ ) e pela via do óxido nítrico.

Ludka et al., (2013) demonstraram que a administração aguda de atorvastatina via oral em camundongos, é capaz de produzir um efeito, semelhante ao antidepressivo, no teste de suspensão pela cauda através da modulação do NMDA e da L-arginina-NO-GMPc, sem afetar a atividade locomotora dos animais.

Contudo, mesmo com a existência destes estudos, na literatura ainda são escassas pesquisas que abordem conjuntamente a administração das estatinas e testes comportamentais, como nado forçado e suspensão pela cauda, frente ao desafio imunológico com LPS. Diante disso, nossos resultados para o teste de nado forçado, mostraram que o aumento do número de *floatings* observado após a aplicação de LPS foi revertido em animais que receberam a sinvastatina na dose de 40 mg/kg durante 7 dias, antes da aplicação i.p. de LPS e quanto ao teste de suspensão pela cauda, observamos reversão significativa do aumento de tempo de imobilidade em camundongos pré-tratados com a sinvastatina (40 mg/Kg) durante endotoxemia. Este dados nos permitem sugerir um possível efeito antidepressivo para esta dose do fármaco, ou seja, o pré-tratamento com

sinvastatina é capaz de prevenir a ocorrência de *sickness behavior* induzido pelo LPS.

Yirmiya et al., (1995) mostrou que animais sob comportamento doentio, apresentaram redução da atividade locomotora, quando submetidos ao teste de campo aberto. Crawley (1981) demonstrou que o teste claro-escuro, assim como o teste de campo aberto, é capaz de avaliar o comportamento semelhante à ansiedade nos animais (PRUT; BELZUNG, 2003). Swiergiel e Dunn (2007) sugeriram que a administração de LPS ou IL-1 $\beta$  é capaz de induzir comportamento doentio, caracterizado pela redução da atividade locomotora, ou seja, redução na motivação de explorar o aparato.

Dados de Kilic et al., (2012) expuseram que após pré-tratar ratos com sinvastatina e submetê-los ao teste de labirinto em cruz elevado (teste que também afere a atividade tipo-ansiolítica) observa-se redução do efeito análogo à ansiedade nos animais.

Estudos de Qing et al., (2009) demonstraram que a administração de sinvastatina 10 mg/Kg por 28 dias, através de gavagem, em ratos, aumentou a velocidade e a distância percorrida pelo animal no teste de campo aberto e também o tempo de permanência no braço aberto no labirinto em cruz elevado. Enquanto que, dados de Vandresen-Filho et al., (2015) mostraram que o pré-tratamento com a sinvastatina, nesta mesma dose, por sete dias, não alterou o comportamento do animal, tal qual foi observado em nossos animais controles.

Todavia, estes trabalhos não expõe a influência do pré-tratamento com a sinvastatina frente ao desafio imunológico com LPS, em animais submetidos a testes comportamentais como em nosso trabalho.

Em nosso estudo, no teste de campo aberto, os animais que receberam sinvastatina 40 mg/Kg (p.o.) e posterior aplicação de LPS, apresentaram um retorno no número de cruzamentos periféricos, centrais e totais e também no número de *rearings*, ou seja, a resposta observada foi similar a dos animais controles. Já no teste claro-escuro, observamos que o grupo pré-tratado com sinvastatina 40 mg/Kg antes da administração de LPS, apresentou reversão das alterações comportamentais, entre as quais: redução do tempo de permanência do animal no lado claro do aparato, do número de cruzamentos e aumento do tempo de latência induzido pela administração de LPS. Estes dados permitem-nos sugerir que o pré-tratamento com a sinvastatina (40 mg/Kg) antes da

aplicação i.p. de LPS foi capaz de aumentar a atividade locomotora dos animais e a motivação em explorar os aparatos.

Dessa forma, nossos testes comportamentais mostraram que o pré-tratamento com a sinvastatina na dose de 40 mg/Kg por sete dias, foi capaz de reverter o quadro de comportamento doentio induzido pela endotoxemia e considerando que a administração de LPS induz um comportamento doentio (caracterizado por componentes depressivos e ansiogênicos), podemos sugerir, que a sinvastatina é capaz de reduzir ou abolir o comportamento doentio em animais submetidos à endotoxemia induzida pelo LPS.

O LPS atua sobre o organismo através de sua ligação com o receptor: *Toll-like receptor 4 (TLR4)*, que é um dos 13 receptores *TLRs* conhecidos até o momento em humanos (BELVIN; ANDERSON, 1996). Essa ligação ocorre por meio da proteína ligadora de LPS, conhecida como LBP, a qual é produzida pelo fígado durante a resposta de fase aguda. Através desta ligação, temos a ativação de NF- $\kappa$ B (BARTON; MEDZHITOV, 2003; LI; QIN, 2005) que, por sua vez, ativa a transcrição de citocinas pro-inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (DANTZER, 2009).

Neste estudo, 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 pré-tratamento com a sinvastatina na dose de 10 mg/Kg, antes da aplicação de LPS, não foi capaz de atenuar este aumento sobre concentrações plasmáticas de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Nós hipotetizamos que essa resposta observada, esteja relacionada à dose do fármaco administrada, pois quando utilizamos a dose de 40 mg/Kg, obtivemos uma redução nos níveis séricos de IL1-1 $\beta$ , mas não nos níveis de TNF- $\alpha$ .

Diversos estudos já abordaram os efeitos pleiotrópicos das estatinas, entre eles, o seu papel anti-inflamatório tem grande destaque (JACOBSON et

al., 2005; STEINER et al., 2005). Todavia, há controvérsias na literatura sobre este papel, alguns estudos sugerem que o uso de estatinas potencializa a liberação de citocinas com a administração de LPS, enquanto outros estudos, dizem o contrário, ou seja, o tratamento com as estatinas inibe o aumento de citocinas induzido por LPS.

Ando et al., (2000) trataram camundongos com cerivastatina 20 mg/Kg, 12 horas e 1 hora antes da administração de LPS 15 mg/Kg (ambos i.p.) e constataram redução nos níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e aumento na sobrevivência dos animais. Em outro estudo, ratos diabéticos submetidos à sepse abdominal e tratados com sinvastatina 20 mg/Kg (p.o), 18 horas e 3 horas antes da ligadura e punção do ceco, também apresentaram essa redução (ARAÚJO-FILHO et al., 2010). Outras pesquisas abordaram que o tratamento com as estatinas potencializa a redução de citocinas pró-inflamatórias em animais submetidos à sepse induzida por LPS (BESSLER et al., 2005; COWARD et al., 2006; PAUMELLE et al., 2006). Essa redução também foi observada sobre os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 no miocárdio, em ratos pré-tratados com sinvastatina por injeção intraperitoneal e submetidos à ligação de artéria coronária descendente anterior (esquerda) (NAJAD et al., 2013).

Em contrapartida, Erikstrup et al., (2006) demonstraram que o curto tratamento com sinvastatina 20 mg/Kg não influenciou os níveis de citocinas durante endotoxemia em um estudo in vivo. Stolf et al., (2012) mostrou que tanto a sinvastatina quanto a atorvastatina, em baixas ou altas doses, não afetaram a expressão do antioxidante dismutase superóxido e de genes pró-inflamatórios TNF- $\alpha$ , em animais submetidos à sepse por ligadura e punção do ceco.

Conforme já explicitado, nossos testes mostraram que o pré-tratamento com a sinvastatina 40 mg/Kg não alteraram os níveis séricos de TNF- $\alpha$ , mas reduziram os níveis de IL-1 $\beta$  aumentados pelo LPS.

O IL-1  $\beta$  é uma importante citocina para indução do *sickness behavior*. A administração periférica ou central de IL-1 $\beta$  induz os componentes centrais da reação de fase aguda, incluindo febre, ativação do eixo HPA e depressão comportamental (ANFORTH; BLUTHE; BRISTOW, 1998; BLUTHE; LAYE; MICHAUD, 2000). Um estudo apontou que sob condições normais, IL-1 parece ser o mediador predominante do comportamento doente no cérebro, pois quando inibida a sua ação com a administração central do antagonista IL-1r e

analisada a exploração social e ingestão alimentar dos animais, pôde-se constatar a atenuação do *sickness behavior* (BLUTHE et al., 2000; KONSMAN; TRIDON; DANTZER, 2000). Estes dados nos permitem atribuir a reversão do comportamento doentio observado em camundongos pré-tratados com a sinvastatina 40 mg/Kg, antes da aplicação i.p. de LPS, à redução nas concentrações plasmáticas de IL-1 $\beta$ .

Quanto à temperatura corporal, nossos resultados apontaram que animais que receberam LPS na dose de 200  $\mu$ g/Kg, apresentaram uma hipotermia que foi seguida pelo desenvolvimento de febre. Akarsu e Mamuk (2007) demonstraram que a administração de LPS 250  $\mu$ g/Kg, causa uma hipotermia branda aproximadamente 2 horas após a administração do LPS. Al-Saffar et al., (2013) notaram que o LPS produz febre quando administrado tanto central quanto periféricamente, contudo o quadro de hipotermia só foi observado com a administração periférica de LPS.

Corroborando com nossos dados, outras pesquisas com roedores também demonstraram que a administração de LPS é capaz de desenvolver um quadro de hipotermia que é seguido de febre (CONN et al., 1995; FELDERG; SAXENA, 1975; FILKINS; LUZIO, 1968; FRAIFELD; KAPLANSKI, 1998; KAMPSCHMIDT; UPCHRUCH, 1969; KLEIN; CONN; KLUGER, 1992; PAUL; FRAIFELD; KAPLANSKI, 1999).

É importante salientar que a febre apresenta um valor adaptativo ao animal, pois ela é capaz de favorecer a recuperação, diminuindo a multiplicação de agentes termossensíveis, ativando neutrófilos envolvidos na destruição de bactérias, aumentando a proliferação de linfócitos e auxiliando a síntese de anticorpos (HART, 1988).

Em nosso trabalho, tanto animais que receberam veículo+LPS, quanto aqueles que receberam sinvastatina+LPS, apresentaram um quadro de hipotermia nas primeiras horas após a aplicação do lipopolissacarídeo e elevados níveis séricos de TNF- $\alpha$ . Felderg e Saxena (1975) sugeriram que a hipotermia observada, pode ser uma resposta secundária do organismo, a qual possivelmente ocorre devido à mudanças cardiovasculares induzidas pelo LPS. Outros estudos experimentais evidenciaram que a hipotermia induzida pelo LPS não se desenvolve simplesmente pela perda de calor periférico, contrário a isso, ocorre na verdade, ativação de mecanismos termorregulatórios durante o estado

hipotérmico. Fatores como a redução da termogênese e queda do limiar da temperatura corporal para produção de calor metabólico poderiam contribuir para o desenvolvimento deste quadro (DERIJK et al., 1994; ROMANOVSKY et al., 1996).

Segundo Kozak (1997) a resposta hipotérmica induzida pelo LPS é iniciada pela elevação de TNF- $\alpha$  na periferia da circulação sanguínea. Ele causa um aumento significativo do nível de TNF- $\alpha$  no plasma antes do desenvolvimento da hipotermia em camundongos (PAUL; FRAIFELD; KAPLANSKI, 1999), sabe-se ainda, que a inibição da bioatividade desta citocina é capaz de atenuar a hipotermia induzida por LPS em ratos e camundongos (DERIJK; BERKENBOSCH, 1994; KOZAK et al., 1995; LEON, 2004; TOLLNER et al., 2000). Estudos de Kluger (1991) expuseram que o TNF- $\alpha$  é um pirogênico endógeno, essencial para o início da resposta pirogênica. Este achado nos permite sugerir que a hipotermia pode ter um papel importante na modulação da resposta pirogênica em roedores.

Em nossa pesquisa, animais do grupo veículo+LPS, exibiram um quadro de hipotermia que foi seguido de febre, esta resposta foi reforçada pelos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  aumentados. Quanto ao pré-tratamento com a sinvastatina na dose de 40 mg/Kg, observamos uma resposta hipotérmica não seguida de febre e níveis de IL-1 $\beta$  reduzidos em relação ao grupo veículo+LPS, o que nos permite sugerir um possível papel termorregulatório relacionado aos baixos níveis plasmáticos desta citocina.

## 7 CONCLUSÃO

O presente trabalho permite-nos concluir que o LPS induz o comportamento doentio (*sickness behavior*), caracterizado por redução da atividade locomotora e exploratória e da motivação para escapar de situações aversivas, acompanhada por alteração da temperatura corpórea e aumento de citocinas plasmáticas.

O pré-tratamento com a sinvastatina pode reduzir ou abolir o comportamento doentio e impedir o desenvolvimento de estado febril em animais submetidos à endotoxemia, provavelmente relacionado com sua capacidade de diminuir os níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$  induzida pelo LPS.

## REFERÊNCIAS

- AKARSU, E. S.; MAMUK, S. Escherichia coli lipopolysaccharides produce serotypespecific hypothermic response in biotelemetered rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 61, n. 5, p.1846-1850, 2007.
- AL-SAFFAR, H. et al. Lipopolysaccharide-induced hypothermia and hypotension are associated with inflammatory signaling that is triggered outside the brain. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 28, p. 188-195, 2013.
- ANDO, H. et al. Cerivastatin improves survival of mice with lipopolysaccharide-induced sepsis. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 294, n. 3, p. 1043-1046, 2000.
- ANFORTH, H. R.; BLUTHE, R. M.; BRISTOW, A. Biological activity and brain actions of recombinant rat interleukin-1alpha and interleukin-1beta. **Eur Cytokine Netw**, v. 9, p. 279-288, 1998.
- ARAÚJO-FILHO, I. et al. Effect of the simvastatin in abdominal sepsis of diabetic rats. **Rev. Col. Bras. Cir**, v. 37, n. 1, p. 39-44, 2010.
- ARONOFF, D. M.; NEILSON, E. G. Antipyretics: mechanisms of action and clinical use in fever suppression. **American Journal of Medicine**, v. 111, n. 4, p. 304-315, 2001.
- AUBERT, A. Sickness and behavior in animals: a motivational perspective. **Neuroscience and Bio behavioral Reviews**, v. 23, p.1029-1036, 1999.
- 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.
- BARACAT, M. et al. **Formulário Médico Farmacêutico**. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks. 2006. 670 p.
- BARTON, G. M.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor signaling pathways. **Science**, v. 300, p. 1524-1525, 2003.

- 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.
- BECK, D. G. S. Efeito da sinvastatina sobre o controle autonômico da pressão arterial em ratas espontaneamente hipertensas. **Dissertação de Mestrado**. UFRGS. 2007.
- BELVIN, M. P.; ANDERSON, K. V. A conserved signaling pathway: the Drosophila Toll-Dorsal pathway. **Annual Review of Cell and Development Biology**, v. 12, p. 393-416, 1996.
- BESSLER, H. et al. In vitro effect of statins on cytokine production and mitogen response of human peripheral blood mononuclear cells. **Clin Immunol**, v. 117, p. 73-77, 2005.
- BIESMANS, S. et al. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. **Mediators of inflammation**, p. 1-14, 2013.
- BLATTEIS, C.M. Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, p.194-223, 2006.
- BLATTEIS, C. M. et al. Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 76, p.1-18, 2005.
- BLUTHE, R. M. et al. Vagotomy attenuates behavioural effects of interleukin-1 injected peripherally but not centrally. **NeuroReport**, v. 7, n. 9, p. 1485-1488, 1996.
- BLUTHE R. M.; LAYE, S.; MICHAUD, B. Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice. **Eur J Neurosci**, v. 12, p. 4447-4456, 2000.
- BOULANT, J. A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 856, p. 108-115, 1998.

- BRACHT, L. et al. Efeito da sinvastatina, da ezetimiba e da associação ezetimiba/sinvastatina sobre a artrite por adjuvante. **Faculdade Integrado de Campo Mourão-Farmácia e Farmacologia**, 2013.
- BURRELL, R. Human responses to bacterial endotoxin. **Circ Shock**, v. 43, n. 3, p.137-53, 1994.
- CAMPO, V.L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Quím. Nova**, v. 30, n. 2, 2007.
- CAN, O. D. et al. The effect of simvastatin treatment on behavioral parameters, cognitive performance, and hippocampal morphology in rats fed a standard or a high-fat diet. **Behav Pharmacol**, v. 23, p. 582-592, 2012.
- CARNIO, E. C. et al. Neuro-immune-endocrine mechanisms during septic shock: role for nitric oxide in vasopressin and oxytocin release. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 137-142, 2006.
- CASEY, P. J.; SEABRA, M. C. Protein prenyltransferases. **J Biol Chem**, v. 271, n. 10, p. 5289-5292, 1996.
- CASTRO, G. R. W. Efeitos da sinvastatina em modelo de osteoartrite em ratos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- 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.
- CONN, C. A. et al. Cytokines and the acute phase response to influenza virus in mice. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. 78-84, 1995.
- COWARD, W.R. et al. SC. Statin-induced proinflammatory response in mitogen-activated peripheral blood mononuclear cells through the activation of caspase-1 and IL-18 secretion in monocytes. **J Immunol**, v. 176, p. 5284-5292, 2006.
- CRAWLEY, J.N. Neuropharmacologic Specificity of a Simple Model for the Behavioural Actions of Benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 15, p. 696 – 699, 1981.

DAHAN, A.; HOFFMAN A. Enhanced gastrointestinal absorption of lipophilic drugs. **Enhancement in Drug Delivery**, Florida: CRC Press, p. 111-127, 2006.

DANTAS, A. C. B. et al. Protective effect of simvastatin in the cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 43-46, 2010.

DANTZER, R. et al. Cytokines and sickness behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, p. 586-90, 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: where do we stand? **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 15, n. 1, p. 7-24, 2001.

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. **Immunology And Allergy Clinics of North America**, 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.

DERIJK, R. H.; BERKENBOSCH, F. Hypothermia to endotoxin involves the cytokine tumor necrosis factor and the neuropeptide vasopressin in rats. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. 9-14, 1994.

DERIJK, R. H. et al. Hypothermia to endotoxin involves reduced thermogenesis, macrophage-dependent mechanisms, and prostaglandins. **American Journal of Physiology**, v. 266, p.1-8, 1994.

DIOMEDE, L. et al. In vivo anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, p. 1327-1332, 2001.

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.

ELBATSH, M. M. Antidepressant-like effect of simvastatin in diabetic rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Egypt, v. 93, n. 8, p. 649-656, 2015.

ENDO, A. A historical perspective on the discovery of statins. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**, v. 86, n. 5, p. 484-493, 2010.

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

ERIKSTRUP, C.; ULLUM, H.; PEDERSEN, B. K. Short-term simvastatin treatment has no effect on plasma cytokine response in a human in vivo model of low-grade inflammation. **Clin Exp Immunol**, v. 144, p. 94-100, 2006.

FARMER, J. A. Pleiotropic effects of statins. **Curr Atheroscler Rep**, v. 2, p. 208-217, 2000.

FELDBERG, W.; SAXENA, P. N. Prostaglandins, endotoxin and lipid A on body temperature in rats. **Journal of Physiology**, London, v. 249, n. 3, p. 601-615, 1975.

Food and Drug Administration (FDA). Disponível em:  
<<http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm256581.htm>>. Acesso em: 22 10 2015

FILKINS, J. P.; DI LUZIO, N. R. Endotoxin induced hypothermia and tolerance in the rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 129, n. 3, p. 724-726, 1968.

FRAIFELD, V.; KAPLANSKI, J. Brain eicosanoids and LPS fever: species and age differences. In: Sharma HS, Westman J, editors. **Progress in Brain Research**, v. 115, p.141-57, 1998.

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.

GIANNINI, S.D. et al. Aspectos terapêuticos das dislipidemias – Tratamento farmacológico – Vastatinas: semelhanças e diferenças. Ver. Soc. **Cardiol**, São Paulo, 1999.

GIUSTI-PAIVA, A. et al. Inducible nitric oxide synthase pathway in the central nervous system and vasopressin release during experimental septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 6, p. 1306-1310, 2002.

GIUSTI-PAIVA, A. et al. Simvastatin decreases nitric oxide overproduction and reverts the impaired vascular responsiveness induced by endotoxic shock in rats. **Shock**, v. 21, n. 3, p. 271-275, 2004.

GROZDANIS, M. et al. Pharmacokinetics of the CYP 3<sup>a</sup> Substrate Simvastatin following Administration of Delayed Versus Immediate Release Oral Dosage Forms. **Pharmaceut. Res**, v. 25, n. 7, p. 1591-1600, 2008.

HAO, M. D. L. et al. Repair of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by endothelial progenitor cells, alone and in combination with simvastatin. **Chest**, v. 144, n. 3, p. 876-886, 2013.

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

HEIMBACH, T.; FLEISHER, D.; KADDOUMI, A. Overcoming Poor Aqueous Solubility of Drugs for Oral Delivery. In: STELLA, Valentino. Prodrugs: **Challenges and Rewards**, Springer New York, cap. 5, 2007.

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

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.

JACOBSON, J. R. et al. Simvastatin attenuates vascular leak and inflammation in murine inflammatory lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 288, n. 6, p. 1026-1032, 2005.

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

KAMPSCHMIDT, R. F.; UPCHURCH, H. F. Some effects of endotoxin and leukocytic pyrogen on the body temperature of rats. **Proc Soc Exp Biol Med.**, v. 131, n. 3, p. 864-867, 1969.

KASTING, N. W. Criteria for establishing a physiological role for brain peptides. A case in point: the role of vasopressin in thermoregulation during fever and antipyresis. **Brain Research Reviews**, v. 14, n. 2, p. 143-153, 1989.

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

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.

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.

KILLIC, F. S. et al. Acute antidepressant and anxiolytic effects of simvastatin and its mechanisms in rats. **Neurosciences**, v.17, p. 39-43, 2012.

KLEIN, M. S.; CONN, C. A.; KLUGER, M. J. Behavioral thermoregulation in mice inoculated with influenza virus. **Physiology and Behavior**, v. 52, n. 6, p. 957-967, 1992.

KONSMAN, J. P.; TRIDON, V.; DANTZER, R. Diffusion and action of intracerebroventricularly injected interleukin-1 in the CNS. **Neuroscience**, v. 101, p. 957-967, 2000.

KOZAK, W. et al. TNF soluble receptor and antiserum against TNF enhance lipopolysaccharide fever in mice. **Am J Physiol**, v. 269, p. 23-29, 1995.

KOZAK, W. Regulated decrease in body temperature. In: Mackowiak PA, editor. **Fever: Basic Mechanisms and Management**, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. p. 467-478, 1997.

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

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

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

KUSHNER, I. The acute phase response: an overview. **Methods in Enzymology**, v.163, p. 373-383, 1988.

LACERDA, D. S.; LIONZO, M. Aspectos atuais da biodisponibilidade de fármacos com baixa solubilidade: um enfoque sobre a sinvastatina. **Infarma**, v. 24, n. 5/6, p. 3-9, 2011.

LECHAN, R. M. et al. Immunoreactive interleukin-1 beta localization in the rat forebrain. **Brain Research**, v. 514, p. 135-140, 1990.

LEDEBOER, A. et al. Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. **European Journal of Neuroscience**, v.16, n. 7, p. 1175-1185, 2002.

LEON, L. R. Hypothermia in systemic inflammation: role of cytokines. **Front Biosci**, v. 9, p. 1877–1888, 2004.

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

LI, X.; QIN, J. Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. **J Mol Med**, v. 83, p. 258-266, 2005.

LUDKA, F. K. et al. Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. **Eur. Neuropsychopharmacol**, v. 23, n. 5, p. 400-412, 2013.

LUHESHI, G; ROTHWELL, N. Cytokines and fever. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 109, n.4, p. 301-307, 1996.

MACEDO, R. et al. Heart and systemic effects of statin pretreatment in a rat model of abdominal sepsis. **Models Biological**, v. 30, n. 6, 2015.

MALENOVIC, A. et al. Microemulsion Liquid Chromatographic Screening of Simvastatin and its Active Metabolite in Human Plasma. **Acta Chromatogr**, v. 20, n.4, p. 595-607, 2008.

MARTIN, J. H. **Neuroanatomia: texto e atlas**. 2. ed., Artes Médicas, p. 133-134, 1998, Porto Alegre.

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

MCFARLANE S.I. et al. Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, p.1451-1458, 2002.

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

MOREIRA, E.D. et al. Effect of simvastatin in the autonomic system is dependent on the increased gain/sensitivity of the baroreceptors. **Physiological Reports**, v.1, p. 1-8, 2013.

MORETO, V. et al. Role of heme-oxygenase pathway on vasopressin efficiency during endotoxemic shock-like conditions. **Shock**, v. 26, n. 5, p. 472-476, 2006.

NAJAD, R. H. et al. Antiapoptotic effect of simvastatin ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury. **ISRN Pharmacology**, Iraq, p. 1-8, 2013.

NAVA, F. et al. Effects of interleukin-10 on water intake, locomotory activity, and rectal temperature in rat treated with endotoxin. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 19, n. 1, p. 31-38, 1997.

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

NOLDNER, M.; SCHOTZ, 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.

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, V. L. L. et al. Statin treatment increases afferent pathway sensitivity of baroreflex. **Circulation**, v. 110, n. 1, 2004.

OPP, M. R.; TOTH, L. A. Somnogenic and pyrogenic effects of interleukin-1 beta and lipopolysaccharide in intact and vagotomized rats. **Life Sciences**, v. 62, n. 10, p. 923-936, 1998.

OTTE, C.; ZHAO, S.; WHOOLEY, M. A. Statin use and risk of depression in patients with coronary heart disease: longitudinal data from the Heart and Soul Study. **J Clin Psychiatry**, v. 73, p. 610-615, 2012.

PATHAK, N. N. et al. Antihyperalgesic and antiinflammatory effects of atorvastatin in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. **Inflammation**, v. 36, n. 6, p. 1468-1478, 2013.

PAUL, L.; FRAIFELD, V.; KAPLANSKI, J. Evidence supporting involvement of leukotrienes in LPS-induced hypothermia in mice. **American Journal of Physiology**, v. 276, p. 52-58, 1999.

PAUMELLE, R. et al. Acute Antiinflammatory properties of statins involve peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  via inhibition of the protein kinase C signaling pathway. **American Heart Association**, p. 361-369, 2006.

- 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.
- PRUT, L.; BELGUNZ, C. The open Field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3-33, 2003.
- QING, W. et al. High dose of simvastatin induces hyperlocomotive and anxiolytic-like activities: The association with the up-regulation of NMDA receptor binding in the rat brain. **Experimental Neurology**, v. 216, p.132-138, 2009.
- RAMACHANDRA, R.N.; SEHON, A.H.; BERCI, I. Neuro-hormonal host defence in endotoxin shock. **Brain Behav Immun**, v.6, n.2, p. 157 -69, 1992.
- RENSHAW, P. F. et al. Lovastatin potentiates the antidepressant efficacy of fluoxetine in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 92, p. 88–92, 2009.
- 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.
- ROMANOVSKY, A. A. et al. Endotoxin shock: thermoregulatory mechanisms. **American Journal of Physiology**, v. 270, p.b693–703, 1996.
- 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.; STEINER, A. A.; MATSUMURA, K. Cells that trigger fever. **Cell Cycle**, Phoenix, v. 5, p. 2195-2197, 2006.
- SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 19, n. 1, p. 117-125, 2005.
- SHAHSAVARIAN, A. et al. Antidepressant-like effect of atorvastatin in the forced swimming test in mice: The role of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway. **European Journal of Pharmacology**, v.745, p.52-58, 2014.

SHENG, F.Q. et al. In rats with myocardial infarction, interference by simvastatin with the TLR4 signal pathway attenuates ventricular remodeling. **Acta Cardiologica**, v. 64, n. 6, p. 779-785, 2009.

SHITARA, Y.; SUGIYAMA, Y. "Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug–drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme function." **Pharmacol therapeutics**, v. 112, p.71-105, 2006.

SILVA, J. et al. Efeito do suco de uva (*Vitis labrusca*) na dislipidemia, na resistência insulínica e na proteína C reativa de camundongos LDLR<sup>-/-</sup> alimentados com dieta hiperlipídica. **6ª Jornada Científica e Tecnológica e 3º Simpósio de Pós-Graduação do IFSULdeMINAS**, 2014, Pouso Alegre.

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

SOARES, D.M. Estudo da resposta febril induzida por peritonite causada pela injeção i.p. de *Escherichia coli*. **Tese (Doutorado em Farmacologia)**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2008.

STAFFORD, L.; BERK, M. The use of statins after a cardiac intervention is associated with reduced risk of subsequent depression: proof of concept for the inflammatory and oxidative hypotheses of depression? **J Clin Psychiatry**, v. 72, p. 1229-1235, 2011.

STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. Fever and anapyrexia in systemic inflammation: intracellular signaling by cyclic nucleotides. **Front Biosci**, Phoenix, v. 8, p. 1398-1408, 2003.

STEINER, S. et al. Simvastatin blunts endotoxin induced tissue factor in vivo. **Circulation**, v. 111, n. 14, p. 1841-1846, 2005.

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

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, Berlim, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

STOLF, A. M. et al. Effects of statins on liver cell function and inflammation in septic rats. **J Surg Res**, v. 178, p. 888-897, 2012.

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

TOLLNER, B. et al. The role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and metabolic responses of rats to intraperitoneal injection of a high dose of lipopolysaccharide. **Pfluegers Arch: Eur J Physiol**, v. 440, p. 925–932, 2000.

TOYAMA, R. P. Avaliação comportamental e bioquímica de camundongos submetidos a um modelo experimental de inflamação associada a criolesão. **Dissertação de Mestrado**. UFSC. 2012.

TURNBULL, A. V.; RIVIER, C. L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 2-71, 1999.

VANDERBIST, F.; SERENO, A. M.; BAUDIER, P. U. Oral Pharmaceutical Composition Containing a Statin Derivative. **US2004/0235935**, nov. 25, 2004.

VANDRESEN-FILHO, S. et al. Statins enhance cognitive performance in object location test in albino Swiss mice: Involvement of beta-adrenoceptors. **Physiology & Behavior**, v. 143, p. 27-34, 2015.

WATKINS, L. R. et al. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. **Brain Research**, v. 654, n. 1, p. 15-26, 1994.

WILCONSON, J. S. et al. Behavioral inhibition and impaired spatial learning and memory in hypothyroid mice lacking thyroid hormone receptor  $\alpha$ . **Behavioural Brain Research**, v. 177, p. 109-116, 2007.

YANG, C. C.; JICK, S. S.; JICK, H. Lipid-lowering drugs and the risk of depression and suicidal behavior. **Arch Intern Med**, v. 163, p.1926–1932, 2003.

YEE, J. R.; PRENDERGAST, B. J. Sex-specific social regulation of inflammatory responses and sickness behaviors. **Brain Behav Immun**, v. 24, n. 6, p. 942–951, 2010.

YIRMIYA, R. et al. Interleukin-1 inhibits sexual behavior in femal but not male rats. **Brain, Behavior and Immunity**, v.9, p. 220-233, 1995.

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.

YOUNG-XU, Y. et al. Long-term statin use and psychological well-being. **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 42, n. 4, 2003.

ZHANG, M. et al. Pentoxifylline attenuates cardiac dysfunction and reduces TNF-alpha level in ischemic-reperfusedheart. **The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 2, p. 832-839, 2005.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A- Valores de F

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

Parâmetros	2 horas	6 horas	24 horas
Tempo de Latência	$F_{3,28}=6,220$ $P=0,0023$	$F_{3,27}=0,3596$ $P=0,7826$	$F_{3,26}=0,1985$ $P=0,8965$
Tempo no lado claro	$F_{3,28}=8,492$ $P=0,0004$	$F_{3,27}=2,876$ $P=0,0546$	$F_{3,26}=3,071$ $P=0,0454$
Número de transições	$F_{3,28}=26,23$ $P<0,0001$	$F_{3,27}=9,106$ $P=0,0002$	$F_{3,26}=2,121$ $P=0,1219$

Fonte: Da autora.

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

Parâmetros	2 horas	6 horas	24 horas
Cruzamentos periféricos	$F_{3,28}=24,56$ $P<0,0001$	$F_{3,28}=8,559$ $P=0,0003$	$F_{3,28}=3,770$ $P=0,0217$
Cruzamentos centrais	$F_{3,28}=11,01$ $P<0,0001$	$F_{3,28}=5,313$ $P=0,0050$	$F_{3,28}=3,357$ $P=0,0328$
Cruzamentos totais	$F_{3,28}=20,08$ $P<0,0001$	$F_{3,28}=9,650$ $P=0,0002$	$F_{3,28}=6,496$ $P=0,0018$
Número de <i>rearings</i>	$F_{3,28}=15,97$ $P<0,0001$	$F_{3,28}=5,074$ $P=0,0062$	$F_{3,28}=0,4696$ $P=0,7058$

Fonte: Da autora.

Tabela 3 - Análise de Variância de uma via para o Teste de Suspensão pela Cauda em animais tratados com veículo ou LPS (Valor de F).

Parâmetros	2 horas	6 horas	24 horas
Tempo de Imobilidade	$F_{3,28}=32,22$ $P<0,0001$	$F_{3,28}=9,984$ $P=0,0001$	$F_{3,28}=1,703$ $P=0,1892$

Fonte: Da autora.

Tabela 4 - Análise de Variância de uma via para o Teste de Nado Forçado em animais tratados com veículo ou LPS (Valor de F).

Parâmetros	2 horas	6 horas	24 horas
Número de <i>floatings</i>	$F_{3,28}=13,15$ $P<0,0001$	$F_{3,24}=10,08$ $P=0,0002$	$F_{3,24}=2,119$ $P=0,1243$
Número de <i>swimmings</i>	$F_{3,28}=21,95$ $P<0,0001$	$F_{3,24}=5,710$ $P=0,0043$	$F_{3,24}=1,518$ $P=0,2353$
Número de <i>climbings</i>	$F_{3,28}=19,95$ $P<0,0001$	$F_{3,24}=7,786$ $P=0,0008$	$F_{3,24}=0,3361$ $P=0,7994$

Fonte: Da autora.

Tabela 5 - Análises de variância de duas vias no Teste Claro-Escuro, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 10mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Teste Claro-Escuro	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
Tempo de Latência	F(1,28) = 0,7224 P = 0,4026	F(1,28) = 31,06 P < 0,0001	F(1,28) = 0,02631 P = 0,8723
Tempo no lado claro	F(1,28) = 0,4120 P = 0,5262	F(1,28) = 54,18 P < 0,0001	F(1,28) = 3,317 P = 0,0793
Número de transições	F(1,28) = 0,2047 P = 0,6545	F(1,28) = 100,9 P < 0,0001	F(1,28) = 0,4012 P = 0,5316

Fonte: Da autora.

Tabela 6 - Análises de variância de duas vias no Teste Claro-Escuro, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 40mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Teste Claro-Escuro	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
Tempo de Latência	F(1,28) = 10,35 P = 0,0033	F(1,28) = 9,916 P = 0,0039	F(1,28) = 15,29 P = 0,0005
Tempo no lado claro	F(1,28) = 4,424 P = 0,0445	F(1,28) = 13,17 P = 0,0011	F(1,28) = 17,05 P = 0,0003
Número de transições	F(1,28) = 11,48 P < 0,0001	F(1,28) = 19,53 P = 0,0021	F(1,28) = 28,13 P = 0,0001

Fonte: Da autora.

Tabela 7 - Análises de variância de duas vias no Teste Campo Aberto, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 10mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Teste Campo Aberto	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
Cruzamentos periféricos	F(1,28) = 0,2986 P = 0,5891	F(1,28) = 59,41 P < 0,0001	F(1,28) = 0,2680 P = 0,6087
Cruzamentos centrais	F(1,28) = 0,02844 P = 0,8673	F(1,28) = 36,86 P < 0,0001	F(1,28) = 0,5759 P = 0,4543
Cruzamentos totais	F(1,28) = 0,3373 P = 0,5660	F(1,28) = 88,42 P < 0,0001	F(1,28) = 0,5576 P = 0,4614
<i>Rearings</i>	F(1,28) = 1,077 P = 0,3082	F(1,28) = 52,79 P < 0,0001	F(1,28) = 0,1074 P = 0,7455

Fonte: Da autora.

Tabela 8 - Análises de variância de duas vias no Teste Campo Aberto, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 40mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Teste Campo Aberto	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
Cruzamentos periféricos	F(1,28) = 26,08 P < 0,0001	F(1,28) = 28,83 P < 0,0001	F(1,28) = 4,579 P = 0,0412
Cruzamentos centrais	F(1,28) = 25,78 P < 0,0001	F(1,28) = 20,12 P = 0,0001	F(1,28) = 5,614 P = 0,0249
Cruzamentos totais	F(1,28) = 44,77 P < 0,0001	F(1,28) = 45,83 P < 0,0001	F(1,28) = 8,287 P = 0,0076
<i>Rearings</i>	F(1,28) = 8,115 P = 0,0081	F(1,28) = 9,768 P < 0,0041	F(1,28) = 15,21 P = 0,0005

Fonte: Da autora.

Tabela 9 - Análises de variância de duas vias no Teste de Suspensão pela Cauda, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 10 ou 40mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Teste de Suspensão pela Cauda	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
Tempo de imobilidade Sinv. 10mg/Kg	F(1,28) = 0,3794 P = 0,5429	F(1,28) = 64,64 P < 0,0001	F(1,28) = 1,215 P = 0,2797
Tempo de imobilidade Sinv. 40mg/Kg	F(1,28) = 15,31 P = 0,0005	F(1,28) = 22,25 P < 0,0001	F(1,28) = 9,661 P = 0,0043

Fonte: Da autora.

Tabela 10 - Análises de variância de duas vias no Teste de Nado Forçado, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 10 ou 40mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico).

Teste de Nado Forçado	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
Número de <i>floatings</i> Sinv. 10mg/Kg	F(1,28) = 0,001601 P = 0,9684	F(1,28) = 44,66 P < 0,0001	F(1,28) = 0,8472 P = 0,3652
Número de <i>floatings</i> Sinv. 40mg/Kg	F(1,28) = 4,410 P = 0,0449	F(1,28) = 14,04 P = 0,0008	F(1,28) = 16,62 P = 0,0003

Fonte: Da autora.

Tabela 11 - Análises de variância de duas vias, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 10 mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico) na dosagem das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Dosagem de citocinas	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
TNF- $\alpha$	F(1,20) = 0,4764 P = 0,4980	F(1,20) = 16,49 P = 0,0006	F(1,20) = 0,5987 P = 0,4481
IL-1 $\beta$	F(1,20) = 0,7765 P = 0,3887	F(1,20) = 35,55 P < 0,0001	F(1,20) = 0,7765 P = 0,3887

Fonte: Da autora.

Tabela 12 - Análises de variância de duas vias, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 40 mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico) na dosagem das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Dosagem de citocinas	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
TNF- $\alpha$	F(1,20) = 0,8500 P = 0,3675	F(1,20) = 19,36 P = 0,0003	F(1,20) = 0,04048 P = 0,8426
IL-1 $\beta$	F(1,20) = 18,03 P = 0,0004	F(1,20) = 18,03 P = 0,0004	F(1,20) = 20,59 P = 0,0002

Fonte: Da autora.

Tabela 13 - Análises de variância de duas vias, em grupos controle ou pré-tratados com sinvastatina 40 mg/Kg (Pré-tratamento) e submetidos à injeção de veículo ou LPS (Desafio imunológico) - área sobre a curva (índice térmico).

AUC	Pré-tratamento	Desafio imunológico	Interação
Intervalo			
30-180 minutos	F(1,43) = 2,478 P = 0,1228	F(1,43) = 8,034 P = 0,0070	F(1,43) = 0,7621 P = 0,3875
330-480 minutos	F(1,43) = 21,47 P < 0,0001	F(1,43) = 9,085 P = 0,0043	F(1,43) = 8,452 P = 0,0057

Fonte: Da autora.

## APÊNDICE B - Design experimental

### a) Indução do *sickness behavior* por aplicação de LPS

Afim de determinar a dose e o horário 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 após 2, 6 e 24 horas da aplicação. A administração do LPS ou do veículo foi realizada por via intraperitoneal e em dose única. (Figura 30)

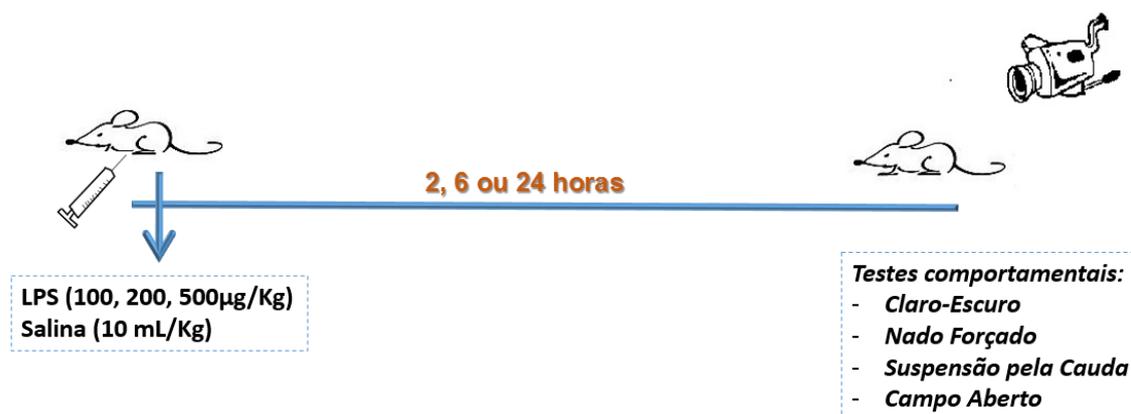


Figura 30 - Indução do sickness behavior.  
Fonte: Da autora.

### b) Efeito do pré-tratamento com sinvastatina sobre o *sickness behavior*

Depois de selecionada a dose e horário de aplicação de LPS (200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , 2h), iniciamos o pré-tratamento com a sinvastatina. Os animais receberam através de gavagem, sinvastatina 10 ou 40  $\text{mg}/\text{Kg}$  ou veículo, por um período de sete dias. No oitavo dia, aplicamos LPS e 2h após, realizamos os testes comportamentais. (Figura 31)

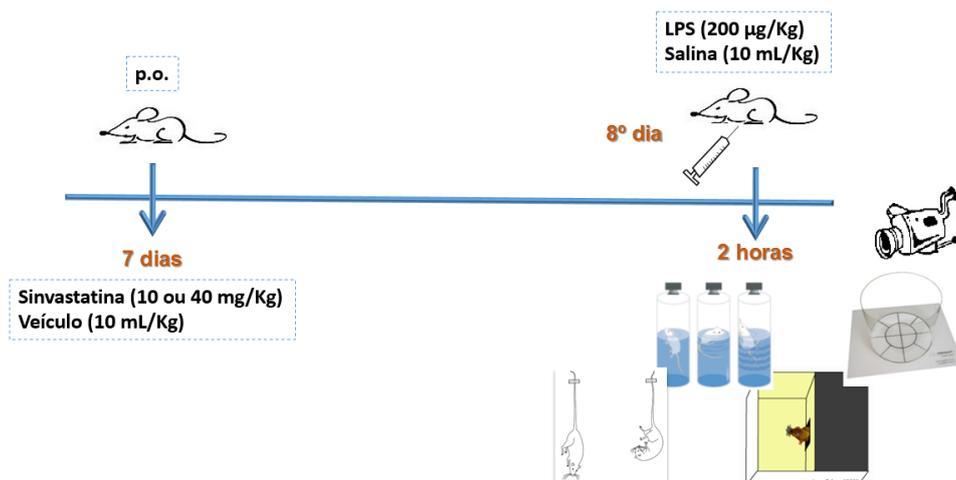


Figura 31 - Efeito do pré-tratamento com sinvastatina sobre o *sickness behavior*.  
Fonte: Da autora.

### c) Efeito do pré-tratamento com sinvastatina sobre a febre induzida pela endotoxemia

Os animais receberam através de gavagem, sinvastatina 10 ou 40 mg/Kg ou veículo, por um período de sete dias e no 1º dia do pré-tratamento o probe foi inserido na cavidade peritoneal. No oitavo dia, aplicamos LPS e 2h após, colocamos as caixas contendo os camundongos (alocados individualmente) sob receptores de telemetria conectados a um computador para registro da temperatura corporal. O registro foi realizado durante 8 horas. (Figura 32)

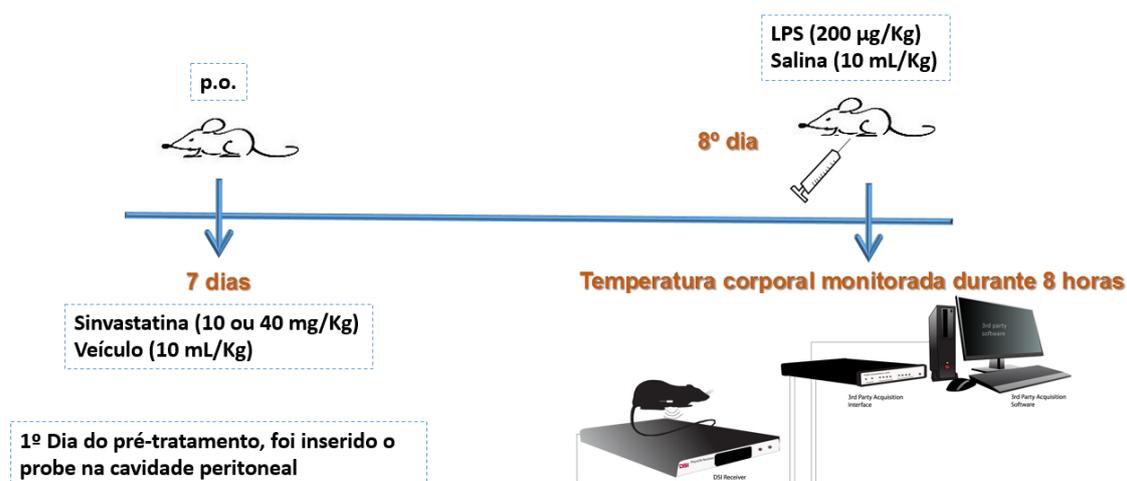


Figura 32 - Efeito do pré-tratamento com sinvastatina na febre induzida pela endotoxemia.  
Fonte: Da autora.

**d) Efeito do pré-tratamento com sinvastatina sobre a concentração de citocinas plasmáticas durante endotoxemia**

Os animais receberam através de gavagem, sinvastatina 10 ou 40 mg/Kg ou veículo, por um período de sete dias. No oitavo dia, aplicamos LPS e 2h após, coletamos o sangue para dosagem das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

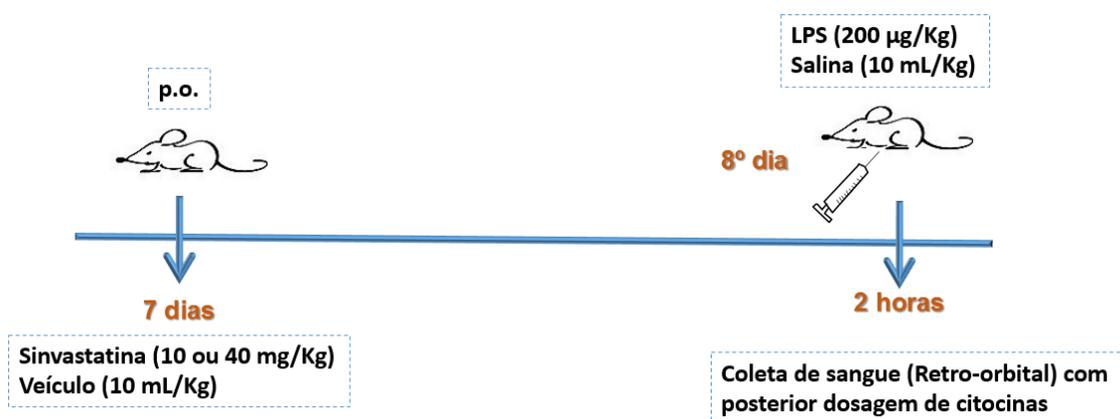


Figura 33 - Efeito do pré-tratamento com sinvastatina sobre a concentração de citocinas plasmáticas durante endotoxemia.

Fonte: Da autora.

## ANEXO

## ANEXO A- Aprovação no Comitê de Ética

