DENISE KINOSHITA

**Avaliação dos efeitos do LPS sobre parâmetros comportamentais e
imunológicos em camundongos idosos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá-Rocha

São Paulo
2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

11/12/04

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1930
FMVZ

Kinoshita, Denise

Avaliação dos efeitos do LPS sobre parâmetros comportamentais e imunológicos em camundongos idosos / Denise Kinoshita. - - São Paulo: D. Kinoshita, 2007.

133 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Neuroimunologia. 2. Envelhecimento. 3. LPS. 4. Comportamento doentio.
5. Neutrófilos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos do tratamento prolongado de ansiolíticos sobre o comportamento e a imunidade durante o envelhecimento de camundongos", protocolado sob o nº962/2006, utilizando 221 (duzentos e vinte e um) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá Rocha está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/09/06".

(We certify that the Research "Effects of anxiolytics long term treatment on behavior and immunity during aging in mice", protocol number 962/2006, utilizing 221 (two hundred and twenty one) mice, under the responsibility of Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá Rocha, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 09/13/2006).

São Paulo, 14 de setembro de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: KINOSHITA, Denise

Título: Avaliação dos efeitos do LPS sobre parâmetros comportamentais e imunológicos em camundongos idosos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIAS

A meu pai, com quem aprendi a desejar ser uma pessoa melhor à cada dia, e que sempre
confiou em mim

À minha mãe, que além de entender minhas escolhas, acreditou nelas. Sua garra me
inspira nos momentos mais difíceis

A meus irmãos, Lú e Ricardo, por cuidarem de mim, e por darem sentido à palavra
família

A meus amigos de graduação, pela amizade incondicional.

Ao Bruno, por todo carinho, respeito e dedicação

Aos roedores, que possibilitaram a realização desse trabalho

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador e amigo: Lú, um dia você me explicou que sua preocupação maior não era a minha dissertação, ou as publicações que poderíamos conquistar; seu maior interesse era a minha formação e o meu aprendizado. Obrigada por sempre me incentivar, por todos os conselhos, pela paciência, e por me orientar sem nunca desistir de seus valores

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Ao programa de pós graduação em Patologia Experimental e Comparada

Aos professores do Departamento de Patologia: Antônio, Catão, Fred, Guerra, Helenice, Idércio, João, Jorge, Lilian, Luciano, Malú, Marcelo, Martha, Matú, Merusse, Nívea, Paulo, Silvana e Tânia por todos os ensinamentos

Aos funcionários do laboratório de farmacologia: Magali, Priscila e Ricardo pelo auxílio e pela convivência

Aos funcionários do biotério: Cláudia, Herculano, Idalina, Luis, Nelsinho e Rosires pela dedicação dispensada aos animais e aos alunos

As funcionárias da secretaria de Pós-graduação: Claudia, Dayse e Joana pela eficiência e dedicação

As funcionárias da secretaria do VPT: Claudia, Cristina, Silvia por toda atenção

As funcionárias da biblioteca pela dedicação e paciência dispensadas a todos os alunos

Aos funcionários: Buga, Cláudio, Edson, Livia, Lúcia, Marguite, Nonato, Romeika, Shirley pelo ótimo convívio proporcionado

Aos queridos amigos da Pós-graduação: Alison, Altamir, Andréia, Bel, Beatriz, Caio, Camila Lima, Camila Moreira, Carol Dizioli, Carol Penna, Cris Massoco, Daniel, Daniela, Dario, Domênica, Eduardo, Elaine, Evelise, Fabiana, Felipe, Garé, Glaucie, Heidge, Isis, João Paulo, Karin, Lu Vismari, Lu Cunha, Lu Lippi, Marcio, Milena, Mônica, Nato, Portela, Renato, Ricardo Lazzarini, Ricardinho, Sandra, Silvia, Silmara, Thiago, Vanessa, Viviane e Wanderley pelos momentos científicos, de descontração e de desabafo. Muito obrigada!

Este trabalho recebeu apoio financeiro das seguintes agências de fomento à pesquisa:
FAPESP. Processo nº 04/14128-0
CAPES

RESUMO

KINOSHITA, D. **Avaliação dos efeitos do LPS sobre parâmetros comportamentais e imunológicos em camundongos idosos.** [Assessment of LPS effects on behavioral and immunological parameters in aged mice]. 2007. 133 f. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Através do presente trabalho investigou-se a expressão do comportamento doentio e a atividade de neutrófilos sanguíneos de camundongos adultos, de meia idade e idosos, após o tratamento com lipopolissacarídeo de bactéria gram negativa (*Escherichia coli*). O comportamento doentio foi avaliado através da ingestão de alimentos e do peso corpóreo. Nos aparatos comportamentais Campo Aberto e Labirinto em cruz elevado, o comportamento doentio foi avaliado através da atividade geral, da exploração e dos níveis de ansiedade. A atividade de neutrófilos sanguíneos foi estudada através de citometria de fluxo, analisando-se a intensidade e porcentagem de neutrófilos que realizaram fagocitose e da intensidade e porcentagem de neutrófilos que realizaram burst oxidativo, ambos induzidos pelo estímulo *in vitro* da bactéria *Staphylococcus aureus*. Os animais foram tratados com solução salina ou LPS (na dose de 200 µg/kg) e as avaliações foram realizadas 2 horas após o tratamento. No caso da ingestão de alimentos e do peso corpóreo, as avaliações foram realizadas durante 3 dias anteriores ao experimento, e durante 7 dias posteriores ao experimento. Os resultados demonstraram que animais idosos apresentaram diferenças na expressão do comportamento doentio, sendo que houve uma maior motivação em explorar os aparatos comportamentais. Apesar da manutenção da exploração no Campo Aberto e Labirinto em Cruz elevado, a redução da ingestão de alimentos e do peso corpóreo apresentou-se mais acentuada nos camundongos de meia idade e idosos, após tratamento com LPS. A atividade de neutrófilos sanguíneos, avaliadas pela fagocitose e burst oxidativo, apresentou-se aumentada em camundongos idosos após tratamento com LPS. A menor migração de neutrófilos sanguíneos à cavidade peritoneal parece ser responsável por esse aumento de atividade dos neutrófilos de camundongos idosos. Esses resultados sugerem que a expressão do comportamento doentio de camundongos idosos é diferente, com manutenção do comportamento de exploração, e que esses camundongos seriam mais susceptíveis aos efeitos do choque endotóxico, devido à presença de maior quantidade de neutrófilos ativados no sangue.

Palavras chave: Neuroimunologia. Envelhecimento. LPS. Comportamento Doentio. Neutrófilos.

ABSTRACT

KINOSHITA, D. **Assessment of LPS effects on behavioral and immunological parameters in aged mice.** [Avaliação dos efeitos do LPS sobre parâmetros comportamentais e imunológicos em camundongos idosos]. 2007. 133 f. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Through the present work, it has been investigated the expression of sickness behavior and blood neutrophils activity in adult, middle-aged and aged mice, after gram negative (*Escherichia coli*) lipopolysaccharide treatment. Sickness behavior was evaluated through food ingestion and body weight. On the behavioral apparatus Open Field and Elevated Plus Maze, sickness behavior was evaluated through general activity, exploration and anxiety levels. Blood neutrophils activity was studied through flow cytometric analysis, assessing neutrophil's intensity and percentage of phagocytosis and neutrophil's intensity and percentage of oxidative burst, both induced by *in vitro* stimulus of *Staphylococcus aureus* bacteria. Animals were treated either with saline solution or LPS (in the 200 µg/kg dose) and analysis were done 2 hours after treatment. In the case of food ingestion and body weight, analysis were done through 3 days before experiment, and during 7 days after experiment. Results demonstrated that aged animals showed differences in sickness behavior expression, with a greater motivation to explore behavioral apparatus. Despite maintenance of Open Field and Elevated Plus Maze exploration, reduction in food ingestion and body weight were more pronounced in middle-aged and aged mice, after LPS treatment. Blood neutrophils activity, analysed through phagocytosis and oxidative burst, were higher in aged mice after LPS treatment. Lesser blood neutrophils migration to peritoneal cavity seems to be responsible for this enhancement in neutrophil activity. These results suggest that the expression of sickness behavior in aged mice is different, with maintenance of exploratory behavior, and that these mice would be more susceptible to endotoxic effects, due to the presence of higher quantity of activated neutrophils in blood.

Key words: Neuroimmunology. Aging process. LPS. Sickness Behavior. Neutrophils.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	ASPECTOS GERAIS SOBRE AS COMUNICAÇÕES ENTRE SISTEMA NERVOSO CENTRAL E SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	17
2.2	COMPORTAMENTO DOENTIO.....	27
2.2.1	Ativação do eixo HPA e sinalização do SI para o SN durante o comportamento doentio.....	27
2.2.2	Comportamentos associados à doença e a participação de interleucinas.....	32
2.2.3	Aspectos adaptativos e motivacionais do comportamento doentio.....	38
2.3	LPS, TOLL LIKE RECEPTOR – 4 E IMUNIDADE INATA.....	41
2.4	ENVELHECIMENTO.....	44
3	OBJETIVOS.....	52
3.1	OBJETIVO GERAL.....	52
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1	ANIMAIS.....	53

4.2.	DROGAS E REAGENTES.....	54
4.2.1	Drogas.....	54
4.2.2	Reagentes.....	54
4.3	ESTUDOS NO CAMPO ABERTO E NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	55
4.3.1	Medida da atividade geral no Campo Aberto.....	55
4.3.2	Medida da ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado.....	57
4.4	CITOMETRIA DE FLUXO.....	58
4.4.1	Atividade de neutrófilos sanguíneos.....	59
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS.....	64
5.1	EXPERIMENTO 1: EFEITOS DA IDADE NO PESO RELATIVO DE ADRENAIS, BAÇO E TIMO EM CAMUNDONGOS SENSÍVEIS E RESISTENTES AOS EFEITOS DO LPS.....	64
5.2	EXPERIMENTO 2: EFEITO DO LPS NA INGESTÃO DE ALIMENTOS E NO PESO CORPÓREO DE CAMUNDONGOS ADULTOS, DE MEIA IDADE E IDOSOS, SENSÍVEIS E RESISTENTES AOS EFEITOS DO LPS.....	68
5.3	EXPERIMENTO 3: EFEITO DO LPS NA ATIVIDADE GERAL DE CAMUNDONGOS ADULTOS, DE MEIA IDADE E IDOSOS, SENSÍVEIS E RESISTENTES AOS EFEITOS DO LPS.....	73
5.4	EXPERIMENTO 4: EFEITO DO LPS NOS NÍVEIS DE ANSIEDADE DE CAMUNDONGOS ADULTOS, DE MEIA IDADE E IDOSOS, SENSÍVEIS E RESISTENTES AOS EFEITOS DO LPS.....	77

5.5	EXPERIMENTO 5: EFEITO DO LPS NA FAGOCITOSE E NO BURST OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS DE CAMUNDONGOS ADULTOS, DE MEIA IDADE E IDOSOS, SENSÍVEIS E RESISTENTES AOS EFEITOS DO LPS.....	88
6	DISCUSSÃO.....	98
6.1	PESOS.....	98
6.2	COMPORTAMENTO DOENTIO.....	101
6.3	ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS.....	111
7	CONCLUSÕES.....	119
	REFERÊNCIAS.....	121

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo inerente e inevitável à maioria dos seres vivos. Muitas hipóteses têm sido elaboradas para explicar o motivo pelo qual o organismo envelhece (MEDAWAR, 1952; WILLIAMS, 1957; KIRKWOOD; HOLLIDAY, 1979). Da mesma forma, inúmeros estudos tentam caracterizar as alterações relacionadas a esse processo. Entretanto, estabelecer causas e conseqüências do envelhecimento tem se mostrado extremamente complicado. As interações entre células, órgãos e sistemas no organismo são responsáveis pela dificuldade em se diferenciar as alterações intrínsecas ao envelhecimento, e as modificações que derivaram das mesmas. Estudos humanos também são dificultados pelos inúmeros distúrbios que são freqüentes nos idosos, mas que não são necessariamente decorrentes do envelhecimento em si, como a Doença de Alzheimer, o Mal de Parkinson e a Diabetes. Além disso, indivíduos idosos freqüentemente fazem uso de variados medicamentos.

Talvez um dos aspectos mais estudados sobre esse tema seja o sistema imunológico. A involução tímica, o aumento de incidência de neoplasias e doenças auto-imunológicas, a maior mortalidade por infecções e a dificuldade na elaboração de vacinas eficazes para indivíduos idosos exemplificam as inúmeras alterações, na sua imensa maioria não desejáveis, da resposta imunológica no envelhecimento. Entretanto, essas alterações clássicas são acompanhadas por outras, as quais nem sempre são bem caracterizadas.

A melhoria das condições higiênico-sanitárias, a descoberta de novos medicamentos e fármacos mais eficazes, o aperfeiçoamento de exames e diagnósticos foram responsáveis por um aumento da expectativa de vida da população mundial. Não só humanos vivem por mais tempo; atualmente, animais de companhia também apresentaram um incremento em sua longevidade.

A maior longevidade de homens e animais, aliados à curiosidade humana sobre aspectos relacionados ao envelhecimento, tornam o estudo desse processo muito freqüente em diversas instituições de pesquisa.

Dessa forma, o presente trabalho se propôs a analisar alguns aspectos da resposta imunológica inata de camundongos idosos, e a expressão do comportamento doentio (um comportamento organizado e preservado em inúmeras espécies animais, inclusive no homem, que auxilia o processo de recuperação durante infecções) nesses animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE AS COMUNICAÇÕES ENTRE SISTEMA NERVOSO CENTRAL E SISTEMA IMUNOLÓGICO

Atualmente, a percepção de que estados emocionais são capazes de influenciar a resposta imunológica em um indivíduo é bem aceita. Muito provavelmente esse consenso geral, e muitas vezes até mesmo popular, advém da observação de correlações entre o estilo de vida da sociedade atual e quadros de alterações imunológicas (sejam elas doenças infecciosas, auto-imunes, alérgicas ou neoplásicas). Mesmo em tempos remotos, aproximadamente 220 a.C., Galeno, filósofo grego, já havia observado que mulheres melancólicas apresentavam maior incidência de tumores de mama, do que mulheres de “sangue quente”. Muito mais do que apenas um conhecimento popular, a comunicação do Sistema Nervoso (SN) e do Sistema Imunológico (SI) é, atualmente, alvo de estudos científicos, com resultados que comprovam e oferecem embasamento científico à percepção leiga.

O estudo da comunicação entre esses dois grandes sistemas é denominado de Neuroimunologia. Psiconeuroimunologia, Neuroimunomodulação, Imunoendocrinologia, são utilizadas como nomenclaturas sinônimas à Neuroimunologia, e se referem aos estudos das interações mútuas e bidirecionais entre os Sistemas Nervoso e Imunológico. Além do entendimento científico dessas complexas comunicações, a neuroimunologia oferece também aplicabilidade para a clínica médica, oferecendo melhor embasamento para diagnóstico, prognóstico e tratamento de alterações imunológicas decorrentes de distúrbios comportamentais, e vice-versa.

Talvez a forma mais perceptível da influência de alterações psicológicas em respostas imunológicas seja o estado de estresse. Estresse foi pioneiramente definido por Hans Seyle, no início do século XX, como uma síndrome de adaptação geral, representando uma resposta à diversas alterações ambientais ou internas (os estímulos estressores), que permite a manutenção da homeostase no organismo. Portanto, estresse não se equivale aos estímulos estressores, e sim, à resposta a esses estímulos, ou seja, os estímulos estressores podem induzir ao estado de estresse. Essa resposta pode ou não envolver estímulos específicos, mas múltiplos estímulos também podem induzir à situação de estresse. As respostas direcionadas aos estímulos possuem geralmente um padrão estereotipado, e muitas vezes representam uma situação de “luta ou fuga” para o indivíduo (como definido por Walter Cannon na mesma época), portanto importante para sua sobrevivência.

Em relação às alterações orgânicas associadas ao estresse, Seyle postulou que indivíduos estressados apresentam ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e do sistema simpato-adrenomedular, concomitantemente. A teoria de Seyle é bem aceita na literatura internacional e será utilizada nessa dissertação como básica para compreensão dos fenômenos observados e das mudanças teóricas ocorridas ao longo do tempo.

Com respeito à neuroimunologia, Seyle observou que ratos submetidos a determinados estímulos estressores apresentavam aumento do peso das adrenais, hipotrofia do timo, baço e de linfonodos. Quando se retirava a hipófise e a adrenal, essas alterações não ocorriam, demonstrando a relação entre hipófise, adrenal e órgãos linfóides.

Atualmente, as vias de ativação tanto do eixo HPA quanto do sistema simpato-adrenomedular são bem conhecidas. Para revisão, ver Chrousos (1998). Estímulos estressores são capazes de ativar o núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo. O hipotálamo secreta o fator liberador de corticotrofinas (CRF) e a arginina vasopressina (AVP). O CRH, na circulação porta

hipofisária, age na pituitária anterior, induzindo-a a produzir hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), encefalinas e endorfinas, através da clivagem de pró-opiomelanocortina. O ACTH atinge a corrente sanguínea, alcançando as adrenais, onde, na região cortical, induz à produção e liberação de glicocorticóides (corticosterona ou cortisol, dependendo da espécie). Na periferia, os glicocorticóides promovem (através da ação em receptores intracelulares): alterações sistêmicas (de catabolismo, inibição da reprodução, da digestão e do crescimento) e alterações de respostas imunológicas. No SNC, realizam controle negativo (através de receptores de glicocorticóides do tipo II) sobre o hipotálamo e a hipófise, cessando a produção de seus respectivos hormônios.

Quanto à participação do sistema simpato-adrenomedular, o centro noradrenérgico do *locus ceruleus* também é ativado durante o estresse. O CRF hipotalâmico induz à ativação adicional do sistema nervoso autônomo simpático, possibilitada pela inervação do hipotálamo no *locus ceruleus* (localizado no tronco encefálico). A ativação do tronco encefálico resulta em liberação de noradrenalina (NOR), tanto no cérebro quanto em neurônios pós ganglionares que inervam órgãos periféricos, como coração, pulmões, trato gastrointestinal (aumentando a frequência cardíaca, realizando broncoconstrição e diminuição da motilidade intestinal, respectivamente), favorecendo a resposta de luta ou fuga e colocando o indivíduo em estado de alerta. A NOR age, também, na região medular das adrenais, resultando em liberação adicional de NOR e adrenalina, que alcançam a corrente sanguínea. A NOR é responsável, conjuntamente com os glicocorticóides, por modulações de células imunológicas. No cérebro, causa nova liberação de CRH no hipotálamo (agindo em receptores α_1 -adrenérgicos), ativando novamente o eixo HPA. Existe, então, uma reverberação entre as ativações do hipotálamo e dos neurônios noradrenérgicos do tronco encefálico. O controle negativo do sistema simpato-medular também é realizado pelos glicocorticóides. Existem controles adicionais, tanto para o eixo HPA quanto para

a ativação simpática, dentro do próprio cérebro, como os sistemas neuronais gabaérgicos (ácido γ -aminobutírico) e peptídicos, como por exemplo o opióide.

O efeito de estímulos estressores sobre o SI depende de inúmeros fatores, como tipo do estímulo aplicado (psicológico, físico, infeccioso), duração (agudo ou crônico), intensidade do estressor e, finalmente, do tipo de resposta imunológica avaliada. (KELLEY; FELTEN, 1995; MCEWEN et al., 1997; KIM; MAES, 2003). A maioria dos trabalhos sobre estresse relata a diminuição de parâmetros imunológicos. Em resumo, existem relatos de: involução tímica, diminuição ou aumento da proliferação linfocitária frente a estímulos antigênicos, redução da citotoxicidade de linfócitos, diminuição da atividade de células natural killer (NK), diminuição da produção de Interleucina (IL)-2 e diminuição da atividade citotóxica de macrófagos (MCEWEN et al., 1997).

Ainda com relação à influência do estresse no SI, o aumento das concentrações plasmáticas de glicocorticóides pode alterar os níveis de citocinas. Citocinas são mediadores solúveis liberados por células imunológicas (principalmente macrófagos e linfócitos), ou não, e podem atuar em outras células, através de receptores, alterando suas propriedades ou comportamento. Podem ser divididas segundo diferentes critérios, como função na inflamação (pró ou anti-inflamatórias), estrutura (família das hematopoeínas ou família do TNF) ou tipo de células produtoras (por linfócitos T helper, Th-1 ou Th-2) (MARQUES; CIZZA; STERNBERG, 2007). A divisão estrutural das citocinas não será utilizada nesta dissertação.

Citocinas pró-inflamatórias são produzidas por macrófagos e monócitos, e são importantes para resposta imunológica inata não específica. Incluem-se nesse grupo: IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, interferon- γ e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). São capazes de induzir a produção de fatores presentes no processo inflamatório (como prostaglandinas, fosfolipase A₂, ciclooxigenase-2). Citocinas anti-inflamatórias são capazes de reduzir o processo inflamatório,

através principalmente da supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias (como é o caso da IL-4 e IL-10, que inibem a produção de IL-1 e TNF) e da supressão da ativação de monócitos. Exemplos de citocinas anti-inflamatórias: IL-4, IL-10, IL-13 e o fator de crescimento de transformação (TGF- β). (DINARELLO, 2000).

A classificação Th-1 ou Th-2 baseia-se na origem da produção das citocinas. As citocinas do tipo Th-1 são produzidas por linfócitos Th-1, importantes para respostas imunológicas mediadas por células, como as realizadas por linfócitos T citotóxicos e células natural-killer (NK). Como citocinas Th-1, na maioria das vezes, possuem funções pró-inflamatórias alguns autores consideram-nas pertencentes ao mesmo grupo. As citocinas do tipo Th-2 derivam de linfócitos Th-2, que participam de respostas imunológicas humorais, que são aquelas em que há produção de fatores humorais (por exemplo, imunoglobulina-E, IgE), e também de respostas que envolvam eosinófilos e mastócitos. Da mesma forma, citocinas Th-2 geralmente possuem funções anti-inflamatórias, e podem ser designadas como tal. (MOSMANN; SAD, 1996).

Glicocorticóides podem favorecer a resposta Th-2 (citocinas anti-inflamatórias) em detrimento da Th-1 (citocinas pró-inflamatórias). Parece existir um antagonismo entre ativação dos receptores intracelulares de glicocorticóides e o fator de transcrição NF- κ B (um fator de transcrição pró-inflamatório) (BESEDOVSKY; DEL REY, 2000). Além disso, também induzem diminuição da expressão de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios (como prostaglandinas).

Sob uma outra perspectiva do estresse, agora adaptativa e não somente imunossupressora, Sorrels e Sapolsky (2007), ofereceram evidências de como as modulações do SI pelo estresse poderiam favorecer a sobrevivência de um animal. Em linhas gerais, a primeira reação orgânica ao estresse (a ativação do sistema simpato-adrenomedular) teria funções imunoestimulantes ao organismo (HEBERT; COHEN, 1993). A ação do eixo HPA e a produção de glicocorticóides

realizariam uma função de controle do SI, impedindo o desenvolvimento de alterações auto-imunes e inflamatórias (WICK; SCHWARZ; KROEMER, 1993).

Nesse mesmo ponto de vista, McEwen et al. (1997), colocou-se a favor do pensamento de que alterações imunológicas decorrentes do estresse possuem caráter adaptativo. Glicocorticóides causam alterações nas populações leucocitárias sanguíneas; após administrações exógenas de corticosteróides ou situações de estresse, há diminuição do número de linfócitos e monócitos e aumento da contagem de neutrófilos no sangue. Parece haver, nesses casos, uma redistribuição leucocitária, em que linfócitos e monócitos saem da corrente sanguínea e migram para outros tecidos (como linfonodos, placas de Peyer, mucosas, pulmão, baço e pele) onde poderiam encontrar possíveis patógenos. Por outro lado, a neutrofilia decorrente dos glicocorticóides, parece ser resultado do recrutamento dessas células pela medula óssea, diminuição ou retardo da apoptose e redução da emigração dessas células do sangue para o tecido.

A modulação de funções imunológicas pelo eixo HPA não ocorre apenas sob estímulos estressores. Estudos com adrenalectomia em camundongos sadios demonstraram um papel fisiológico de hormônios derivados da adrenal (nesse caso, glicocorticóides) na regulação de funções imunológicas no baço (DEL REY; BESEDOVSKY; SORKIN, 1984). Mostrou-se uma correlação inversamente proporcional entre os níveis circadianos de glicocorticóides e linfócitos B secretores de imunoglobulinas no baço. Portanto, as alterações imunológicas que ocorrem durante o estresse derivam de comunicações entre SN e SI, que não são ativadas somente sob estímulos estressores, mas que também são importantes na fisiologia do organismo.

Saindo do contexto estresse, mas permanecendo na questão da regulação do SI pelo SN, Felten et al., em 1985, demonstraram a presença de inervações noradrenérgicas em órgãos linfóides, tanto primários (timo e medula óssea), quanto secundários (linfonodos, baço, e tecidos linfóides associados à mucosa – como as placas de Peyer) e especularam que tal inervação

representaria uma forma de controle do SN sobre o SI. Em 1987, Felten e Olschowka, através de estudos histológicos, propuseram a existência de neurotransmissão (através do neurotransmissor norepinefrina - NE) de fibras noradrenérgicas diretamente com órgãos linfóides (semelhante à inervações simpáticas clássicas, como o coração), mais especificamente com linfócitos T. Esses trabalhos foram importantes para exemplificar uma forma de ação direta do SN nas respostas imunológicas, principalmente linfocitárias, através da atuação da NE em receptores α e β -adrenérgicos. (FELTEN; OLSCHOWKA, 1987).

Segundo Besedovsky et al. (1979), estudos com a 6-hidroxi-dopamina (uma neurotoxina que destrói terminações nervosas simpáticas, realizando a “simpatectomia” química), em ratos neonatos, demonstram que a ausência da inervação simpática aumentou a atividade de linfócitos B no baço (BESEDOVSKY et al., 1979; MILES et al., 1981).

Com relação às relações entre SN e SI, estudos interessantes de condicionamento da resposta imunológica foram realizados por Aden e Cohen (1975). Esses pesquisadores ofereceram solução açucarada (o estímulo condicionado) a ratos e imediatamente após, injetavam ciclofosfamida por via intraperitoneal (um fármaco imunossupressor, o estímulo não condicionado). Após três dias de condicionamento, os animais eram imunizados com eritroblastos de ovelhas (SRBC). Após a imunização, os animais eram novamente tratados com ciclofosfamida e re-expostos à solução açucarada. Houve uma atenuação da resposta de anticorpo a SRBC nos animais condicionados, com relação aos animais não condicionados (que não receberam o estímulo condicionado – solução açucarada), e aos animais condicionados que não recebiam a solução açucarada após a imunização. (ADER e COHEN, 2000).

Estudos semelhantes foram realizados por MORATO et al. (1996). Camundongos eram condicionados ou não à uma solução de leite e chocolate (o estímulo condicionado) e

administração de ciclofosfamida. Da mesma forma, havia uma menor produção de anticorpos (in vitro) nos animais condicionados, que eram re-expostos ao estímulo condicionado. Apesar da incompreensão dos mecanismos do condicionamento da resposta imunológica, certamente, esse trabalho foi fundamental para exemplificar a complexa modelagem entre SN e SI.

Atualmente, acredita-se que alterações psiquiátricas, como estados depressivos, também possam influenciar o desenvolvimento de doenças imunológicas. Em revisão, Irwin (2002) nos forneceu alguns dados dessa influência. Pacientes depressivos tendem a apresentar maiores riscos de doenças cardiovasculares. Nesse sentido, a formação de placas de aterosclerose parece estar relacionada à adesão de leucócitos no endotélio, após a secreção de IL-6 e TNF no lúmen do vaso. Pacientes depressivos podem apresentar maior expressão de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias. Estresse e depressão também podem alterar o curso de doenças infecciosas, como influenza (menor produção de anticorpos) em caregivers, ou causar reativação do vírus da herpes zoster. Esses estudos possuíam caráter epidemiológico e retrospectivo.

No caminho inverso, a sinalização entre o SI e o SN, Bezedovsky et al., 1986 demonstraram a ação da interleucina-1 (IL-1), mediador inflamatório produzido por células imunológicas, principalmente macrófagos e monócitos, na ativação do eixo HPA, resultando na produção de glicocorticóides pela adrenal. Os autores sugeriram haver um controle de feed-back negativo, sendo a IL-1 (que no passado, juntamente com outras citocinas, era simplesmente denominada de “produto de células imunológicas ativadas” ou “fator de aumento de glicocorticóide”) um sinalizador aferente (levando informações da periferia ao SN) e os glicocorticóides sinalizadores eferentes (carreando informações no sentido oposto). Conjuntamente com outros pesquisadores, o pensamento da função sensorial, e não apenas protetora, do SI começa a ser delineado. Com relação a esse pensamento, certamente o melhor

exemplo da função sensorial do SI seja o comportamento doentio, que será discutido posteriormente, devido à sua grande ênfase nessa dissertação.

Relatos da produção de hormônios peptídicos por linfócitos são relativamente freqüentes na literatura. ACTH, CRF, hormônio de crescimento, prolactina, gonadotrofina coriônica humana, endorfinas, somatostatina, polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e substância P (SP) são exemplos de peptídeos classicamente produzidos por células do SN, mas também liberadas por linfócitos. Entretanto, a relevância da atuação dessas substâncias em células neuronais é questionável, já que a quantidade produzida pelos linfócitos parece ser muito pequena. (BLALOCK, 1989).

As sinalizações bidirecionais entre SN e SI apontam para a existência de sinalizadores, e receptores para esses sinalizadores, comuns aos dois sistemas. Em artigo de revisão, Blalock, 1989, enfatizou (através de ensaios *in vitro* e estudos *in vivo*) esse compartilhamento de receptores. Os sinalizadores comuns seriam hormônios, peptídeos e interleucinas que possuiriam receptores tanto para células do SN e células glandulares endócrinas quanto para células imunológicas. Células linfóides possuem receptores para corticosteróides, hormônio de crescimento, acetilcolina, endorfinas, somatostatinas, entre outros. A hipófise de rato e camundongo expressa receptores para IL-1. E o cérebro parece possuir receptores (ou o RNA mensageiro correspondente) para IL-1 α e β , IL-2, IL-4, IL-6, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), entre outros (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996).

Uma observação importante das relações entre SI e SN, realizada por De La GARZA II (2005) e também outros autores, é a semelhança da sintomatologia do comportamento doentio (que será o assunto do próximo tópico) com a do transtorno depressivo maior (TDM). Ambos podem causar distúrbios de sono, anedonia, fadiga e confusão. Também compartilham alterações

endócrino-imunológicas semelhantes: ativação crônica do eixo HPA e hipersecreção de citocinas. Além disso, a administração de citocinas na clínica médica pode causar depressão, como o tratamento da hepatite C por IFN- α . Nesse caso, a depressão pode ser revertida com antidepressivos inibidores da recaptação da serotonina. Dessa forma, De la Garza II, sugeriu um novo modelo de depressão em animais: a administração de endotoxina ou interleucinas (induzindo o comportamento doentio) e a avaliação da anedonia. A anedonia é o principal sintoma do TDM, também está presente no comportamento doentio, e representa a abolição da obtenção de prazer em estímulos recompensadores. Em roedores, a anedonia é classicamente avaliada através da diminuição da ingestão de alimentos palatáveis (como pellets de açúcar e leite condensado). A anedonia induzida por administração de endotoxina ou interleucinas foi abolida após tratamento crônico com antidepressivos tricíclicos ou inibidores da recaptação de serotonina, justificando o novo modelo de depressão (DE LA GARZA, 2005).

A neuroimunologia trouxe uma nova perspectiva para o estudo do SN e SI; a de que grandes sistemas orgânicos podem interagir em um indivíduo. Besedovsky e Del Rey (1996) realizaram uma breve retrospectiva dos alvos de pesquisa da ciência durante a história da humanidade. Na primeira metade do século XX, o homem estava interessado em desvendar as interações entre os sistemas endócrino, nervoso e imunológico. Porém, muitas dessas pesquisas possuíam caráter empírico e dedutivo. Na segunda metade do mesmo século, o conhecimento começou a ser mais profundo; o homem interessava-se pelos mecanismos celulares e moleculares do organismo. A especialização da ciência proporcionou descobertas fantásticas e fundamentais para a humanidade. Entretanto, com a divisão do estudo em áreas fragmentadas, houve uma carência do entendimento de como todas essas partes poderiam se correlacionar. É nessa perspectiva que se insere a neuroimunologia; o SI e o SN são partes de um mesmo organismo,

compartilham sinalizadores e receptores para esses sinalizadores, e evoluíram de forma conjunta, realizando comunicações bidirecionais que permitiram a adaptação dos animais.

2. 2 COMPORTAMENTO DOENTIO

2.2.1 Ativação do eixo HPA e sinalização do SI para o SN durante o comportamento doentio

O comportamento doentio provavelmente representa o exemplo mais importante da função sensorial do SI. Nesse ponto de vista, o SI deixa de ser apenas um defensor do organismo, e passa a sinalizar, para outros órgãos e sistemas, eventos relevantes que ocorrem sob sua vigilância. Nesse momento, será realizada uma revisão sobre os mecanismos da sinalização de eventos imunológicos periféricos do SI para o SN (e a ativação do eixo HPA), e gradativamente abordaremos o comportamento doentio propriamente dito.

Em 1977, Besedovsky, Felix e Haas relataram que estímulos antigênicos poderiam alterar a atividade elétrica do hipotálamo de ratos. Apesar de, na época, não se conhecer o mecanismo dessa ativação hipotalâmica, tal descoberta foi importante para estudos posteriores sobre a sinalização do SI para o SN. Em 1984 já existiam relatos de que o SI poderia apresentar um papel sensorial ao SN. Blalock (1984) observou que infecções virais causavam aumento de ACTH em animais. Não se sabia, porém, se a fonte do ACTH induzido por infecção era a hipófise ou as próprias células imunológicas. Experimentos com camundongos hipofisectomizados levaram Blalock a crer que os próprios linfócitos eram responsáveis pela produção de ACTH, que então induziria a adrenal a produzir glicocorticóides. Existiria, dessa forma, um eixo “linfóide-adrenal”.

Além disso, a administração de LPS induzia a produção de endorfinas, que Blalock acreditava ser derivada de linfócitos. O SI, então seria dotado de uma função sensorial, detectando estímulos não cognitivos (como a presença de agentes infecciosos) e induzindo à alterações endócrinas. (BLALOCK, 1984).

Ainda com relação à indução de produção de hormônios após estimulação do SI, Besedovsky et al. (1986), como já mencionado, relataram que administrações de IL-1 eram capazes de ativar o eixo pituitária-adrenal em ratos e camundongos, resultando em aumento dos níveis sanguíneos de ACTH e glicocorticóides. O aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticóides (induzido pelo sobrenadante de leucócitos estimulados) era inibido quando se administrava um anticorpo de IL-1. Os autores sugeriram que a IL-1 representaria um sinalizador aferente ao SN; e os glicocorticóides, um sinalizador eferente. Esse trabalho foi essencial para se estabelecer qual eram os produtos das células imunológicas produzidos após estímulo antigênico (o sobrenadante de leucócitos estimulados) responsáveis pela indução do ACTH: as interleucinas, nesse caso, a IL-1.

Um ano após a publicação do artigo de Besedovsky, Sapolsky et al. (1987) verificaram que administração de IL-1 induzia a produção de CRH no hipotálamo, e que a neutralização do CRH inibia o aumento de glicocorticóides induzido pela IL-1. A ativação do eixo HPA após estimulação do SI (mimetizada com IL-1, nesses casos) torna-se uma hipótese mais plausível do que àquela proposta por Blalock (1984); a do eixo linfóide-adrenal.

Com essa perspectiva, Dunn (1988) estudou os efeitos da administração de IL-1 na bioquímica do hipotálamo de camundongos. Após administração intraperitoneal de IL-1 (tanto IL-1 α , quanto IL-1 β), Dunn observou um aumento da relação 3-metoxi, 4-hidroxifeniletilenoglicol (MHPG): NOR no hipotálamo, semelhante ao que acontece em camundongos submetidos a estímulos estressores. MHPG é um produto do catabolismo da NOR

e o aumento da relação MHPG: NOR sugere maior utilização de NOR. O pico desse aumento ocorreu 4 horas após a administração de IL-1, semelhante ao pico de glicocorticóides sanguíneo induzido pela IL-1. Como fibras noradrenérgicas que inervam o núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo regulam a liberação de CRH (já que o estímulo dessas fibras, ou a administração intracerebral de NOR induzem a secreção de CRH), os resultados de Dunn apontam para a seguinte sucessão de eventos: a IL-1 aumenta a liberação de NOR nas fibras noradrenérgicas hipotalâmicas, induzindo à secreção de CRH, que por sua vez, atua na hipófise, resultando na produção de ACTH. O ACTH age nas adrenais, aumentando a produção de glicocorticóides. (DUNN, 1988).

Além da IL-1, a IL-6 também é capaz de ativar o eixo HPA. Naitoh et al. (1988) administraram IL-6 em ratos e observaram aumento dos níveis sanguíneos de ACTH, que era inibido após neutralização do CRH, sugerindo que a IL-6 também ativava o eixo HPA. Já, administração intravenosa (i.v.) de TNF- α em ratos induziu aumento dos níveis sanguíneos de ACTH, mas a administração intracerebroventricular não resultou em aumento de ACTH. (SHARP et al., 1989), sugerindo que essa citocina, apesar de aumentar a produção de ACTH, não o fazia através do eixo HPA, quando administrada pela via i.v.

Com relação à produção de ACTH e endorfinas realizada pelas células imunológicas, relatada por Blalock (1984), Smith et al. (1990) demonstraram, através de estudos de sequenciamento de com PCR, que o ACTH produzido por linfócitos era muito similar àquele da hipófise. Holsboer et al. (1988) relataram aumento dos níveis de glicocorticóides, mas não de ACTH, após administração de IFN- γ em homens. Verificou-se então, que além da ativação do eixo HPA, existe também a produção local de hormônios pelas próprias células imunológicas. Além do ACTH e de glicocorticóides, leucócitos também podem produzir endorfinas durante um

processo inflamatório. E a ligação das enforfinas a receptores opióides nos terminais sensoriais periféricos pode aliviar a dor do processo inflamatório. (RITTNER, MACHELSKA, STEIN, 2005).

A ativação do eixo HPA pela IL-1 levou a outra questão: quais eventos ligariam a produção de IL-1 periférica e a liberação de NOR nos terminais noradrenérgicos do hipotálamo? Uma vez que interleucinas são moléculas muito grandes, e dotadas de natureza hidrofílica, para atravessar a barreira hemato-encefálica em concentração suficiente que ative as fibras noradrenérgicas. No intuito de entender a ligação entre interleucinas e ativação do hipotálamo, durante a década de 1990, trabalhos começaram a evidenciar a participação do nervo vago nessa comunicação.

A maioria dos trabalhos propostos para esse fim advinha de observações da secção do nervo vago abolindo os comportamentos associados à doença ou da ablação da febre, frente a estímulos antigênicos ou administração de IL-1. Foi o caso do trabalho de Watkins et al. (1995), que demonstraram que a ablação do nervo vago, na região subdiafragmática, inibia o aumento da temperatura induzido pela administração de IL-1 β recombinante em ratos. Esse achado, junto com outras descobertas (descritas em sequência), apontavam para uma sinalização mediada por fibras neuronais aferentes. Entre as outras descobertas, destacam-se: a ativação de ramos do nervo vago que inervam o fígado (mensurado por descargas elétricas) após administração intra-portal de IL-1 (NIIJIMA, 1996), e a presença de receptores para IL-1 em neurônios pós-ganglionares dos ramos aferentes do nervo vago. (GOEHLER et al., 1997).

A IL-1 também pode alcançar o cérebro pela via humoral: através de carreadores ou transportadores de IL; pela penetração no cérebro em regiões onde a barreira hemato-encefálica é frágil (órgãos circunventriculares), induzindo a produção local de prostaglandinas (PG); e através

da ligação em receptores de células endoteliais, que induz a produção de outros mediadores, agora dentro do cérebro. (MAIER et al., 1998).

As alterações comportamentais e a febre associadas à administração periférica de IL-1 (ou estímulos antigênicos que induzam à produção dessa interleucina) parecem ser moduladas por ação da mesma interleucina, mas agora no SN. A produção de IL-1 no SN parece ser derivada de células da microglia e macrófagos perivasculares e meningeais. (VAM DAM et al., 1992). Como veremos adiante, interleucinas, principalmente a IL-1, parecem ser responsáveis pela anorexia, diminuição da atividade locomotora, diminuição da exploração ambiental e social, anedonia, diminuição da memória e diminuição do comportamento sexual.

Já se sabia que a estimulação periférica do sistema imunológico (por exemplo, através de lipopolissacarídeo – LPS – parte integrante e ativa de bactérias gram negativas) aumentava a expressão de RNA mensageiro (mRNA) de IL-1 no cérebro. (BAN; HAOUR; LENSTRA, 1992; LAYE et al., 1994). Nesse contexto, Hosoi, Nokuma e Nomura (2000) estudaram os efeitos da estimulação elétrica do nervo vago aferente (na altura da artéria carótida, em pescoço de ratos anestesiados) na expressão de mRNA de IL-1. Houve um aumento da expressão de mRNA de IL-1, mRNA de CRH e aumento das concentrações plasmáticas de ACTH e glicocorticóides. Esses dados corroboraram com dados da literatura sobre a ativação do eixo HPA através do nervo vago; além disso, demonstraram que essa ativação também pode induzir à produção de IL-1 de novo no SN.

A via aferente do nervo vago, entretanto, parece ser mais importante para a indução do comportamento doentio em ratos do que em camundongos. A vagotomia subdiafragmática em ratos foi capaz de prevenir a febre (assim como os dados de Watkins, et al., 1995) e de diminuir as respostas comportamentais após administração i.p. de IL-1 β . Já, em camundongos, a mesma técnica cirúrgica foi capaz de atenuar apenas discretamente a ingestão de leite condensado, o

consumo de ração e a atividade locomotora. (WIECZOREK et al., 2005). Provavelmente, as duas vias (a neural e a humoral) participam na modulação dos comportamentos associados à doença. Dantzer (2001) sugeriu que a via neural seria responsável pela sensibilização de áreas cerebrais para interleucinas, que adentrariam no cérebro pela via humoral e agiriam (no caso do comportamento doentio) principalmente na amígdala baso-lateral.

2.2.2 Comportamentos associados à doença e a participação de interleucinas

Como vimos, administração periférica de IL-1 (ou produtos que induzam sua produção) induz à ativação do eixo HPA e a produção de novo de IL-1 no cérebro. A IL-1 no cérebro induz alterações comportamentais, descritas como comportamento doentio, e o desenvolvimento de febre. Descreveremos as alterações comportamentais associadas à doença e mecanismos responsáveis por algumas dessas alterações, a síndrome febre e a importância adaptativa e evolutiva do comportamento doentio. Apesar da febre não representar um comportamento, ela também será descrita devido à sua importância para a eliminação de agentes infecciosos e, portanto, para a sobrevivência do organismo.

O comportamento doentio, como definido por Hart em 1988, engloba várias alterações comportamentais, que podem incluir: anorexia, diminuição da atividade locomotora, diminuição da exploração ambiental e social, anedonia, diminuição da memória e diminuição do comportamento sexual.

Talvez a alteração mais clássica do comportamento doentio seja a diminuição do apetite, independente do agente causador. McCarthy, Kluger e Vander (1985) especularam que a IL-1 poderia ser responsável por essa anorexia transitória e observaram que administrações de

sobrenadante de cultura de monócitos humanos contendo IL-1 em ratos por via i.p. induziam a redução do consumo de alimento de forma semelhante à administração de endotoxina de *Escherichia coli* por via i.v. Como o LPS induz à produção de IL-1, ele é geralmente usado como controle positivo dos efeitos da IL-1. Em 1986, esses mesmos autores, observaram que administração desse mesmo sobrenadante ou de endotoxina de *E. coli* por via i.c.v. não alterava o consumo de alimento de ratos. Entretanto, dois anos depois, Plata-Salaman, Oomura e Kai (1988) relataram que administração de IL-1 e TNF recombinantes humano (uma forma mais pura do que o sobrenadante), também pela via i.c.v., reduziu o consumo de alimentos em ratos, mais especificamente, houve supressão da atividade de neurônios sensíveis à glicose na área lateral do hipotálamo. Estudos na área ventromedial do hipotálamo revelaram que o aumento das concentrações de glicose e a infusão de IL-1 β ou IFN- α eram, ambos, capazes de estimular neurônios responsáveis à glicose dessa região hipotalâmica. (KURIYAMA et al., 1990). De fato, o controle da ingestão de alimentos parece envolver neurônios sensíveis à glicose (que são inibidos pela glicose) e neurônios responsáveis à glicose (que são estimulados pela glicose). (Oomura, 1988).

Kent et al. (1992), investigaram se a anorexia induzida por IL-1 também poderia ser mediada periféricamente. Administração de antagonista de receptor de IL-1 endógeno (IL-1ra) bloqueava os efeitos anorexígenos da IL-1 apenas quando ambos eram administrados pela mesma via (i.c.v. ou i.p.). Bloqueio parcial da anorexia era observado quando IL-1ra era administrado centralmente e IL-1 por via i.p. Quando a IL-1 era administrada centralmente e IL-1ra periféricamente, não se observava a reversão do efeito anorexígeno. Esse trabalho demonstrou que a redução da ingestão de alimentos induzida pela IL-1 provavelmente é mediada tanto centralmente, quanto periféricamente. Periféricamente, a administração i.p. de LPS aumenta a

expressão da leptina (um hormônio que regula o apetite e a atividade metabólica) pelo tecido adiposo. (BERKOWITZ et al., 1998).

Quadros infecciosos também induzem à perda de massa corpórea. Essa perda parece estar relacionada à anorexia e também aos mecanismos de termogênese presentes na febre. Estudos com IL-1ra em ratos sugerem que diferentes subtipos de receptores de IL-1 β (tipo I, presentes em linfócitos T e fibroblasto, ou tipo II, presentes em linfócitos B e macrófagos) parecem ser responsáveis pelas alterações comportamentais associadas à doença e à perda de massa corpórea, já que administrações de IL-ra eram capazes de bloquear ou atenuar a redução de exploração social induzida por IL-1, mas não a perda de peso dos ratos. (BLUTHÉ et al., 1995).

Além da anorexia e da perda de massa corpórea, o comportamento doentio também inclui diminuição da atividade locomotora e da exploração. Experimentos com IL-1 α recombinante (rIL-1 α) murina demonstraram que a infusão constante de rIL-1 α em ratos pela via i.p. durante quatro dias foi capaz de diminuir a atividade locomotora vertical (levantar) e horizontal. (OTTERNESS et al., 1988). Em 1990, Spadaro e Dunn verificaram que administração i.c.v. de rIL-1 tanto humana quanto murina diminuíram a exploração de uma câmara de multi compartimentos (MCC) por camundongos. A MCC é dividida em 9 compartimentos, em que cada um possui um buraco no chão, no qual é posicionado um material de aço. A deambulação pelos compartimentos infere dados de atividade locomotora; e a investigação dos buracos e o tempo gasto nos mesmos, da exploração de um novo estímulo. A administração de rIL-1 i.c.v. diminuiu o tempo gasto na exploração dos buracos, mas não a atividade locomotora dos camundongos. A administração de antagonistas de CRH ou de PG não reverteram o quadro, já tratamentos com naloxona (antagonista opióide) ou sulpirida (antagonista dopaminérgico) foram capazes de prevenir a redução da exploração induzida pela IL-1, sugerindo que a diminuição da

exploração possa envolver os sistemas opioidérgico e dopaminérgico. (SPADARO, DUNN, 1990). Entretanto, Yirmiya et al. (1994) relataram que a administração de naltrexona (antagonista opióide) não foi capaz de reverter os efeitos da atividade locomotora, da auto limpeza e da febre induzidos por administração de LPS. Nesse trabalho, a atividade locomotora e a auto limpeza foram observadas no Campo Aberto (CA), uma arena circular que infere a atividade geral dos animais. Em 1995, Linthorst et al., correlacionaram a diminuição da atividade geral de ratos (inferida por escores de locomoção, autolimpeza, ingestão de água e alimento) com aumento das concentrações extracelulares de serotonina (5-HT) e do seu metabólito ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) no hipocampo.

A exploração social de ratos e camundongos também diminui durante a resposta à doença. Neste teste, um animal adulto é submetido a um jovem da mesma espécie. Durante a exposição, observa-se a interação social através de farejamento anogenital, perseguição e o contato com a cabeça e pescoço. Administrações de LPS (BLUTHÉ et al, 1992) e de IL-1 (BLUTHÉ et al, 1998) diminuíram a exploração social de animais. A administração de IL-1ra por via i.c.v. bloqueou totalmente os efeitos da IL-1 administrada periféricamente (i.p.) na redução da exploração social, mas bloqueou parcialmente os efeitos anorexígenos da IL-1 (KENT et al., 1992), provavelmente devido aos mecanismos periféricos relacionados à anorexia induzida por IL-1. A administração de IL-6 sozinha induziu a febre e ativação do eixo HPA, mas alterou a exploração social e atividade locomotora apenas quando era associada à IL-1 (LENCZOWSKY et al., 1999).

Além dessas alterações, a literatura também relata anedonia (comentada anteriormente) alteração dos padrões de sono, diminuição da memória e diminuição do comportamento sexual. IL-1, TNF e IFN diminuem a quantidade de sono não REM (rapid eye movement) e aumentam a do sono REM. (KRUGER, MAJDE, 1994). A memória é testada através de experimentos com

Labirito Aquático de Morris, que consiste de uma arena circular repleta de líquido opaco com uma plataforma submersa. Através de dicas visuais, os animais aprendem a nadar até a plataforma escondida. Administração i.c.v. de IL-1, mas não de IL-6, diminuiu a capacidade de ratos previamente submetidos ao labirinto de encontrar a plataforma (OITZL et al., 1993). Já, o comportamento sexual é alterado de forma diferente conforme o gênero. Machos tratados com IL-1 ou LPS não apresentaram alterações, entretanto, as fêmeas sob o mesmo tratamento demonstraram menor receptividade a machos. Porém, no teste de CA, ambos gêneros apresentaram redução de locomoção frente aos tratamentos (YIRMIYA et al., 1995).

Apesar do vasto conhecimento sobre as alterações comportamentais induzidas por interleucinas, pouco se sabe sobre os mecanismos relacionados ao comportamento doente, e como as interleucinas no SN, particularmente a IL-1, são responsáveis pelas alterações de comportamento.

Somando-se às alterações comportamentais, muitas vezes, as infecções também são caracterizadas por aumento fisiológico da temperatura, a febre, que também pode ser induzida por IL-1 (DINARELLO, 1984). A IL-1, conjuntamente com IL-6 e TNF antigamente faziam parte dos chamados pirógenos endógenos, e atualmente são denominados de citocinas pirógenas. Entretanto, estudos recentes indicam que as citocinas pirógenas provavelmente não são responsáveis pelo desenvolvimento inicial da febre. A administração de antagonistas dessas citocinas não inibe o aparecimento da febre, além disso, por não serem expressas constitutivamente, requerem um período de tempo (de no mínimo 30 minutos) para serem produzidas, já a febre pode se instalar anterior a esse período. Fortes evidências indicam que o aparecimento da febre aconteça da seguinte forma: produtos microbianos como o LPS ativam a cascata do complemento, produzindo C5a, que no fígado atua nas células de Kupfer (os macrófagos desse órgão), causando a liberação de PGE2. A PGE2 liga-se a receptores em

aferentes vagais, enviando estímulos para o núcleo o trato solitário (NTS), área de projeção primária do nervo vago, e daí para o hipotálamo, na área pré-óptica anterior (POA). Na POA, há liberação de NA, que se liga a receptores α -1 e α -2 adrenérgicos. Primeiramente, neurônios sensíveis a calor são inibidos (caracterizando a fase inicial da febre) e posteriormente ocorre a produção de PGE2 dependente de COX-2 que também inibe esses neurônios (induzindo à fase tardia). As citocinas pirógenas parecem contribuir para a fase tardia da febre. Os sistemas efetores, responsáveis pelo aumento da temperatura corpórea são a musculatura estriada esquelética (responsável pelos tremores musculares, aumentando a produção de calor) e o sistema cárdio-vascular (responsável pela vasoconstrição cutânea, diminuindo a perda de calor). A POA sinaliza para a região dorso-medial do hipotálamo posterior, e daí para a formação reticular. Da formação reticular a sinalização continua para a medula espinhal, atingindo os cornos ventrais e os neurônios motores da musculatura esquelética, realizando a contração. Também ocorre sinalização da POA para a área tegmental ventral, e daí para neurônios pré-motores simpáticos na medula (responsáveis pela vasoconstrição cutânea), atingindo os neurônios pré-ganglionares, e então, os pós-ganglionares que realizam a vasoconstrição. Para revisão, ver BLATTEIS, 2006.

O processo de recuperação e a abolição dos comportamentos associados à doença e da febre não são resultantes de um processo passivo. Ao contrário, envolve mecanismos que se opõem àqueles induzidos pelas citocinas pirógenas. No SN, existe a produção de hormônios como a arginina vasopressina (VAP) e o hormônio estimulante de melanócitos- α (α -MSH), detentores de propriedades anti-piréticas que bloqueiam a febre. A VAP também parece bloquear a redução da exploração social induzida pela IL-1. Outra possibilidade seria a produção de IL-1ra no SN, que poderia bloquear diretamente os efeitos da IL-1. (KENT et al, 1992). Além disso, os glicocorticóides produzidos durante a ativação do eixo HPA teriam um papel importante de

controlar a produção de interleucinas (GOUJON et al., 1995), e assim também, o comportamento doentio.

2.2.3 Aspectos adaptativos e motivacionais do comportamento doentio

Descritos os comportamentos associados à doença e a febre, trataremos das evidências adaptativas que parecem ser inerentes a ambos. Já em 1975 Kluger, Ringler e Anver observaram que o desenvolvimento da febre poderia aumentar a probabilidade de sobrevivência de um animal ou indivíduo. Lagartos foram infectados com a bactéria *Aeromonas hydrophila*, e submetidos a três temperaturas diferentes: neutra, baixa e alta. Lagartos mantidos sob alta temperatura, portanto, cujo desenvolvimento de febre era permitido, demonstraram maior índice de sobrevivência. Animais ectotérmicos, que não são capazes de desenvolver febre através de mecanismos endógenos, apresentaram um comportamento diferenciado frente a infecções: a procura por ambientes aquecidos, que foi nomeada de febre comportamental (VAUGHN, BERNHEIN, KLUGER, 1974). Animais recém nascidos, cujo sistema de termo-regulação ainda é imaturo, também podem apresentar a febre comportamental, como observado por Satinoff, McEwen e Williams (1976): coelhos recém-nascidos foram tratados com pirógenos e submetidos a um ambiente com diferentes graduações de temperaturas; esses animais preferiam regiões mais aquecidas, e nessas regiões, suas temperaturas corpóreas também aumentavam.

Em 1988, Benjamin Hart postulou que a febre e as alterações comportamentais associadas à doença seriam dotadas de alto valor adaptativo e favoreceriam a recuperação do animal. O desenvolvimento da febre requer um alto gasto metabólico para o organismo. Calcula-se que em humanos, para cada grau Celsius de elevação na temperatura, ocorre aumento de 13% do

metabolismo corpóreo (através principalmente dos tremores musculares e do aumento do metabolismo de gordura). Apesar desse alto gasto metabólico, Hart descreveu a febre como uma estratégia evolutiva, o que segundo o autor, significa que ela não foi benéfica em todos os casos, mas em alguns, foi essencial para a sobrevivência dos animais. A febre propicia a destruição de bactérias por neutrófilos, aumenta a proliferação de linfócitos e a síntese de anticorpos e diminui a multiplicação de agentes termossensíveis. (HART, 1988). Atualmente, sabe-se que são muitos os benefícios imunológicos que a febre pode proporcionar: aumento da mobilidade e migração de neutrófilos e monócitos, aumento da fagocitose e da pinocitose, aumento da produção de radicais livres de oxigênio por fagócitos, aumento da produção de IFN, aumento da expressão de receptores de Fc (a porção invariável do anticorpo), aumento da atividade de linfócitos Th, aumento da produção de anticorpos, entre outros (BLATTEIS, 2006).

O comportamento doentio representa as mudanças ou alterações organizadas de comportamento que se desenvolvem em indivíduos durante uma infecção. (DANTZER, 1991). Essas alterações não são específicas a uma espécie, nem a um processo patológico. O comportamento doentio não seria resultado apenas da debilitação do animal, mas representaria comportamentos filogeneticamente preservados, já que muitas espécies de vertebrados (de peixes a mamíferos) apresentam tais alterações comportamentais. De alguma forma, segundo Hart, todos os comportamentos associados à doença (ou a maior parte deles) favoreceriam o desenvolvimento da febre. Assim, a anorexia diminuiria a motivação do animal em procurar alimento, diminuindo a exposição do animal ao ambiente, preservando sua temperatura e reduzindo a probabilidade de um encontro com um possível predador. Além disso, concomitante com a febre, ocorre uma diminuição na disponibilização plasmática de íons ferro e zinco, fundamentais para a multiplicação de muitos agentes infecciosos. Dessa forma, a anorexia e a conseqüente diminuição da ingestão desses minerais também favoreceria a sobrevivência do

animal. O aumento da quantidade de sono não REM proporcionaria a conservação de calor pelo animal, uma vez que o mesmo deixaria de se movimentar. A redução da autolimpeza, além de reduzir a exposição corpórea pela movimentação, também diminuiria o gasto de saliva e a perda de calor proporcionado pela evaporação da mesma. (HART, 1988).

A importância do comportamento doentio para que um indivíduo ou animal elimine os agentes infecciosos é bem aceita pela literatura internacional. Portanto, se o desenvolvimento de comportamento doentio é tão importante para o organismo, ele não deveria ser imutável, e deveria permitir que o animal continuasse percebendo alterações ambientais para se adequar a elas. Muitos estudos indicam que isso ocorre, e desta forma, o comportamento doentio também pode ser avaliado sob uma perspectiva motivacional.

Motivação pode ser descrita como um estado central, que reorganiza a percepção e a ação. Ela permite que o indivíduo selecione a melhor estratégia para sobrevivência e bem estar, dependendo da situação. (BOLLES, 1974). O comportamento doentio, nesse sentido, pode ser considerado um estado motivacional.

Em 1964, Miller realizou experimentos com ratos e demonstrou que ratos administrados com endotoxina bacteriana e treinados para pressionar uma barra para receber água realizavam menor número de pressões. Porém, quando ratos tratados também com endotoxina eram colocados em uma plataforma giratória que parava por alguns instantes, caso o animal pressionasse uma barra, o tempo de latência para pressionar a barra diminuía. Esses resultados demonstraram que o comportamento (pressionar ou não a barra) dependia do contexto ambiental o animal se encontrava. Em 1995, Aubert, Goodall e Dantzer demonstraram que o comportamento doentio também alterava a qualidade da ingestão de alimentos, através de uma escolha do animal. Ratos tratados com LPS ou IL-1 β apresentavam redução da ingestão de alimentos, porém preferiam alimentos ricos em carboidrato a alimentos protéicos ou gordurosos,

favorecendo a termogênese. Nesse caso, devido à propriedades das citocinas em favorecer a lipólise e a trigliceridemia, e portanto, à hiperlipidemia, o aumento da ingestão de alimentos gordurosos não seria favorável.

Da mesma forma, camundongos fêmeas lactantes administradas com LPS deixavam de construir o ninho quando submetidas à temperatura de 20° C. Entretanto, em um ambiente de 4° C, elas voltavam a construir o ninho.

Vários estados motivacionais competem entre si para a organização do comportamento. Portanto, o comportamento possui hierarquias de estados motivacionais, que é atualizada conforme as demandas internas e externas do animal. Dessa forma, o medo compete com a doença, e em um indivíduo, ele precederia os comportamentos de doença. (DANTZER, 2001).

2.3 LPS, TOLL LIKE RECEPTOR – 4 E IMUNIDADE INATA

Lipopolissacarídeo, LPS, como relatado anteriormente, é parte constituinte e altamente preservada da parede de bactérias gram-negativas e pode induzir uma resposta inflamatória no hospedeiro, com a produção de citocinas pró-inflamatórias. O LPS inclui-se nos chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's), que não são encontrados em vertebrados normais, e pode ser utilizado experimentalmente para induzir comportamento doentio em animais, já que estimula a produção de IL-1.

No tecido, ou na cavidade abdominal (no caso das administrações i.p.), o LPS induz à exposição de selectinas (P e E) de células endoteliais dos vasos. Essas selectinas se ligam à glicoproteínas de neutrófilos e monócitos que, favorecidos pela inflamação local (principalmente pelo aumento da permeabilidade vascular), migram para o tecido. Em geral, nas primeiras 6 h

ocorre a migração maciça de neutrófilos (que representam a primeira linha de defesa da imunidade inata), e posteriormente de monócitos (JANEWAY et al., 2007). Dessa forma, além do comportamento doentio o LPS também pode ser utilizado como um modelo de inflamação, com recrutamento de neutrófilos, monócitos e indução de produção de citocinas.

O receptor para o LPS é o Toll-like receptor 4 (TLR4). Existem atualmente 10 TLR descritos em humanos (BELVIN, ANDERSON, 1996). Os TLR's foram descritos pela primeira vez na *Drosophila melanogaster*, e nelas são importantes para a produção de peptídeos antimicrobianos em resposta à infecção (LEMAITRE et al., 1996). Em mamíferos, a ativação dos TLR's induz à ativação do fator de transcrição fator nuclear- κ B (NF κ B) e à produção de interleucinas e expressão de moléculas co-estimuladoras (essas últimas, importantes para a resposta adaptativa).

Em linhas gerais ocorre a ligação do LPS à proteína de ligadora de LPS (LBP), produzida pelo fígado durante a resposta de fase aguda. A LBP é responsável por transferir o LPS ao CD14, um receptor de macrófagos. O CD14 (que não possui domínio intracelular) ligado ao LPS interage com o TLR4, induzindo a ativação do NF κ B. (BEUTLER, 2000). O TLR4 possui um domínio intracelular, denominado de TIR, pois também está presente no receptor de IL-1. O domínio TIR liga-se a uma proteína adaptadora e ativa MyD88. A MyD88 possui dois domínios; o primeiro liga-se ao TIR, e o segundo (o domínio de morte, assim denominado porque foi primeiramente descoberto em proteínas envolvidas na apoptose). O domínio de morte da MyD88 interage com outro domínio de morte (IRAK), agora de uma quinase serina-treonina da imunidade inata (SIK). Isso inicia uma cascata de quinases que culmina com a fosforilação uma proteína denominada de I κ B pela quinase I κ k. A I κ B encontra-se ligada ao NF κ B no citoplasma, impedindo-o de ser ativado (figura 1). A fosforilação da I κ B resulta na liberação do NF κ B, que se dirige ao núcleo, onde inicia a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α ,

IL-1 e IL-6, que como já visto, também participam do desenvolvimento da febre. (MIYAKE, 2004; JANEWAY et al., 2007).

Figura 1 – Representação da ativação do receptor Toll-like receptor 4. Após a formação do complexo LPS – LBP, ocorre a ligação ao receptor de superfície CD4, que ativa o TLR-4. O resultado final é a ativação do fator de transcrição NFκB, que induz à transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Figura retirada de Janeway et al., 2007

Essas citocinas são responsáveis pela indução de proteínas de fase aguda nos hepatócitos. Algumas dessas proteínas possuem função de opsonização, facilitando a posterior fagocitose por neutrófilos e macrófagos. Outra ação das citocinas pró-inflamatórias é a ativação do endotélio da medula óssea, que libera neutrófilos para a circulação. O TNF- α também estimula a expressão de fatores de coagulação, importante para conter a infecção no local, e impedir que o agente infeccioso atinja a circulação. Quando há disseminação da infecção para a circulação (septicemia), o TNF- α produzido agora sistemicamente pode induzir o choque séptico, caracterizado por vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, coagulação intravascular disseminada e eventualmente à falência múltipla de órgãos. (JANEWAY et al., 2007).

Portanto, o TLR4 é fundamental para a sobrevivência do organismo ao agente infeccioso. Tal importância é observada em camundongos C3H/HeJ que possuem uma mutação no gene que codifica esse receptor (POLTORAK et al., 1998). Esses camundongos não apresentam comportamento doentio quando tratados com LPS, porém o apresentam se tratados com IL-1 β . (SEGRETI et al., 1997). Além disso, também são resistentes ao choque séptico, porém apresentam maior mortalidade frente à infecções, como por exemplo *Escherichia coli* (NOWICKI et al., 1999), *Salmonella entérica* e *Leishmania donovani* (O'BRIEN, ROSENSTREICH, TAYLOR, 1980).

Resumindo, a administração de LPS em um tecido ou cavidade é responsável pelo recrutamento de neutrófilos por selectina, ativação de macrófagos residentes e produção de citocinas pró-inflamatórias: TNF- α , IL-1 e IL6. Essas citocinas são responsáveis por ativação do eixo HPA, desenvolvimento da febre, alterações comportamentais associadas à doença e ativação do sistema imunológico.

2.4 ENVELHECIMENTO

Revisados os temas de neuroimunologia, e do comportamento doentio e da ativação da imunidade inata desencadeados pelo receptor para LPS (o TLR4), abordaremos o assunto central dessa dissertação, o envelhecimento. Estudos nos Estados Unidos relatam que a média de vida de sua população no último século cresceu de 47 para 78 anos e especula-se que, em 2025, 20% dessa população terá mais de 65 anos. Dados epidemiológicos demonstram que doenças neurodegenerativas relacionadas ao envelhecimento, como mal de Alzheimer, têm aumentado

significativamente e, mais ainda, que grande parte da população idosa apresenta piora das funções cognitivas mesmo na ausência de qualquer doença identificável. Ainda, a senescência é acompanhada por modificações da resposta imunológica, tornando os idosos especialmente vulneráveis à infecções, doenças auto-imunes e cânceres. O aumento da população idosa no quadro mundial e as alterações relacionadas ao envelhecimento tornam o estudo da senescência um importante foco para pesquisas no cenário atual, principalmente no intuito de melhorar a qualidade de vida em idades mais avançadas.

Muitas teorias tentaram explicar o envelhecimento. Muito provavelmente, o envelhecimento possui causas multifatoriais e inclui muitas dessas teorias. Iniciaremos uma breve revisão de algumas teorias, para em seguida relatarmos algumas alterações que parecem ser decorrentes do envelhecimento.

Segundo Medawar (1952), o envelhecimento seria resultado do acúmulo de genes maléficos que só seriam expressos em uma fase mais tardia, geralmente após a média de vida de uma espécie. Como na natureza os animais morrem de outras causas que não o envelhecimento em si (predação, doenças ou fome), o resultado seria uma menor pressão da seleção natural em cada fase subsequente da vida do animal. Então, a expressão desses genes deletérios, além de não sofrer totalmente a pressão da seleção, seria prorrogada a um ponto em que eles raramente prejudicariam o animal, pois provavelmente, o mesmo morreria de outras causas antes que isso acontecesse. (MEDAWAR, 1952). Williams, 1957, ampliou a teoria de Medawar sugerindo que alguns genes pleiotrópicos poderiam ter efeitos benéficos ou maléficos, e que os efeitos maléficos só seriam expressos em uma idade avançada, escapando da seleção natural. Essa teoria foi nomeada de Teoria pleiotrópica antagonista.

Em 1979, Kirkwood e Holliday, propuseram a teoria do “Soma descartável” (do inglês, “Disposable soma”, realizando analogia ao termo “Disposable goods”), relatando que a

manutenção da precisão na síntese de macromoléculas envolve gastos de energia, que são alternados entre essa manutenção, a reprodução e o crescimento do organismo. Portanto, como no ambiente selvagem animais não sobrevivem eternamente, devido a fatores ambientais de predação, doenças e escassez de alimentos, não seria desejável que o organismo investisse maciçamente na manutenção da síntese de macromoléculas em detrimento da reprodução e do crescimento. Então, um certo nível de erro seria adaptativo. Esse nível de erro seria variável para cada espécie (devido a diferentes requisitos para sobrevivência), e segundo os autores, quanto maior a expectativa de vida de uma espécie, menor seria a porcentagem de erros. A baixa expectativa de vida (que ocorre, por exemplo, em camundongos, que vivem cerca de 3 anos) seria determinada por fatores ambientais, como presença de muitos predadores para aquela espécie. Quanto maior a probabilidade de que um animal de uma dada espécie venha a óbito mais cedo, maior a necessidade de se reproduzir, e menor seria o ‘gasto energético’ restante para a precisão de síntese de macromoléculas. Já, quanto maior a longevidade de uma espécie, maior o período de tempo em que os animais seriam submetidos à seleção natural, e maior a necessidade de que a síntese de macromoléculas fosse precisa. Dessa forma, maior seria o gasto energético para essa síntese, cujo custo seria uma menor capacidade reprodutiva. Essa teoria adveio de observações de que espécies de maior longevidade possuem menor capacidade reprodutiva (menor número de filhos por geração, maior tempo de gestação, maior intervalo entre partos) e vice-versa. O envelhecimento seria então um acúmulo de defeitos nas macromoléculas no organismo (KIRKWOOD, HOLLIDAY, 1979).

Outras teorias tentaram explicar o envelhecimento. Citamos duas como exemplo: a teoria do radical livre, que propõe que a produção metabólica normal de radicais livres durante a vida, lentamente cause danos à moléculas e células do organismo (HARMAN, 1956); e a teoria do envelhecimento programado e altruísta, que sugere que o envelhecimento e a conseqüente morte

programada de indivíduos seja favorável à população como um todo. Essa teoria foi embasada principalmente em experimentos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e não será discutida nessa dissertação.

Além da dificuldade na compreensão de como e porquê o envelhecimento existe, a definição e as consequências do envelhecimento também são complexas. Nessa dissertação, utilizaremos o termo envelhecimento como “alterações que ocorrem com a passagem do tempo e que são eventualmente associadas com declínio da função e redução na habilidade em manter a homeostase” (TIMIRAS, 1995). Muitas vezes, alterações fisiológicas (a senescência) e patológicas (senilidade) são utilizadas como termos sinônimos no estudo do envelhecimento. (JACOB FILHO, SOUZA, 1994). Tentaremos nos limitar a descrever as alterações fisiológicas, relacionadas à neuroimunologia, e mais especificamente, ao comportamento doente e alterações da imunidade inata.

No contexto da neuroimunologia, o envelhecimento parece estar relacionado a uma ativação excessiva do eixo HPA, resultando em maiores níveis de glicocorticóides (cortisol ou corticosterona, dependendo da espécie). A “hipótese da cascata de glicocorticóides”, proposta por SAPOLSKY, KREY e McEWEN (1985), sugere que os altos níveis de glicocorticóides dos animais e humanos idosos provocam danos a neurônios do hipocampo, o que prejudicaria o feedback normal de inibição do eixo HPA. Dessa forma, os níveis de glicocorticóides permaneceriam elevados, levando à posteriores lesões hipocampais, perpetuando esse fenômeno. Os danos no hipocampo, em conjunto com inúmeras outras alterações, participam dos déficits cognitivos relacionados à idade, como prejuízo da memória e do aprendizado (GREENE, NARANJO, 1987). Em humanos, é relatado um aumento da relação cortisol / dehidroepiandrosterona (DHEA) (FERRARI et al., 2001). DHEA parece ter efeito imuno estimulante (como aumento na produção IL-6 e TNF por monócitos) e parece antagonizar alguns

efeitos do cortisol (como a redução da produção de superóxidos) e a própria produção de cortisol (BUTCHER, LORD, 2004).

Com relação às alterações decorrentes de processos infecciosos ou de fatores que os mimetizem, o desenvolvimento de febre após estimulação com LPS ou TNF foi menor em ratos idosos, quando comparado com jovens. Essa alteração parece estar relacionada à menor produção de PGE2 hipotalâmica (BIBBY, GRIMBLE, 1991); dado semelhante em camundongos foi obtido por Grahn, Norman e Yoshikawa em 1987. Outros trabalhos corroboram menor intensidade de febre em ratos (SCARPACE et al., 1992; WACHULEC, PELOSO, SATINOFF, 1997; PELOSO et al., 2003) e humanos (YOSHIKAWA, 1983; BERMAN, FOX, 1985). Em camundongos também foi relatado abrandamento da febre após estimulação com IL-1, (NORMAN, YAMAMURA, YOSHIKAWA, 1988) e TNF- α (MILLER et al., 1991). Estudos com IL-1 marcada demonstraram que a passagem dessa citocina pela barreira hemato-encefálica em camundongos idosos foi menor do que em camundongos jovens ou de meia idade, sugerindo um mecanismo adicional (e talvez complementar à menor produção de PGE2) pelo menor desenvolvimento de febre em idosos, já que a administração i.c.v. propicia o desenvolvimento de febre em animais idosos (McLAY, KASTIN, ZADINA, 2000). Ratos idosos administrados com LPS e submetidos a um ambiente com temperaturas crescentes e graduais demonstraram comportamento semelhante ao de répteis e recém-nascidos, a febre comportamental. Esses animais não foram capazes de desenvolver a febre, porém, procuravam ativamente ambiente com maior temperatura, e nesse local, suas temperaturas corpóreas aumentaram (FLOREZ-DUQUET, PELOSO, SATINOFF, 2001). Estudos posteriores do mesmo grupo demonstraram que a ausência de febre em ratos idosos estava associada a um menor consumo de oxigênio (uma medida de produção de calor pelo organismo) nesses animais quando comparado com animais

jovens, sugerindo que a menor produção de calor seja um dos mecanismos da ausência de febre nos idosos. Entretanto, além do consumo de oxigênio ser menor em idosos do que jovens, nos idosos ele foi menor em animais tratados com LPS do que em salina. Os autores sugerem que a menor passagem de citocinas pela barreira hemato-encefálica resultaria em maior quantidade dessas substâncias no plasma, e sugerem que altas concentrações de citocinas plasmáticas possam causar redução do metabolismo no organismo (BUCHANAM, PELOSO, SATINOFF, 2003).

Poucos trabalhos estudaram o comportamento doentio de animais idosos, experimentalmente. Godbout et al. (2005) estudaram os efeitos centrais e comportamentais da administração periférica (i.p.) de LPS em camundongos idosos. Camundongos idosos apresentaram um estado de ativação basal da microglia maior do que jovens, e maior produção de citocinas inflamatórias e estresse oxidativo após estímulo com LPS. Além disso, a redução dos comportamentos observados (exploração social e atividade locomotora) foi mais prolongada em animais idosos e a ingestão de alimento e perda de peso foram mais acentuadas nesses animais. Os autores sugerem que a maior neuroinflamação esteja diretamente relacionada aos maiores déficits comportamentais apresentados por idosos frente à infecções sistêmicas (GODBOUT et al., 2005). O comportamento doentio em animais idosos será abordado mais intensamente na discussão dos resultados dessa dissertação.

As alterações imunológicas decorrentes do envelhecimento são denominadas de imunosenescência. Talvez a alteração mais marcante seja a involução tímica, com conseqüente diminuição de linfócitos T naive e dificuldade de montar respostas à antígenos novos (GRUVER, HUDSON, SEMPOWSKI, 2007). Outras alterações freqüentes são: predominância de linfócitos T de memória, em detrimento de linfócitos T naive, e menor capacidade de proliferação de ambos; diminuição da produção de IL-2 (à qual acredita-se ser derivada da menor quantidade de células T naive, principais produtoras dessa citocina), prevalência de um perfil de citocinas Th2

(desvio de Th1 para Th2); maior susceptibilidade à doenças auto-imunológicas, da qual acredita-se que seja derivada de maior quantidade de imunoglobulinas secretadas por linfócitos B, aumento da meia vida de linfócitos B nos centros germinativos; menor taxa de hipermutação do gene que codifica imunoglobulinas em células B, que induz à menor capacidade em gerar anticorpos de alta-afinidade a antígenos (GINALDI et al., 2001).

Estudos com neutrófilos de humanos idosos demonstraram redução da quimiotaxia e da degranulação, e manutenção ou redução dos mecanismos intracelulares de eliminação de patógenos e da fagocitose (GINALDI et al., 1999). Em camundongos a quimiotaxia de neutrófilos de idosos estudada in vitro após estimulação com peptídeo FMLP e leucotrieno B4 demonstrou resposta semelhante à de jovens (ESPOSITO, POIRIER, CLARK, 1990). Também em camundongos, após infecção ocular experimental com *Pseudomonas aeruginosa*, observou-se menor recrutamento inicial de neutrófilos e menor eliminação da bactéria, e maior recrutamento tardio de neutrófilos que foi associado à destruição tecidual (KERNACHI et al., 2000). Em ratos, a fagocitose de *Klebsiella pneumoniae* por neutrófilos recrutados ao pulmão foi menor em idosos do que jovens (MANCUSO et al., 2001).

Em 2000, Franceschi et al. propuseram o termo “inflamm-aging” (“envelhecimento inflamado”) para retratar o estado pró-inflamatório característico do envelhecimento. Esse estado é devido principalmente a aumento dos níveis plasmáticos de IL-6, basais e após estímulo antigênico, e é causado por contínua estimulação de macrófagos. Pode ser considerado uma consequência de adaptação bem sucedida a estímulos estressores (FRANCESCHI et al., 2000).

Apesar da maior secreção de IL-6, outros parâmetros parecem estar diminuídos: macrófagos de camundongos idosos estimulados com IFN- γ apresentaram menor burst oxidativo (DING, HWANG, SCHWAB, 1994); da mesma forma, monócitos humanos de indivíduos idosos

demonstraram menor atividade citotóxica contra células tumorais (relacionada com menor produção de radicais livres) após estímulo com LPS (McLACHLAN et al., 1995).

A atividade individual da célula natural killer (NK) nos idosos está diminuída. Entretanto, devido ao aumento do número circulante dessas células, o resultado final parece ser a compensação e manutenção da função citotóxica (PAWELEC et al., 1998).

Ginaldi et al (2001) sugeriram uma boa forma de descrever a imunosenescência:

Words such as alteration, deterioration and decline do not account for the complexity of immunosenescence since some immune parameters increase, others decrease and still others, remain unchanged, so that the term 'continuous remodeling' would be more appropriate. (Palavras como alteração, deterioração e declínio não expressam a complexidade da imunosenescência já que alguns parâmetros imunológicos aumentam, outros diminuem e outros, ainda, permanecem inalterados, de forma que o termo 'remodelamento contínuo seria mais apropriado).

3 OBJETIVOS

Serão descritos os objetivos geral e específicos detalhadamente.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações comportamentais e imunológicas de camundongos de diferentes idades durante o comportamento doentio.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o peso relativo de adrenais, baço e timo de camundongos adultos, de meia idade e idosos, sensíveis (da linhagem C3H/HePas) e resistentes (C3H/HeJ) aos efeitos do LPS.
- Avaliar o efeito do LPS na ingestão de alimentos e no peso corpóreo de camundongos adultos, de meia idade e idosos, sensíveis e resistentes aos efeitos do LPS.
- Avaliar o efeito do LPS na atividade geral de camundongos adultos, de meia idade e idosos, sensíveis e resistentes aos efeitos do LPS.
- Avaliar o efeito do LPS nos níveis de ansiedade de camundongos adultos, de meia idade e idosos, sensíveis e resistentes aos efeitos do LPS.
- Avaliar o efeito do LPS na fagocitose e no burst oxidativo de neutrófilos sanguíneos de camundongos adultos, de meia idade e idosos, sensíveis e resistentes aos efeitos do LPS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundogos C3H/HePas (sensíveis aos efeitos do LPS) e C3H/HeJ (resistentes aos efeitos do LPS) em três intervalos de idades: camundongos adultos, de 3 a 6 meses; camundongos de meia idade, de 12 a 15 meses; e camundongos idosos de 18 a 21 meses, mantidos em número de três a quatro em caixa plástica pequena (16 x 28 x 13 cm), ou em número de 6 a 15 em caixa plástica grande (34 x 49 x 16 cm). A cama consistia de maravalha livre de resíduos e autoclavada. Os animais foram mantidos em salas artificialmente iluminadas, em um ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (luzes acesas às 7:00 a.m.), com temperatura ($22 \pm 4^\circ \text{C}$) e umidade (45,0 – 65,0%) controladas por aparelho central de exaustão, refrigeração e troca de ar, com livre acesso à ração e água. Os experimentos foram realizados em salas diferentes das salas em que os animais eram mantidos, mas com iguais condições às mesmas. Para experimentos comportamentais de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado, os animais eram levados em suas caixas moradia para o local do experimento para habituação, durante 7 dias consecutivos anteriores ao experimento. Para todos os experimentos, os animais foram administrados por via i.p. com salina ou LPS e após 2 horas submetidos aos experimentos. Os animais foram mantidos, manuseados e utilizados de acordo com as normas, preceitos e protocolos relativos ao uso de Animais de Laboratório em Pesquisa do comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil (Protocolo de ética nº 962/2006, aprovado em 13 de setembro de 2006).

4.2 DROGAS E REAGENTES

4.2.1 Drogas

- Cloridrato de Ketamina – anestésico dissociativo utilizado nos procedimentos anestésicos.
- Xilazina – tranqüilizante e relaxante muscular de ação no Sistema Nervoso Central, utilizado nos procedimentos anestésicos.
- Heparina Sódica (Liquemine® 25.000 UI/ 5 mL, Roche) – anticoagulante utilizado na coleta de sangue.

4.2.2 Reagentes

- LPS (lipopolissacarídeo obtido por extração fenólica a partir da *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8, Sigma) estéril, administrado por via i.p., na dose de 200 µg/kg e diluição de 20 µg/mL, num volume em mililitros correspondente a 1% do peso em gramas do animal.
- Cloreto de sódio (NaCl) 0,9% estéril, administrado por via i.p., num volume em mililitros correspondente a 1% do peso em gramas do animal.
- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 – Bactéria marcada com iodeto de propídeo utilizada para avaliar a atividade de neutrófilos sanguíneos (SaPI).
- Cloreto de sódio (NaCl) – utilizada para promover a lise de hemácias, nas diluições de 0,2% e 1,6%.

- Diacetato 2'7' Diclorfluoresceína® (DCFH-DA, Sigma) – corante fluorescente que se conjuga a enzimas citoplasmáticas, utilizado a avaliação do burst oxidativo de neutrófilos sanguíneos.
- EDTA® ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ Sigma) – utilizado na concentração de 3mM para interromper a reação de fagocitose após o período de incubação das amostras.
- PBS (*Phosphate-buffered saline*) – solução tamponada com fosfato, utilizada em todos os procedimentos celulares.

4.3 ESTUDOS NO CAMPO ABERTO E NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Foram avaliados o comportamento de exploração no CA e no LCE. Os animais foram transportados para a sala de experimentação em suas caixas moradias e manipulados durante os 7 dias anteriores ao experimento para habituação. Para minimizar os possíveis efeitos do ciclo circadiano sobre o comportamento, os animais foram submetidos à experimentação alternadamente e durante o mesmo horário (9:00 – 12:00h) do dia. A limpeza do CA e LCE, entre cada experimento, foi realizada com solução de álcool à 5% para minimizar os efeitos do odor de urinas e fezes e do próprio animal sobre os animais subseqüentes.

4.3.1 Medida da atividade geral no Campo Aberto

O campo aberto (CA) é o método mais usual para a observação da atividade exploratória

em animais de laboratório e tem sido usado para a quantificação comportamental dos efeitos de um estresse e da ansiedade (KELLEY, 1993; PALERMO-NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001). Consiste de uma arena circular, (40 cm de diâmetro, 20 cm de altura), dividida virtualmente em três regiões: interna, intermediária e zona tigmotóxica (assim denominada pela preferência dos roedores em se locomover mantendo as vibrissas em contato com uma superfície) (SIMON et al., 1994). A zona tigmotóxica é representada pela região mais externa, portanto, circundada por paredes. O CA encontra-se elevado a uma altura de 60 cm do chão (figura 2)

Os animais foram submetidos ao CA 2 horas após os tratamentos (solução salina ou LPS). Cada camundongo foi introduzido no centro da arena, e seu comportamento foi registrado durante 5 minutos, com auxílio de câmera filmadora posicionada acima do aparelho. A observação e análise foram realizadas em tempo real com auxílio do sistema de análise de imagens computadorizado EthoVision (Noldus Information Technology, Utrecht, The Netherlands), registrando a posição espacial do camundongo. Os parâmetros avaliados foram: distância movida (cm), velocidade média (cm/s), tempo gasto na zona tigmotóxica (s) e o número de entradas na zona tigmotóxica.

Figura 2 – Equipamento de análise comportamental. Em A – A sala de análise comportamental encontra-se isolada do observador. O animal é introduzido no Campo Aberto (a), e filmado através de uma filmadora localizada acima do mesmo (b), a imagem é visualizada em um monitor (c) e os dados são digitalizados para um computador (d). Em B – Representação de um camundongo dentro do Campo Aberto

4.3.2 Medida da ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado

O LCE consiste fisicamente de um labirinto em forma de cruz, elevado a 60 cm do chão, com duas plataformas opostas sem paredes (os braços abertos), de medidas 30 x 5 x 0,25 cm, e duas plataformas opostas com paredes de 20 cm de altura (os braços fechados) com as mesmas medidas, ambas originando em uma plataforma central (figura 3). Este aparelho foi inicialmente validado para drogas ansiolíticas, como os benzodiazepínicos, e ansiogênicas como o petilenotetrazol, cafeína e a anfetamina (PELLOW, 1985).

Logo após o teste de Campo Aberto, cada camundongo foi inicialmente colocado na plataforma central virado para um braço fechado e deixado livre para explorar o ambiente por 5 minutos. As medidas que refletem níveis de ansiedade neste teste são: o percentual de entradas nos braços abertos x braços fechados e o percentual de tempo gasto nos braços abertos x braços

fechados (PELLOW, 1985). Os dados foram analisados usando o mesmo *software* descrito para a análise do campo aberto.

Figura 3 – Labirinto em Cruz elevado em dois ângulos de observação: superior (A) e lateral (B)

4.4 CITOMETRIA DE FLUXO

Um citometro de fluxo (FACSCALIBUR[®], Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) conectado a um computador Macintosh G4 foi utilizado para avaliação de atividade celular (figura 4). Os dados dos eventos foram coletados e analisados pelo software Cell Quest Pro[®] (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

As populações foram identificadas de acordo com suas propriedades de tamanho (*Forward Scatter* - FSC) e complexidade interna (*Side Scatter* - SSC). As fluorescências foram adquiridas em escala logarítmica para a avaliação de atividade celular. A fluorescência do DCFH

foi detectada pelo leitor FL-1 (530 ± 30 nm); e a do iodeto de propídeo; pelo leitor FL-2 (585 ± 42 nm).

As amostras foram analisadas através do programa Cell Quest Pro[®], com a utilização de “gates” que permitam a individualização da população de interesse (neutrófilos sanguíneos) para o estudo, excluindo-se da análise, outros tipos celulares das amostras. Além disso, para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo contendo apenas células, como controle de refração basal da célula a ser analisada.

Figura 4 – Citômetro de fluxo (a), acoplado ao computador Macintosh G4 (b)

4.4.1 Atividade de neutrófilos sanguíneos

Os animais foram anestesiados (com uma solução de ketamina e xilazina) e o sangue da veia cava foi coletado através de agulhas e seringas heparinizadas. Uma amostra de sangue foi utilizada para avaliação da atividade de neutrófilos sanguíneos e o restante foi utilizado para a dosagem de interleucinas plasmáticas. A atividade de neutrófilos sanguíneos foi realizada através

da mensuração da produção de radicais livres de oxigênio para o burst oxidativo e através da fagocitose de bactérias, como proposto por Hasui et al. (1989).

As amostras foram organizadas segundo a seguinte seqüência:

- Tubo A: 100 μ L de sangue total + 1000 μ L de PBS.
- Tubo B: 100 μ L de sangue total + 200 μ L de DCFH-DA + 800 μ L de PBS.
- Tubo C: 100 μ L de sangue total + 200 μ L de DCFH-DA + 50 μ L de SaPI + 750 μ L de PBS.
- Tubo D: 100 μ L de sangue total + 50 μ L de SaPI + 950 μ L de PBS.

Os tubos foram incubados à 37° C durante 30 minutos, e agitados à cada 10 minutos. Ao fim da incubação, adicionou-se 2 mL de EDTA gelado (3mM) em cada tubo, para finalizar o processo de fagocitose. As amostras foram centrifugadas (250 g por 10 minutos) e adicionou-se 2 mL por amostra de NaCl 0,2% para realizar a lise hipo-osmótica das hemácias, e após 20 segundos, o mesmo volume de NaCl 1,6% para restabelecer a isotonicidade. Após nova centrifugação (250 g por 10 minutos) e descartado os sobrenadantes, as células foram ressuspensas em 500 μ L de PBS.

As amostras então foram submetidas ao citômetro de fluxo, e de cada amostra, obteve-se 10.000 eventos dentro de um gate pré-determinado. O burst oxidativo basal foi analisado no tubo B, o burst oxidativo induzido pela bactéria *Staphylococcus aureus* foi analisado no tubo C, a fagocitose foi analisada no tubo D. A análise do burst oxidativo induzido pela bactéria e da fagocitose foram possibilitadas pela individualização da população de neutrófilos e das bactérias. Como as bactérias são morfologicamente distintas de neutrófilos, sua localização no citograma também é diferente. Assim, a fluorescência de neutrófilos que englobaram bactérias não pode ser confundida com a fluorescência de bactérias livres marcadas com iodeto de propídeo. O burst

oxidativo foi avaliado pela média de fluorescência no detector FL-1; e a fagocitose, no detector FL-2. O percentual de fagocitose (percentual de neutrófilos que englobaram bactéria) foi definido por número de neutrófilos com fluorescência detectada por FL-2 dividido pelo número total de neutrófilos (x 100). A intensidade de fagocitose representa quantitativamente a quantidade de bactérias englobadas pelos neutrófilos e também foi avaliada através da intensidade média de fluorescência emitida por essas células.

A figura 5 apresenta citogramas, individualizando populações de leucócitos sanguíneos (A) e as bactérias *S. aureus* marcadas com iodeto de propídeo (B). Mostra também histogramas das fluorescências utilizados para análise de burst oxidativo e fagocitose. A ferramenta para isolar a fluorescência desejada (representada no gráfico como M1) foi utilizada tanto para a análise do burst oxidativo quanto para a fagocitose.

Figura 5 – Representação de citogramas (A e B) e histogramas de burst oxidativo basal (C), induzido por SaPI (E), fluorescência basal (D) e fluorescência após fagocitose (F) obtidos no estudo de atividade de neutrófilos através da citometria de fluxo. Em A – representação de leucócitos sanguíneos e a divisão das populações celulares (R1 = neutrófilos, R2 = linfócitos, R3 = monócitos). Em B – representação da população de neutrófilos (R1) e as bactérias marcadas (SaPI). Em C – representação da intensidade de fluorescência do burst oxidativo basal emitida pelos neutrófilos, analisada em FL-1. Em D – representação da fluorescência basal das células, analisada em FL-2. Em E – representação da intensidade de fluorescência do burst oxidativo após o estímulo com SaPI pelos neutrófilos, analisada em FL-1. Em F – representação da fluorescência dos neutrófilos que englobaram bactérias marcadas com iodeto de propídeo, analisada em FL-2

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Diferentes análises estatísticas foram utilizadas, dependendo da natureza dos resultados. Para comparação entre dois grupos foi utilizado teste T não pareado. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney. Dados contendo um fator foram analisados por ANOVA (análise de variância) de 1 via, seguida pelo teste de comparações múltiplas Tukey-Kramer. Para dados contendo dois fatores (idade e tratamento) foi utilizada ANOVA de 2 vias. Dados não paramétricos com dois fatores foram analisados através do teste de Kruskal Wallis. As análises estatísticas foram realizadas através dos programas estatísticos SigmaStat® 3.0 e GraphPad InStat®. Os gráficos foram obtidos através do programa GraphPad Prism®. A probabilidade $p < 0,05$ foi considerada como capaz de mostrar diferenças significantes em todas as comparações feitas. Os resultados foram apresentados como média e erro padrão da média (EPM) nos gráficos e média e desvio padrão para tabelas.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1: EFEITOS DA IDADE NO PESO RELATIVO DE ADRENAIS, BAÇO E TIMO EM CAMUNDONGOS SENSÍVEIS E RESISTENTES AOS EFEITOS DO LPS

O peso corpóreo, o peso absoluto e relativo (peso do órgão / peso corpóreo x 100) das adrenais, do baço e do timo de camundongos C3H/HePas e C3H/HeJ adultos, de meia idade e idosos foi mensurado. Primeiramente, os camundongos da linhagem C3H/HeJ foram incluídos nesse trabalho para servirem de controle negativo dos animais da linhagem similar não mutante, C3H/HePas, sensível aos efeitos do LPS. Trabalhos anteriores, não publicados, em nosso laboratório, revelaram que animais C3H/HeJ idosos apresentavam alterações comportamentais após administração de LPS. Dessa forma, investigamos se, na dose de 200 µl/kg de LPS poder-se-ia observar alguma alteração fisiológica, comportamental ou imunológica desses animais, em idades mais avançadas.

A figura 6 representa os pesos corpóreos dos animais C3H/HePas e C3H/HeJ. A análise estatística dos dados revelou que há diferenças entre os pesos corpóreos dos animais C3H/HePas de meia idade ($p<0,01$) e idosos ($p<0,01$) quando comparados com adultos, e os animais C3H/HeJ de meia idade ($p<0,001$) quando comparados com adultos.

Figura 6 – Peso corpóreo (g) de animais C3H/HePas e C3H/HeJ adultos, de meia idade e idosos. Os dados são apresentados como média $\pm$ EP. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado com os animais adultos. ANOVA de 1 via

A tabela 1 apresenta os dados dos pesos absolutos das adrenais, baço e timo de camundongos C3H/HePas adultos, de meia idade e idosos tratados com salina ou LPS. Existe diferença estatisticamente significativa entre os pesos absolutos do baço dos animais idosos, tanto tratados com salina ($p < 0,05$) ou LPS ($p < 0,05$), quando comparados com adultos; e entre o peso absoluto do timo de animais idosos tratados com LPS ($p < 0,001$), quando comparado com adultos.

Tabela 1 – Peso absoluto de adrenais, baço e timo de camundongos C3H/HePas adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS

Animal	Controle			LPS		
	Adrenais	Baço	Timo	Adrenais	Baço	Timo
Adulto	0,006 $\pm$ 0,0040	0,09 $\pm$ 0,0181	0,0254 $\pm$ 0,0061	0,004 $\pm$ 0,0020	0,0968 $\pm$ 0,0183	0,0291 $\pm$ 0,0096
MI	0,006 $\pm$ 0,0040	0,13040 $\pm$ 0,0395	0,0197 $\pm$ 0,0111	0,008 $\pm$ 0,0050	0,1322 $\pm$ 0,0397	0,0188 $\pm$ 0,0083
Idoso	0,0045 $\pm$ 0,0032	0,21390 $\pm$ 0,195*	0,0253 $\pm$ 0,0072	0,0087 $\pm$ 0,0092	0,1787 $\pm$ 0,0711*	0,0116 $\pm$ 0,006***

Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparado com os animais adultos. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

A figura 7 mostra os pesos relativos de adrenais, baço e timo de camundongos C3H/HePas adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. Não há diferença significativa com relação aos pesos relativos das adrenais. O peso relativo do baço dos animais idosos tratados com salina é maior do que animais adultos ($p<0,05$). O peso relativo do timo dos animais de meia idade e idosos, ambos tratados com LPS é menor do que animais adultos. $p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente.

Figura 7 – Pesos relativos de adrenais, baço e timo de camundongos C3H/HePas adultos, de meia idade e idosos, tratados com solução salina ou LPS. Os dados são representados como média $\pm$ EP. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ comparado com os animais adultos. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

A tabela 2 mostra os pesos absolutos de adrenais, baço e timo de camundongos C3H/HeJ adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. O peso absoluto do baço de animais de meia idade tratados com LPS é maior do que animais adultos ($p<0,05$). O peso absoluto do timo dos animais idosos tratados com LPS é menor do que animais adultos ($p,0,001$).

Tabela 2 – Peso absoluto de adrenais, baço e timo de camundongos C3H/HeJ adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS

Animal	Controle			LPS		
	Adrenais	Baço	Timo	Adrenais	Baço	Timo
Adulto	0,0047±0,0019	0,0954±0,0321	0,0238±0,0041	0,0062±0,002	0,0905±0,0094	0,0219±0,0087
MI	0,0048±0,0018	0,1104±0,0188	0,0125±0,006	0,00740±0,003	0,1359±0,0285*	0,0135±0,004
Idoso	0,0115±0,0099	0,1392±0,0854	0,0088±0,0033	0,0077±0,0042	0,1215±0,0523	0,0087±0,0024***

Os dados são apresentados como média ± DP. *p<0,05, ***p<0,001 comparado com os animais adultos. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

A figura 8 apresenta os pesos relativos das adrenais, do baço e do timo de camundongos C3H/HeJ adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. A análise estatística dos dados revelou que existe diferença significativa entre o peso relativo do timo dos animais idosos tratados tanto com salina (p<0,05) quanto LPS (p<0,05), com relação a animais adultos, e entre o peso relativo do timo dos animais de meia idade tratados com salina com relação a animais adultos (p<0,05).

Figura 8 – Pesos relativos de adrenais, baço e timo de camundongos C3H/HeJ adultos, de meia idade e idosos, tratados com solução salina ou LPS. Os dados são representados como média $\pm$ EP. * $p < 0,05$ comparado com os animais adultos. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

5.2 EXPERIMENTO 2: EFEITO DO LPS NA INGESTÃO DE ALIMENTOS E NO PESO CORPÓREO DE CAMUNDONGOS ADULTOS, DE MEIA IDADE E IDOSOS, SENSÍVEIS E RESISTENTES AOS EFEITOS DO LPS

A ingestão de alimentos dos animais foi avaliada da seguinte maneira: durante três dias anteriores ao experimento, o consumo de ração da caixa moradia (obtido através da subtração do peso da ração do dia anterior pelo peso da ração do dia em questão) foi mensurado e dividido pelo número de animais na caixa. A média do consumo desses três dias foi padronizada como 100% e será representada como a média do consumo do dia -1. O dia 0 representa o dia do

experimento, em que houve a administração de solução salina 0,9% ou LPS (200µg/kg). O consumo de ração dos 7 dias subseqüentes foi calculado tendo como base essa média.

O peso corpóreo dos animais, da mesma forma, foi mensurado durante três dias anteriores ao experimento, e a média dos pesos durante esses três dias foi utilizada como padrão de 100%. Essa média foi utilizada como a média dos pesos corpóreos do dia -1. O peso corpóreo dos 7 dias subseqüentes também foi calculado baseado nessa média. Da mesma forma, o dia 0 representa o dia do experimento, com administração de salina ou LPS. Após 2 horas das administrações, cada animal foi submetido ao CA e ao LCE, como será descrito no item a seguir.

O consumo de ração e os pesos corpóreos foram analisados sempre no mesmo horário do dia (entre 9:00h e 10:00h).

A figura 9 ilustra o consumo de ração dos animais durante os dias de experimentos. Como o consumo de ração foi realizado em apenas uma caixa por grupo, não foi possível realizar a análise estatística desse resultado. Entretanto, pode-se observar que existe uma queda perceptível no consumo de ração dos camundongos C3H/HePas (os camundongos sensíveis aos efeitos do LPS), principalmente para os animais de meia idade (MI) e idosos. Essa queda, não é perceptível para os animais C3H/HeJ (os animais resistentes aos efeitos do LPS) tratados com LPS, em nenhuma idade.

A - Consumo de ração dos animais C3H/HePas

B - Consumo de ração dos animais C3H/HeJ

Figura 9 – Consumo de ração dos animais C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B). Os dados estão representados como porcentagem. O dia -1 representa a média dos três dias anteriores ao experimento (100%); o dia 0, o dia do experimento; e os dias 1 a 7, os dias subsequentes. Os valores são representados como média. Não há desvio padrão

A figura 10 mostra a porcentagem dos pesos corpóreos dos animais. Os desvios padrão não foram representados na figura para facilitar a visualização. Eles podem ser observados nas tabelas 3 e 4. Com relação aos animais C3H/HePas, o peso corpóreo dos animais de meia idade tratados com LPS foi significativamente menor nos dias 1 ($p < 0,01$), 2 ($p < 0,05$) e 3 ($p < 0,05$), quando comparado com o peso relativo dos animais de meia idade tratados com salina no mesmo dia. O peso corpóreo dos animais idosos tratados com LPS foi menor no dia 1 ($p < 0,05$) em relação aos idosos tratados com salina. Não se demonstrou diferença significativa para o peso

corpóreo dos animais adultos tratados com LPS em nenhum dia após o experimento. Para os animais C3H/HeJ, como esperado, não se observou diferença estatística significativa entre os pesos corpóreos dos animais tratados com salina ou LPS para nenhuma idade.

A – Porcentagem do peso corpóreo dos animais C3H/HePas

B – Porcentagem do peso corpóreo dos animais C3H/HeJ

Figura 10 – Porcentagem dos pesos corpóreos dos animais C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B). O dia -1 representa a média dos três dias anteriores ao experimento (100%); o dia 0, o dia do experimento; e os dias 1 a 7, os dias subsequentes. Os valores são representados como média. Os desvios padrão estão descritos nas tabelas 3 e 4. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

Tabela 3 – Porcentagem dos pesos corpóreos dos animais C3H/HePas tratados com salina ou LPS

Animal/ dia	Controle			LPS		
	Adulto	MI	Idoso	Adulto	MI	Idoso
-1	100%±0,00	100%±0,00	100%±0,00	100%±0,00	100%±0,00	100%±0,00
0	103,39%±0,87	102,80%±1,63	102,36%±2,43	104,47%±1,77	100,51%±1,11	101,96%±2,15
1	100,08%±1,1	100,84%±1,68**	98,42%±3,99*	96,80%±2,95	94,24%±1,72	93,68%±2,51
2	100,53%±1,29	101,56%±1,93*	99,98%±4,73	99,00%±2,94	94,89%±2,29	93,58%±6,79
3	100,44%±2,49	101,31%±1,3*	100,33%±4,76	99,98%±3,78	95,74%±1,47	94,19%±6,44
4	100,01%±2,69	100,87%±2,16	100,66%±4,22	101,64%±2,74	95,94%±1,62	94,67%±6,67
5	100,22%±2,8	100,92%±1,69	99,91%±4,15	101,86%±2,35	95,52%±1,59	95,91%±4,95
6	99,90%±2,68	100,28%±2,28	98,85%±4,18	103,42%±2,72	96,76%±1,95	96,58%±3,66
7	99,95%±2,96	100,75%±1,84	99,00%±4,53	103,87%±2,76	97,42%±1,45	96,37%±2,8

Os dados são apresentados como média ± DP. *p<0,05, **p<0,01 comparado com o dia -1 do mesmo grupo. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

Tabela 4 – Porcentagem dos pesos corpóreos dos animais C3H/HeJ tratados com salina ou LPS

Animal/ dia	Controle			LPS		
	Adulto	MI	Idoso	Adulto	MI	Idoso
-1	100%±0,00	100%±0,00	100%±0,00	100%±0,00	100%±0,00	100%±0,00
0	104,40%±4,51	100,96%±1,16	101,44%±1,53	100,87%±1,33	100,35%±1,37	101,97%±1,21
1	102,36%±5,71	99,66%±1,41	100,24%±2,22	100,91%±1,16	100,09%±1,28	103,01%±1,78
2	103,13%±5,33	99,70%±1,27	99,68%±2,67	101,29%±0,25	99,83%±0,78	102,80%±2,28
3	103,39%±5,5	100,18%±1,27	99,23%±2,6	98,26%±1,46	100,36%±1,02	102,07%±5,2
4	102,46%±5,98	99,65%±0,72	100,70%±3,59	99,38%±0,88	100,52%±2,13	101,53%±2,9
5	103,99%±5,1	99,20%±1,07	99,36%±4,24	97,69%±2,25	99,83%±1,5	100,86%±4,38
6	102,06%±6,64	97,14%±1,42	99,67%±5,33	99,78%±2,35	98,09%±1,57	99,80%±5,4
7	101,99%±6,61	97,49%±0,49	96,18%±8,44	99,60%±1,62	99,62%±1,57	95,96%±8,09

Os dados são apresentados como média ± DP. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

5.3 EXPERIMENTO 3: EFEITO DO LPS NA ATIVIDADE GERAL DE CAMUNDONGOS ADULTOS, DE MEIA IDADE E IDOSOS, SENSÍVEIS E RESISTENTES AOS EFEITOS DO LPS

Como já relatado, a medida da atividade geral em CA pode ser realizada para se estudar o comportamento doentio em roedores de laboratório. Animais sob comportamento doentio apresentam menor atividade geral, expressa por menor locomoção geral. Nesse sentido, o objetivo desse experimento foi avaliar a distância total percorrida e a velocidade média de deambulação por animais em diferentes idades, sob os efeitos do LPS. O tempo gasto na zona tigmotóxica e o número de entradas nessa mesma região também foram analisados, já que esses dados podem inferir estados de ansiedade dos animais e recentemente, Swiergiel e Dunn propuseram que o LPS, assim como infecções poderiam alterar estados emocionais de camundongos. (SWIERGIEL, DUNN; 2007). Por fim, a análise do número de vezes que os animais levantaram no Campo Aberto também foi realizada, para inferir dados de exploração desses animais. Para esse experimento, foram utilizados os seguintes números de animais: C3H/HePas adultos - 22 tratados com salina e 18 tratados com LPS, C3H/HePas de meia idade – 12 salina e 10 LPS, C3H/HePas idosos – 12 salina e 9 LPS; C3H/HeJ adultos – 13 tratados com salina e 13 tratados com LPS, C3H/HeJ de meia idade – 7 salina e 8 LPS, C3H/HeJ idosos – 10 salina e 8 LPS.

A figura 11 ilustra a média da distância movida total, em centímetros, no CA de animais C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B). A análise estatística dos dados revelou que, nos camundongos C3H/HePas existe uma queda na locomoção dos animais idosos ($p < 0,05$), comparados aos adultos, resultado já esperado (NELSON et al., 1999). O LPS diminuiu a distância movida total nos animais adultos ($p < 0,001$) e, em menor intensidade, nos animais de meia idade ($p < 0,05$).

Animais idosos tratados com LPS mantiveram o mesmo padrão de distância movida. Para os animais C3H/HeJ, não houve diferença estatisticamente significativa para ambos fatores: idade e tratamento.

Figura 11 – Média da distância movida total no CA, em centímetros, de camundongos C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B), adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. A linha tracejada mostra diferença com relação à idade; as linhas cheias, ao tratamento. Os dados são representados como média $\pm$ EP. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

A figura 12 mostra os resultados da velocidade média de deambulação (cm/s) no CA dos animais C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B). Assim como os resultados de distância movida, a velocidade média dos animais C3H/HePas idosos é menor ($p < 0,05$) do que adultos, e a velocidade média dos animais adultos tratados com LPS também diminuiu nos animais adultos ($p < 0,001$), assim como dos animais de meia idade ($p < 0,01$). Da mesma forma, não houve diferenças para os animais C3H/HeJ.

Figura 12 – Velocidade média de deambulação no CA, em centímetros por segundos, de camundongos C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B), adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. A linha tracejada mostra diferença com relação à idade; as linhas cheias, ao tratamento. Os dados são representados como média $\pm$ EP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

A figura 13 apresenta os dados de número de entradas na zona tigmotóxica do CA dos animais C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B). Para os camundongos C3H/HePas, animais idosos apresentaram menor número de entradas nessa zona ($p < 0,001$) do que animais adultos. O tratamento com LPS reduziu o número de entradas nos adultos ($p < 0,001$) e animais de meia idade ($p < 0,01$). Com relação aos animais C3H/HeJ, apesar de haver um aumento no número de entradas nessa zona nos animais de meia idade, não houve diferenças estatísticas significantes.

Figura 13 – Número de entradas na zona tigmotóxica do CA de camundongos C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B), adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. A linha tracejada mostra diferença com relação à idade; as linhas cheias, ao tratamento. Os dados são representados como média $\pm$ EP. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

A figura 14 mostra os dados do tempo, em segundos, em que os animais permaneceram na zona tigmotóxica do CA. Como o tratamento com LPS diminui a deambulação dos animais, o tempo gasto na zona tigmotóxica, associado ao número de entradas na mesma região, representa um resultado importante para avaliar possíveis alterações de ansiedade desses animais no CA. A análise estatística dos dados revelou que não houve diferenças no tempo gasto na zona tigmotóxica, tanto para animais C3H/HePas, quanto C3H/HeJ. Portanto, as reduções no número de entradas nessa zona provocadas pelo LPS para animais C3H/HePas adultos e de meia idade, provavelmente se devem à menor locomoção induzida pelo LPS, e não a um efeito ansiolítico.

Figura 14 – Tempo gasto na zona tigmotóxica do CA, em segundos, de camundongos C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B), adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. Os dados são representados como média $\pm$ EP. Kruskal Wallis

Como podemos observar na figura 15, o número de vezes que os animais levantaram foi reduzido após tratamento com LPS apenas nos animais adultos C3H/HePas. $P < 0,05$.

Figura 15 – Número de levantar no CA, de camundongos C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B), adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. A linha tracejada mostra diferença com relação à idade. Os dados são representados como média $\pm$ EP. ** $p < 0,01$. Os dados são representados como média $\pm$ EP. Kruskal Wallis

5.4 EXPERIMENTO 4: EFEITO DO LPS NOS NÍVEIS DE ANSIEDADE DE CAMUNDONGOS ADULTOS, DE MEIA IDADE E IDOSOS, SENSÍVEIS E RESISTENTES AOS EFEITOS DO LPS

O LCE foi primeiramente validado para avaliação de fármacos ansiolíticos e ansiogênicos. Posteriormente, também teve aplicação na avaliação dos estados de ansiedade de animais de laboratório. Para avaliar os efeitos do LPS na ansiedade dos animais, utilizou-se os parâmetros: número de entradas nos braços abertos, nos fechados e em ambos, o tempo gasto nos braços abertos e nos fechados, e a porcentagem de entradas nos braços abertos. Avaliou-se ainda o número de entradas na plataforma central, o número de levantar no LCE, a distância movida, em centímetros, e a velocidade média, em centímetros por segundo, dos animais no LCE. Logo após a avaliação no CA, os mesmos animais foram submetidos ao LCE.

A figura 16 ilustra o número de entradas nos braços abertos, o número de entradas nos braços fechados e o número de entradas totais (abertos + fechados) dos animais C3H/HePas (A, C, E) e C3H/HeJ (B, D, F). Com relação aos animais C3H/HePas, houve um menor número de

entradas nos braços abertos dos animais de meia idade ($p < 0,05$), quando comparados com adultos, basalmente. O tratamento com LPS diminuiu o número de entradas nos braços abertos apenas dos animais adultos ($p < 0,05$). Já, o número de entradas nos braços fechados e o número de entradas totais foram reduzidos pelo tratamento de LPS nos animais adultos ($p < 0,001$ n° entradas fechados / $p < 0,001$ n° entradas totais) e nos animais de meia idade ($p < 0,01$ n° entradas fechados / $p < 0,05$ n° entradas totais). Não houve nenhuma diferença estatística significativa para os animais C3H/HeJ.

Figura 16 – Número de entradas nos braços abertos (A, B), nos braços fechados (C, D) e número de entradas totais = abertos + fechados (E, F) dos animais C3H/HePas e C3H/HeJ, adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. A linha tracejada mostra diferença com relação à idade; as linhas cheias, ao tratamento. Os dados são representados como média $\pm$ EP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

A figura 17 mostra o tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos e nos braços fechados. Com relação aos braços abertos, a análise estatística revelou que animais C3H/HePas de meia idade apresentaram menor tempo gasto nos braços abertos ($p < 0,01$) do que

adultos, basalmente. Nenhuma outra diferença estatística foi encontrada. Nos braços fechados, o tratamento com LPS aumento o tempo gasto nesses braços dos animais adultos C3H/HePas. Nenhuma outra diferença foi observada.

Figura 17 – Tempo de permanência nos braços abertos (A, B), nos braços fechados (C, D) dos animais C3H/HePas e C3H/HeJ, adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. A linha tracejada mostra diferença com relação à idade; a linha cheia, ao tratamento. Os dados são representados como média $\pm$ EP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

A figura 18 representa a porcentagem de entrada nos braços abertos, calculada da seguinte forma: número de entradas nos braços abertos / número de entradas totais $\times 100$. Em relação aos animais C3H/HePas, animais de meia idade tratados com LPS apresentaram menor porcentagem de entradas nos braços abertos ($p < 0,05$) do que animais adultos também tratados com LPS. Com relação aos animais C3H/HeJ, animais de meia idade apresentaram menor porcentagem ($p < 0,05$)

com relação aos animais adultos, basalmente (tratados com salina). Ainda nos animais de meia idade, o tratamento com LPS aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos ($p<0,05$).

Figura 18 – Porcentagem de entrada nos braços abertos do LCE dos animais C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B), adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. As linhas tracejadas mostram diferença com relação à idade; a linha cheia, ao tratamento. Os dados são representados como média $\pm$ EP. * $p<0,05$. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

A figura 19 mostra os resultados do número de entradas na plataforma central. Assim como o número de entradas nos braços abertos + fechados, o número de entradas na plataforma central pode inferir a exploração dos animais no LCE. De forma semelhante aos resultados do número de entradas totais, o tratamento com LPS diminuiu o número de entradas na plataforma central dos animais C3H/HePas adultos ($p<0,001$) e de meia idade ($p<0,05$), mas não dos idosos. Não houve diferenças para os animais C3H/HeJ.

Figura 19 – Número de entradas na plataforma central do LCE dos animais C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B), adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. As linhas cheia mostram diferença com relação ao tratamento. Os dados são representados como média $\pm$ EP. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

Como pode ser observado na figura 20, da mesma forma que no CA, o número de levantar dos animais C3H/HePas adultos tratados com LPS diminuiu significativamente ($p < 0,001$) no LCE. Outras diferenças não foram observadas, tanto nos camundongos C3H/HePas, quanto nos C3H/HeJ.

Figura 20 – Número de levantar no LCE, de camundongos C3H/HePas (A) e C3H/HeJ (B), adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. A linha tracejada mostra diferença com relação à idade. Os dados são representados como média $\pm$ EP. *** $p < 0,001$. Os dados são representados como média $\pm$ EP. Kruskal Wallis

A figura 21 mostra os resultados da distância média movida, em centímetros, e a velocidade média de movimentação, em centímetros por segundo, no LCE. Animais C3H/HePas

de meia idade ($p<0,001$) e idosos ($p<0,05$) apresentaram menor distância movida e velocidade média no LCE em relação aos animais adultos, basalmente. O tratamento com LPS, diferente do que ocorreu no CA, reduziu a distância movida e a velocidade média em animais C3H/HePas de todas as idades ($p<0,001$ para todos). Nenhuma diferença foi observada para os animais C3H/HeJ.

Figura 21 – Distância movida (cm) (A, B) e velocidade média (cm/s) (C, D) no LCE dos animais C3H/HePas e C3H/HeJ, adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. As linhas tracejadas mostram diferença com relação à idade; as linhas cheias, ao tratamento. Os dados são representados como média $\pm$ EP. * $p<0,05$, *** $p<0,001$. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

Como os resultados de distância movida e velocidade média dos animais idosos C3H/HePas no CA diferiram dos de LCE, realizou-se uma análise desses mesmos parâmetros em diferentes intervalos de tempos, na tentativa de observar em que momento a distância movida dos animais idosos começa a declinar. Dessa forma, esse dado foi analisado à cada minuto no CA e

LCE. As figuras 22 e 23 ilustram a distância movida, fracionada em minutos, no CA e LCE, respectivamente, em animais C3H/HePas e C3H/HeJ separados por idade: adultos, meia idade e idosos.

A figura 22 mostra a distância movida fracionada em minutos no CA de animais C3H/HePas e C3H/HeJ adultos, de meia idade e idosos. Nos animais C3H/HePas adultos, o LPS reduziu a distância movida em todos intervalos de tempo; nos de meia idade, apenas nos intervalos 0-1 e 3-4; nos idosos, não houve diferença em nenhum intervalo de tempo. Não houve diferenças estatísticas significantes em nenhuma idade nos animais C3H/HeJ.

Figura 22 – Distância movida (cm) no CA fracionada em minutos dos animais C3H/HePas e C3H/HeJ, adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. Os dados são representados como média $\pm$ EP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Teste t não pareado para dados paramétricos e Mann-Whitney para dados não paramétricos

Da mesma forma, a distância movida, em intervalos de tempo foi analisado para os resultados de LCE. Como pode ser visto na figura 23, semelhante ao CA, animais C3H/HePas adultos, tratados com LPS apresentaram redução da distância movida em todos os intervalos de tempo. Já, animais C3H/HePas de meia idade e idosos, tratados com LPS apresentaram queda na distância movida em todos os intervalos de tempo. Ainda, a redução da distância nos animais idosos sob efeito do LPS foi gradual, sendo menor no intervalo de 0-1 minuto e maior na última fração de tempo (4-5 minutos). Com relação à linhagem C3H/HeJ, houve diferença apenas para os animais idosos tratados com LPS, mas no sentido inverso: no intervalo de tempo 2-3 minutos, esses animais apresentaram maior distância movida do que seus controles ($p < 0,05$).

Figura 23 – Distância movida (cm) no LCE fracionada em minutos dos animais C3H/HePas e C3H/HeJ, adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. Os dados são representados como média $\pm$ EP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Teste t não pareado para dados paramétricos e Mann-Whitney para dados não paramétricos

5.5 EXPERIMENTO 5: EFEITO DO LPS NA FAGOCITOSE E NO BURST OXIDATIVO DE NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS DE CAMUNDONGOS ADULTOS, DE MEIA IDADE E IDOSOS, SENSÍVEIS E RESISTENTES AOS EFEITOS DO LPS.

Nesse experimento, analisamos a fagocitose (através da quantificação de fluorescência detectada em FL-2, emitida pelas células após englobarem bactérias) e a capacidade de destruição de bactérias, avaliada pelo burst oxidativo (a produção de radicais livres de oxigênio, detectada pela fluorescência em FL-1) de neutrófilos sanguíneos de animais C3H/HePas e C3H/HeJ, tratados com salina ou LPS nas diferentes idades.

Como pode ser visto na figura 24 (A e B), tanto para a linhagem C3H/HePas, quanto para a C3H/HeJ, animais idosos tratados com LPS apresentaram maior intensidade de fagocitose pelos neutrófilos (representada qualitativamente pela intensidade de fluorescência em FL-2) do que animais adultos também tratados com LPS ($p < 0,05$). Como os experimentos para cada linhagem foram realizados em dias diferentes e a intensidade de fluorescência depende da SaPI e da calibração utilizadas no dia do experimento, as escalas dos gráficos são diferentes. As figuras C e D mostram a porcentagem de neutrófilos que realizaram fagocitose, ou seja, os neutrófilos responsáveis pelas intensidades de fluorescências apresentadas nos gráficos A e B. Animais C3H/HePas idosos, tratados com LPS, apresentaram maior porcentagem de neutrófilos realizando fagocitose do que adultos, também sob tratamento de LPS ($p < 0,05$). Nenhuma diferença foi observada para animais C3H/HeJ.

Figura 24 – Intensidade de fagocitose e porcentagem de fagocitose dos animais C3H/HePas e C3H/HeJ, adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. Os dados são representados como média $\pm$ EP. * $p < 0,05$. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

A figura 25 ilustra a intensidade de burst oxidativo (avaliada qualitativamente pela fluorescência em FL-1) realizado por neutrófilos sanguíneos. As figuras A e B mostram a intensidade de burst oxidativo basal. As figuras C e D, a intensidade do burst oxidativo induzido pela bactéria *Staphylococcus aureus* marcada com iodeto de propídeo. E as figuras E e F, a porcentagem de aumento do burst oxidativo, calculada como: $(\text{Intensidade de burst oxidativo induzido por SaPI} \times 100 / \text{Intensidade de burst oxidativo basal}) - 100$. Dessa forma, o burst oxidativo basal foi considerado como 100%. A intensidade de burst oxidativo basal foi semelhante em todos os animais C3H/HePas, assim como para os animais C3H/HeJ. O burst

oxidativo induzido por SaPI e a porcentagem de aumento do burst foram maior nos animais idosos C3H/HePas tratados com salina ($p<0,05$), com relação aos adultos controle. A porcentagem de aumento nos animais C3H/HeJ de meia idade tratados com LPS foi maior com relação aos animais de meia idade controle ($p<0,001$) e aos animais adultos tratados com LPS ($p<0,001$).

Figura 25 – Burst oxidativo basal (A, B), Burst oxidativo induzido por SaPI (C e D) e Porcentagem de aumento da intensidade de burst (E e F) dos animais C3H/HePas e C3H/HeJ, adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. As linhas tracejadas mostram diferença com relação à idade; a linha cheia, ao tratamento. Os dados são representados como média $\pm$ EP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

A figura 26 ilustra a porcentagem de neutrófilos sanguíneos realizando burst oxidativo basal (A e B), burst oxidativo induzido por SaPI (C e D) e a porcentagem de neutrófilos estimulados por SaPi, que foi calculado da seguinte forma: $(\text{Porcentagem de neutrófilos realizando burst oxidativo induzido por SaPI} \times 100 / \text{Porcentagem de neutrófilos realizando burst oxidativo basal}) - 100$. Portanto, a porcentagem de neutrófilos realizando burst oxidativo basal foi estabelecida como 100%.

A – Porcentagem de burst oxidativo basal

B – Porcentagem de burst oxidativo basal

C – % de burst induzido por SaPI

D – % de burst induzido por SaPI

E – % de neutrófilos estimulados por SaPI

F – % de neutrófilos estimulados por SaPI

Figura 26 – Porcentagem de neutrófilos realizando burst oxidativo basal (A e B), Porcentagem de neutrófilos realizando burst oxidativo induzido por SaPI (C e D), e Porcentagem de neutrófilos estimulados por SaPI (E e F) dos animais C3H/HePas e C3H/HeJ, adultos, de meia idade e idosos, tratados com salina ou LPS. As linhas tracejadas mostram diferença com relação à idade; a linha cheia, ao tratamento. Os dados são representados como média $\pm$ EP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ANOVA de 2 vias seguida do teste de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal Wallis para dados não paramétricos

Os resultados de comportamento no Campo Aberto e no Labirinto em Cruz Elevado e de citometria para cada linhagem são apresentados em forma resumida nas tabelas 5, 6, 7, e 8.

Tabela 5 – Resumo dos resultados em Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado. Efeitos da idade e do tratamento. Camundongos C3H/HePas.

Parâmetro	Estatística	Interação idade x tratamento	Idade				Tratamento		
			MI		Idoso		Adulto	MI	Idoso
			Sal	LPS	Sal	LPS			
Dist. Mov. CA	ANOVA	sim*	-	-	↓	-	↓↓↓	↓	-
Veloc Méd. CA	ANOVA	sim*	-	-	↓	-	↓↓↓	↓↓	-
n° ent tigno	ANOVA	sim **			↓↓↓		↓↓↓	↓↓	-
Tempo gasto tigno	KW	-	-	-	-	-	-	-	-
n° ent tigno	ANOVA	sim **			↓↓↓		↓↓↓	↓↓	-
n° levantar CA	KW	-	-	-	-	-	↓↓	-	-
n° ent abertos PM	KW	-	↓	-	-	-	↓	-	-
n° ent fechados PM	KW	-	-	-	-	-	↓↓↓	↓↓	-
n° ent totais PM	KW	-	-	-	-	-	↓↓↓	↓	-
Temp gasto ab	KW	-	↓↓	-	-	-	-	-	-
Temp gasto fech	KW	-	-	-	-	-	↑	-	-
% ent ab	KW	-	-	-	↓	-	-	-	-
n° ent central PM	KW	-	-	-	-	-	↓↓↓	↓	-
n° levantar PM	KW	-	-	-	-	-	↓↓↓	-	-
Dist Mov PM	ANOVA	não	↓↓↓	-	↓	-	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
Veloc Méd. PM	ANOVA	não	↓↓↓	-	↓	-	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓

Os dados são apresentados como efeitos do tratamento e da idade em cada parâmetro avaliado. Os efeitos da idade são apresentados em relação aos animais adultos, segundo o tratamento (Sal = salina ou LPS). Os efeitos do tratamento são apresentados em relação aos animais controle da mesma idade. Os resultados foram analisados através de ANOVA de 2 vias (ANOVA) ou Kruskal Wallis (KW).

*p<0,05, **p<0,01: interação entre os fatores idade e tratamento. ↓p<0,05, ↓↓p<0,01, ↓↓↓p<0,001. ↑p<0,05

Tabela 6 – Resumo dos resultados de citometria. Efeitos da idade e do tratamento. Camundongos C3H/HePas.

Parâmetro	Estatística	Interação idade x tratamento	Idade				Tratamento		
			MI		Idoso		Adulto	MI	Idoso
			Sal	LPS	Sal	LPS			
Int fagocitose	KW	-	-	-	-	↑	-	-	-
% fagocitose	ANOVA	não	-	-	-	↑	-	-	-
Int burst basal	ANOVA	não	-	-	-	-	-	-	-
Int burst SaPI	ANOVA	não	-	-	↑	-	-	-	-
Aumento int burst	ANOVA	não	-	-	↑	-	-	-	-
% burst basal	KW	-	-	-	-	-	-	-	-
% burst SaPI	ANOVA	não	-	↑	↑	↑↑↑	-	-	-
Aumento % burst	KW	-	-	-	-	-	-	-	-
% neutrófilos sang	KW	-	-	-	-	-	↓	-	-

Os dados são apresentados como efeitos do tratamento e da idade em cada parâmetro avaliado. Os efeitos da idade são apresentados em relação aos animais adultos, segundo o tratamento (Sal = salina ou LPS). Os efeitos do tratamento são apresentados em relação aos animais controle da mesma idade. Os resultados foram analisados através de ANOVA de 2 vias (ANOVA) ou Kruskal Wallis (KW).
 ↓p<0,05. ↑p<0,05, ↑↑↑ p<0,001

Tabela 7 – Resumo dos resultados em Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado. Efeitos da idade e do tratamento. Camundongos C3H/HeJ.

Parâmetro	Estatística	Interação idade x tratamento	Idade				Tratamento		
			MI		Idoso		Adulto	MI	Idoso
			Sal	LPS	Sal	LPS			
Dist. Mov. CA	KW	-	-	-	-	-	-	-	-
Veloc Méd. CA	KW	-	-	-	-	-	-	-	-
n° ent tigma	KW	-	-	-	-	-	-	-	-
Tempo gasto tigma	KW	-	-	-	-	-	-	-	-
n° levantar CA	KW	-	-	-	-	-	-	-	-
n° ent abertos PM	ANOVA	não	-	-	-	-	-	-	-
n° ent fechados PM	ANOVA	não	-	-	-	-	-	-	-
n° ent totais PM	ANOVA	não	-	-	-	-	-	-	-
Temp gasto ab	ANOVA	não	-	-	-	-	-	-	-
Temp gasto fech	KW	-	-	-	-	-	-	-	-
% ent ab	ANOVA	não	↓	-	-	-	-	↑	-
n° ent central PM	ANOVA	não	-	-	-	-	-	-	-
n° levantar PM	KW	-	-	-	-	-	-	-	-
Dist Mov PM	ANOVA	não	-	-	-	-	-	-	-
Veloc Méd. PM	ANOVA	não	-	-	-	-	-	-	-

Os dados são apresentados como efeitos do tratamento e da idade em cada parâmetro avaliado. Os efeitos da idade são apresentados em relação aos animais adultos, segundo o tratamento (Sal = salina ou LPS). Os efeitos do tratamento são apresentados em relação aos animais controle da mesma idade. Os resultados foram analisados através de ANOVA de 2 vias (ANOVA) ou Kruskal Wallis (KW).

↓p<0,05.↑p<0,05

Tabela 8 – Resumo dos resultados de citometria. Efeitos da idade e do tratamento. Camundongos C3H/HeJ.

Parâmetro	Estatística	Interação idade x tratamento	Idade				Tratamento		
			MI		Idoso		Adulto	MI	Idoso
			Sal	LPS	Sal	LPS			
Int fagocitose	ANOVA	não	-	-	-	↑	-	-	-
% fagocitose	KW	-	-	-	-	-	-	-	-
Int burst basal	KW	-	-	-	-	-	-	-	-
Int burst SaPI	ANOVA	não	-	-	-	-	-	-	-
Aumento int burst	ANOVA	sim**	-	↑↑↑	-	-	-	↑↑↑	-
% burst basal	KW	-	-	-	-	-	-	-	-
% burst SaPI	KW	-	-	-	-	-	-	-	-
Aumento % burst	KW	-	-	-	-	-	-	-	-
% neutrófilos sang	ANOVA	não	↑	-	-	-	↑	-	-

Os dados são apresentados como efeitos do tratamento e da idade em cada parâmetro avaliado. Os efeitos da idade são apresentados em relação aos animais adultos, segundo o tratamento (Sal = salina ou LPS). Os efeitos do tratamento são apresentados em relação aos animais controle da mesma idade. Os resultados foram analisados através de ANOVA de 2 vias (ANOVA) ou Kruskal Wallis (KW)

**p<0,01: interação entre os fatores idade e tratamento. ↑ p<0,05, ↑↑↑ p<0,001

6 DISCUSSÃO

Através dos experimentos realizados, objetivamos estudar a expressão do comportamento doentio e as funções de neutrófilos sanguíneos de camundongos idosos da linhagem C3H/HePas. Incluímos nos experimentos a linhagem C3H/HeJ, resistente aos efeitos do LPS, devido à uma mutação no gene que codifica o receptor TLR4, sendo portanto incapaz de produzir interleucinas pró-inflamatórias frente ao estímulo do LPS. Os camundongos C3H/HeJ, foram adicionados inicialmente como uma forma de controle negativo dos animais C3H/HePas. Acreditamos que também seria importante estudar as respostas de animais de meia idade ao LPS, pois alguns fenômenos poderiam não se apresentar de forma linear durante o processo de envelhecimento. Muitas vezes durante essa discussão, camundongos C3H/HePas não terão sua linhagem especificada, enquanto que camundongos C3H/HeJ sempre serão denominados como tal.

6.1 PESOS

O envelhecimento está associado a um acúmulo de gordura em vísceras que parece ter relação com um aumento de resistência à insulina (BARBIERI et al., 2001). Em nossos experimentos, camundongos idosos e de meia idade da linhagem C3H/HePas apresentaram maior peso corpóreo do que adultos. Para a linhagem C3H/HeJ, isso ocorreu nos animais de meia idade. Wirth-Dzieciolowska e Czumincka (2000) demonstraram a evolução dos pesos corpóreos e a longevidade em linhagens de camundongos pesados ou leves. Em ambas linhagens, havia um progressivo aumento do peso corpóreo com a idade, e a partir de aproximadamente 14 a 16 meses

os animais começavam a apresentar perda de peso (Wirth-Dzieciolowska, Czuminaka, 2000). Da mesma forma, ratos Fischer 344 idosos apresentaram maior peso corpóreo do que adultos, sendo que o peso relativo da gordura corpórea era maior nos ratos idosos (SCHOEFFNER et al., 1999). Assim, nossos dados são semelhantes aos obtidos por esses trabalhos.

O peso relativo do baço dos animais C3H/HePas idosos tratados com salina foi maior do que de animais adultos; nos animais tratados com LPS ele também foi maior, embora não significante estatisticamente. Não sabemos se o LPS poderia induzir à uma contração do baço nesses animais. Schoeffer et al. (1999), além de observarem os pesos corpóreos de ratos em diferentes idades, também avaliaram a influência da idade no peso relativo de vários órgãos. Dos órgãos avaliados (fígado, baço, estômago, intestino delgado, intestino grosso, rins, coração, pulmões e cérebro) apenas o baço apresentava aumento do peso relativo com o avançar da idade (SCHOEFFNER et al., 1999). De forma semelhante, em um estudo sobre a exposição crônica a um poluente ambiental, camundongos fêmeas C57Bl/6 do grupo controle apresentaram aumento significativo do peso do baço com o avançar da idade, embora não tenha sido analisado o peso relativo (OUGHTON et al., 1995). Outros estudos também demonstraram hipertrofia do baço em ratos idosos (PAPET et al., 2003). Entretanto, apesar do aumento do tamanho baço com a idade, ratos idosos apresentaram redução de 80% do número de linfócitos na polpa branca do baço, associada a aumento da quantidade de células reticulares, células do estroma e macrófagos nessa região. Ainda, estudos em baço de ratos idosos demonstraram redução dos centros germinativos desse órgão (CHEUNG, NADAKAVUKAREN, 1983; GRUVER, HUDSON, SEMPOWSKI, 2007). Dessa maneira, o aumento anatômico do baço não é acompanhado por aumento de celularidade nesse órgão. Além da diminuição da celularidade, também existem alterações dos tipos celulares constituintes do baço de camundongos idosos (CONNOY, TRADER, HIGH,

2006), que parecem refletir as alterações dos linfócitos T e B na periferia, representadas principalmente por redução de linfócitos naive (GRUVER, HUDSON, SEMPOWSKI, 2007).

Já, camundongos C3H/HeJ idosos não apresentaram aumento do peso relativo do baço. Não encontramos trabalhos sobre alterações esplênicas em camundongos idosos dessa linhagem. Como a ligação do LPS ao TLR4, na via que depende de MyD88, estimula a proliferação de esplenócitos (HOSHINO et al., 1999; YAMAMOTO, TAKEDA, AKIRA, 2004) acreditamos que a mutação do gene que codifica o TLR4 possa influenciar na ausência de hipertrofia do baço ao longo da vida desses animais.

A atrofia tímica é bem documentada como uma decorrência do envelhecimento, e parece ser o fator mais importante para o declínio da função de linfócitos T, já que é acompanhada de redução de populações de linfócitos T naive. A atrofia tímica ocorre principalmente na região de timopoiese (responsável pela diminuição de geração de novos linfócitos T naive), com conseqüente aumento relativo de regiões não destinadas à timopoiese, como tecido adiposo e células estromais (GRUVER, HUDSON, SEMPOWSKI, 2007). A redução na quantidade de linfócitos T progenitores ou do tecido epitelial tímico, o déficit na capacidade de rearranjar os genes que codificam para o complexo de receptor antigênico (TCR) e alterações do micro-ambiente do timo, com redução de fatores de crescimentos, hormônios e citocinas, como a IL-7 parecem estar relacionados à involução tímica (GRUVER, HUDSON, SEMPOWSKI, 2007). Fatores hormonais extrínsecos ao órgão também parecem influenciar sua função: hormônios hipofisários (como hormônio de crescimento e prolactina), glicocorticóides, hormônios tireoidianos e hormônios gonadais como LHRH (hormônio liberador de hormônio luteinizante) (MOSLEY, 1996).

Nossos experimentos demonstraram que houve uma redução do peso relativo do timo em camundongos idosos. Essa diferença não foi observada para animais C3H/HePas tratados com

salina (como pode ser observado na figura 7), entretanto, acreditamos que se deva à diferenças na coleta, já que os timos desses camundongos idosos apresentavam-se visualmente reduzidos, e a coleta desse órgão em todos os camundongos idosos demonstrou-se sempre mais trabalhosa do que nos adultos.

O peso relativo das adrenais não apresentou diferenças relacionadas à idade significativas. Existem muitos trabalhos contraditórios com relação aos níveis de glicocorticóides durante o envelhecimento; há relatos tanto de aumento (SAPOLSKY et al., 1985), quanto de diminuição desses níveis (MOSLEY, 1996). Entretanto, a consideração de que estímulos estressores em animais e humanos idosos acarretam em prejuízos maiores ao sistema imunológico, através de menor resposta a microrganismo e desbalanço da produção de citocinas, parece ser bem aceita (KOVACS, PLACKETT, WITTE, 2004; BUTCHER, LORD, 2004).

A diminuição de celularidade tanto do baço, quanto do timo, são relatadas freqüentemente em animais e humanos idosos e parecem participar das múltiplas alterações relacionadas ao envelhecimento. A diminuição da função de linfócitos B e T parecem estar relacionadas à maior probabilidade de desenvolvimento de neoplasias. Além disso, a diminuição de linfócitos B e T naive dificultam a resposta a novos antígenos e, em humanos, o desenvolvimento de vacinas para indivíduos idosos.

6.2 COMPORTAMENTO DOENTIO

Os comportamentos associados à doença incluem várias alterações como diminuição da ingestão de alimento, da locomoção, da exploração ambiental e social, da auto-limpeza, anedonia e alteração dos padrões de sono. Em 1989, Hart definiu essas alterações como comportamento

doentio. Em nossos experimentos, avaliamos o comportamento doentio através da mensuração da ingestão de alimentos e através dos aparatos comportamentais Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado. Animais sob comportamento doentio, quando submetidos ao Campo Aberto apresentam diminuição da atividade locomotora (YIRMIYA et al., 1994). Recentemente, Swiergiel e Dunn (2007), através de experimentos nesses mesmos aparatos, sugeriram cuidadosamente que administrações de IL-1 β e LPS poderiam induzir a um maior estado de ansiedade de camundongos. Dessa forma, objetivávamos estudar se o LPS também poderia provocar ansiedade em camundongos idosos. Além dessas análises, o peso corpóreo também foi avaliado, como uma medida indireta do comportamento doentio, lembrando que a anorexia é influenciada tanto por alterações centrais, quanto por mecanismos periféricos (KENT et al., 1992; BERKOWITZ et al., 1998).

Em nossos experimentos, animais C3H/HePas de diferentes idades (adultos, de meia idade e idosos) apresentaram redução da ingestão de alimentos, embora a análise estatística desses dados não pôde ser realizada, já que, devido ao número restrito de animais, esse experimento foi realizado em apenas uma caixa para cada grupo de animais de meia idade e idosos. A ingestão de ração de animais adultos tratados com LPS 24 horas após a administração de LPS foi de 62,3%; a de animais de meia idade, 23,6%; e a de idosos, 24,9%. Animais tratados com salina apresentaram consumo de 109,7% (adultos), 102,3% (meia idade) e 94,2% (idosos). Portanto, a queda da ingestão de ração para os animais tratados com LPS, após 24 horas, foi de aproximadamente 43,21% para animais adultos, 76,93% para animais de meia idade, e 73,57% para animais idosos. Já, animais C3H/HeJ tratados com LPS apresentaram consumo semelhante aos animais controle, sendo que animais adultos sob tratamento de LPS apresentaram aumento no consumo de ração de 21,14%; de meia idade, de 4,79%; e idosos, de 18,39%.

Animais C3H/HePas de meia idade e idosos apresentaram redução significativa da massa corpórea 24 horas após tratamento com LPS. Animais adultos tratados com LPS também apresentaram uma redução, porém não significativa. Além disso, a redução do peso corpóreo manteve-se significativa para os animais de meia idade até o terceiro dia após o tratamento com LPS. Como esperado, nenhuma diferença significativa foi encontrada para animais C3H/HeJ.

Os resultados da ingestão de alimentos corroboram com dados de Nelson et. al (1999), que administraram IL-1 β por via i.c.v. em camundongos BALB/c adultos (3 a 5 meses) e idosos (22 a 24 meses) e observaram que a queda no consumo de alimentos foi mais intensa nos camundongos idosos (65%, comparado à redução de 35% de animais adultos). Da mesma forma, Iodobout et. al (2005) encontraram reduções na ingestão de alimentos e no peso corpóreo mais pronunciadas em camundongos BALB/c idosos (20 a 24 meses), após tratamento de LPS por via p. (na dose de 330 μ g/kg, uma dose maior do que utilizada em nossos experimentos). Esses autores também verificaram uma queda da massa corpórea significativa em animais adultos tratados com LPS. Em nossos experimentos, apesar do peso corpóreo dos animais adultos tratados com LPS ser menor do que os animais tratados com salina, não houve diferença estatística. Provavelmente esse ocorrido se deva à menor dose utilizada em nossos experimentos (300 μ g/kg) comparada à dos experimentos dos autores citados (300 μ g/kg).

A acentuada redução da ingestão de alimentos dos animais de meia idade e idosos parece estar associada à maior perda de peso por esses animais. Provavelmente, assim como em animais adultos, a anorexia induzida pelo LPS nos animais idosos deva ser regulada tanto centralmente, quanto periféricamente. Como ilustrado na figura 6, camundongos C3H/HePas de meia idade e idosos apresentaram maior peso corpóreo do que adultos. Sabe-se que administrações periféricas de LPS (BERKOWITZ et al., 1998) e de TNF- α (MONTZOROS et. al, 1997) aumentam a

expressão de leptina pelo tecido adiposo. A leptina participa da regulação da ingestão de alimentos e do controle de tecido adiposo no organismo, reduzindo a expressão de peptídeos orexígenos (TRITOS, MANTZOROS, 1997) e aumentando a dos anorexígenos (KALRA et al., 1999) no SNC, o que leva a uma menor ingestão alimentar. É possível que a expressão de leptina de animais de meia idade e idosos tratados com LPS seja maior do que animais adultos, participando da menor ingestão de alimentos por esses animais.

A perda de peso dos animais idosos não deve estar relacionada a mecanismos termogênicos, como tremores musculares que requerem alto gasto metabólico, já que animais idosos apresentam dificuldades no desenvolvimento da febre, ou mesmo, ausência da mesma, após administração de LPS, TNF ou IL-1 (BIBBY, GRIMBLE, 1991; SCARPACE et al., 1992; WACHULEC, PELOSO, SATINOFF, 1997; PELOSO et al., 2003; NORMAN, YAMAMURA, YOSHIKAWA, 1988; MILLER et al., 1991).

Com relação aos experimentos comportamentais, animais adultos C3H/HePas, tratados com LPS, apresentaram queda significativa da atividade geral, avaliada através da distância movida em centímetros e da velocidade média em centímetros por segundo, no Campo Aberto. Esses animais, portanto, apresentaram o comportamento doentio. Já animais C3H/HeJ não apresentaram queda desses parâmetros em nenhuma idade, ou seja, nessa dose de LPS, não houve a expressão do comportamento doentio para animais C3H/HeJ adultos, de meia idade, ou idosos.

Animais C3H/HePas de meia idade também apresentaram queda da distância movida e da velocidade média no Campo Aberto. Entretanto, animais idosos da mesma linhagem mantiveram os parâmetros da atividade geral no Campo Aberto, quando comparados com idosos tratados com salina. É interessante ressaltar que os dados de distância movida e velocidade média do Campo Aberto de animais idosos tratados com solução salina e animais adultos tratados com LPS mostraram-se muito semelhantes.

Esses resultados são similares aos obtidos por Nelson et al. (1999), que administraram IL-1 β por via i.c.v. Nesse experimento, a atividade individual de camundongos tratados com salina ou IL-1 β , i.c.v. foi monitorada em caixas metabólicas. Animais idosos apresentaram menor atividade basal, quando comparados aos adultos, e não diminuía após o tratamento com IL-1 β , ao contrário dos animais adultos tratados com IL-1 β . Da mesma forma que nossos experimentos, a atividade de idosos tratados com salina era semelhante à de adultos tratados com LPS. Os autores sugerem que os animais idosos seriam refratários aos efeitos da IL-1 β com respeito à atividade locomotora, ou que nesses animais, por já apresentarem menor atividade basal, uma queda adicional em sua locomoção não seria possível. A última sugestão é indicada pelos próprios autores como mais provável. Entretanto, em nossos experimentos no Labirinto em Cruz Elevado, animais idosos, apesar de apresentarem basalmente menor distância movida com relação aos animais adultos, demonstram menor locomoção após tratamento com LPS. Dessa forma, não acreditamos que camundongos idosos sejam refratários aos efeitos da IL-1 β , nem que esses camundongos, que se locomovem menos, não sejam capazes de reduzir ainda mais a sua locomoção frente aos efeitos do LPS.

Dados opostos foram obtidos por Godbout et al (2005). Nesses experimentos, camundongos foram avaliados, durante o período de escuro, em sua caixa moradia 0, 2, 4, 8 e 24 horas após tratamento com LPS ou solução salina i.p. Em todos os tempos avaliados, houve uma queda da atividade locomotora de camundongos adultos e idosos, sendo que nos tempos 8 e 24 horas, a locomoção de animais idosos foi menor quando comparada aos animais adultos, devido ao aumento progressivo da locomoção dos últimos. O mesmo ocorreu para exploração social (avaliada pela presença de um animal adulto co-específico); animais idosos tratados com LPS apresentaram redução da exploração de um co-específico, que foi mais intensa do que de adultos nos tempos 8 e 24 horas. Ou seja, camundongos idosos mantiveram reduzidos os parâmetros de

locomoção e exploração social por um período mais prolongado. Esses achados foram associados positivamente à maior expressão de IL-1 β e IL-6 no cérebro dos camundongos idosos, descrita como neuroinflamação.

Existem duas grandes diferenças com relação ao trabalho de Godbout et al. (2005) e aos nossos experimentos: a dose utilizada, 65% maior nos experimentos de Godbout et al. (2005), e a forma de avaliação da locomoção. A avaliação da locomoção na caixa moradia e em aparatos experimentais, como o Campo Aberto e o Labirinto em Cruz Elevado, apresentam diferenças; a distância percorrida é menor na caixa moradia e a motivação para explorar o ambiente é maior em locais aos quais os animais nunca tenham sido expostos. Dessa forma, acreditamos que a motivação de exploração dos animais adultos e idosos, em nossos experimentos, tenha sido diferente.

Em nossos experimentos, a distância movida dos animais C3H/HePas adultos e de meia idade tratados com LPS foi menor do que animais tratados com salina, tanto no Campo Aberto, quanto no Labirinto em Cruz Elevado. Para os animais idosos, o tratamento com LPS reduziu a locomoção apenas no Labirinto em Cruz Elevado. Realizamos, então, a análise da distância movida nesses aparatos dividida por intervalos de tempo, à cada minuto. Observamos que, no Campo Aberto, animais adultos tratados com LPS apresentaram redução da locomoção em todos os intervalos de tempo analisados; os animais de meia idade, apenas no primeiro e quarto intervalos de tempo; e os animais idosos, em nenhum dos tempos analisados. No Labirinto em Cruz Elevado, os resultados dos animais adultos permaneceram semelhantes ao Campo Aberto; os animais de meia idade, diferentemente do Campo Aberto, apresentaram queda da locomoção em todos os tempos avaliados, assim como os animais idosos. Além disso, animais idosos tratados com LPS apresentaram queda da locomoção progressiva no Labirinto em Cruz Elevado,

sendo que a redução no primeiro intervalo de tempo, foi menor do que no terceiro, que por sua vez foi menor que no último.

O número de levantar (*rearing*) realizado pelos camundongos no Campo Aberto e no Labirinto em Cruz Elevado reflete a exploração desses animais nesses aparatos. Esse número foi reduzido significativamente pelo tratamento com LPS apenas nos animais adultos, tanto no Campo Aberto, como no Labirinto em Cruz Elevado. É interessante observar, que, novamente, o número de levantar dos camundongos idosos tratados com salina foi semelhante ao dos animais adultos tratados com LPS.

Considerando o número de entradas nos braços abertos, fechados e na plataforma central do Labirinto em Cruz Elevado, como outros indicadores de exploração, podemos observar que os resultados desses parâmetros seguem o mesmo sentido do número de levantar: camundongos C3H/HePas idosos não apresentam queda significativa quando tratados com LPS; camundongos de meia idade demonstraram redução em alguns parâmetros (número de entradas nos braços fechados, número de entradas totais e número de entradas na plataforma central), sempre com uma intensidade menor do que nos adultos; e camundongos adultos apresentaram queda em todos os parâmetros analisados, quando tratados com LPS.

Cohn e Sá-Rocha (2006) avaliaram os efeitos do LPS em camundongos submissos e dominantes e verificaram que a hierarquia social influenciou a expressão do comportamento doentio. Camundongos dominantes tratados com LPS apresentaram as esperadas reduções na frequência de comportamentos (avaliada quando o animal farejava o ar, o chão, as paredes, ou quando o mesmo levantava, entre outros comportamentos) e na interação social, o que não ocorreu para animais submissos. Ainda, além da redução na frequência desses comportamentos, a qualidade do comportamento de animais dominantes tratados com LPS também foi alterada; os comportamentos ofensivos foram praticamente abolidos nesses camundongos. É interessante

ressaltar que animais dominantes tratados com LPS não apresentaram redução da locomoção (avaliada como porcentagem de tempo gasto em movimento), ao contrário de animais submissos. Os autores sugerem que animais submissos compensavam a manutenção de comportamentos sociais com a redução da locomoção.

Bender et al. (1996) verificaram que o comportamento de fazer o ninho após infecção com o vírus influenza foi diferente em camundongos fêmeas adultas e idosas. Esse comportamento, em níveis basais, foi maior em fêmeas adultas do que nas idosas. Após a infecção experimental, as adultas tiveram uma queda significativa nesse comportamento, enquanto que as idosas mantiveram esse comportamento semelhante ao basal. A infecção pelo vírus influenza resultou em queda na temperatura corpórea em ambas idades, sendo que nas idosas essa queda foi maior. Quando o ninho era retirado, as adultas apresentavam queda ainda maior da temperatura após infecção de influenza, enquanto que idosas demonstravam queda semelhante, o que, segundo os autores, denota diferenças na regulação corpórea entre camundongos fêmeas adultas e idosas (BENDER et al., 1996). Apesar do foco desse estudo ter sido a influência da temperatura corpórea no comportamento de fazer o ninho, nós sugerimos que a idade influenciou esse comportamento durante a infecção de uma forma motivacional.

Analizando os resultados do presente trabalho sob uma perspectiva motivacional, parece razoável supor que animais idosos, tratados com LPS apresentaram uma motivação diferente com relação aos animais adultos sob o mesmo tratamento. Quando submetidos a um novo ambiente, camundongos idosos continuaram realizando a exploração ambiental à semelhança de seu estado basal (com o tratamento de solução salina). Num primeiro momento, ou seja, durante a exploração do Campo Aberto, a locomoção foi mantida em níveis basais. Entretanto, quando submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado, esses camundongos apresentaram quedas progressivas nesse parâmetro. Porém, os comportamentos de exploração mantiveram-se similares aos dos

idosos tratados com solução salina. Sugerimos então que animais idosos sob efeitos do LPS mantiveram a motivação em explorar os novos ambientes. Inicialmente a locomoção manteve-se em níveis basais, entretanto, não foi possível a esses animais manter os mesmos padrões de locomoção, provavelmente por um desgaste frente aos efeitos do LPS, e a distância movida foi reduzida progressivamente no Labirinto em Cruz Elevado. Dessa forma, no Labirinto em Cruz Elevado, esses animais locomoveram-se menos, mas exploraram o ambiente de forma semelhante aos animais idosos tratados com salina.

Três outras observações fazem-se importantes nessa discussão. A primeira trata-se das alterações comportamentais dos animais de meia idade. Algumas alterações que ocorreram nos animais adultos tratados com LPS não aconteceram para os animais de meia idade (como é o caso do número de levantar no CA e no LCE). A maioria dos parâmetros que, à semelhança dos animais adultos, foram reduzidos pelo tratamento de LPS, apresentaram uma queda de menor intensidade com relação aos adultos (distância movida e velocidade média no CA, número de entradas totais e número de entradas na plataforma central). Parece então haver uma alteração progressiva da expressão do comportamento doentio com a idade em um novo ambiente.

Ainda sob a perspectiva motivacional, a segunda observação seria que, como sugerido por Dantzer (2001) o medo e a ansiedade poderiam sobrepujar os efeitos do LPS e do comportamento doentio. De fato, Swiergiel e Dunn (2007) sugeriram que o tratamento com IL-1 β e LPS pudesse causar ansiedade em animais. Analisando o número de entradas na zona tigmotóxica do Campo Aberto (já que a permanência nessa zona representa um indicativo de ansiedade por roedores), observamos que existe uma redução desse número em animais adultos e de meia idade tratados com LPS. Entretanto, o tempo de permanência nessa região permanece similar para todos os animais, tratados ou não com LPS. Portanto, o menor número de entradas na zona tigmotóxica de animais adultos e de meia idade tratados com LPS ocorreu devido à menor locomoção desses

animais, e não a um efeito ansiogênico do LPS. No Labirinto em Cruz Elevado, a redução da locomoção dos animais tratados com LPS (em todas as idades) e a redução do número de entradas nos braços abertos e fechados (para os animais adultos e de meia idade tratados com LPS) dificulta a análise da ansiedade. A porcentagem de entrada nos braços abertos poderia auxiliar nessa interpretação, já que leva em conta o número de entradas nos braços abertos e nos fechados. Com relação a esse resultado, apenas animais de meia idade tratados com LPS apresentaram uma queda significativa, quando comparado com adultos tratados com LPS. É possível que essa queda represente alterações de ansiedade nesses animais. Entretanto, animais idosos tratados com LPS não apresentaram redução da porcentagem de entrada nos braços abertos. Portanto, para esses animais, não é possível afirmar que o LPS causou aumento dos níveis de ansiedade, responsáveis pela diferente expressão do comportamento doentio.

Por fim, como já citado, alguns comportamentos basais dos animais idosos demonstram-se semelhantes aos comportamentos de camundongos adultos tratados com LPS. Sugerimos então que animais idosos apresentam um comportamento basal semelhante ao comportamento doentio, principalmente no que se diz respeito à atividade geral.

Em resumo, a expressão do comportamento doentio não caracteriza apenas uma debilidade geral do organismo frente à infecção. Ao contrário, ele participa do e auxilia o processo de recuperação do animal. Dessa forma, alterações nesse comportamento poderiam prejudicar essa recuperação. Em nossos experimentos, verificamos que animais idosos apresentaram diferente expressão do comportamento doentio. A motivação desses animais, após a estimulação com LPS apresentou-se de forma diferente, favorecendo a exploração em detrimento da expressão do comportamento doentio. A alteração da motivação nos pareceu ser progressiva com a idade. Ainda, animais idosos apresentaram comportamentos basais semelhantes ao

comportamento doentio. Nós acreditamos, que essas alterações nos comportamentos associados à doença poderiam prejudicar a recuperação dos animais idosos durante processos infecciosos.

6.2 ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS SANGÜÍNEOS

Neutrófilos representam a primeira linha de defesa do organismo. Portanto são extremamente importantes no combate a bactérias e microrganismos, por suas propriedades fagocíticas. A maioria dos estudos sobre o sistema imunológico durante o envelhecimento foca-se na resposta imunológica adaptativa de indivíduos idosos. Entretanto, o estudo da resposta imunológica inata desses indivíduos faz-se igualmente importante, já que o envelhecimento aumenta a morbidade e mortalidade à doenças bacterianas (SCHNEIDER, 1983).

A administração de LPS na cavidade peritoneal estimula macrófagos dessa cavidade, através de receptores TLR4. Como já relatado, a resposta final à ligação do LPS ao CD14 (receptor de superfície celular), e então ao TLR4 (receptor transmembrânico), é a produção do fator de transcrição NF κ B e citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α , IL-1 e IL-6. As citocinas pró-inflamatórias induzem a expressão de moléculas de adesão em leucócitos, primeiramente neutrófilos, que então migram de capilares sanguíneos para a cavidade. Numa fase mais tardia, ocorre também, liberação de neutrófilos da medula óssea para a corrente sanguínea.

Como neutrófilos possuem meia-vida muito reduzida e morrem espontaneamente por apoptose, durante processos infecciosos, fatores anti-apoptóticos, como o próprio LPS, as citocinas pró-inflamatórias e componentes do complemento, prolongam a vida dessas células. (LEE et al, 1993).

São frequentes os relatos de déficits na habilidade de indivíduos idosos de eliminar agentes infecciosos. Tendo em mente todas as etapas que envolvem a neutralização de microrganismos infecciosos por neutrófilos, as alterações decorrentes da idade nessas células podem ocorrer de diversas formas: alteração do número de neutrófilos na circulação sanguínea, alteração da migração dessas células ao local de infecção, falha de mecanismos anti-apoptóticos, ou redução da fagocitose e da atividade bactericida dessas células (LORD et al., 2001).

O objetivo do presente trabalho foi analisar a capacidade fagocítica e bactericida (avaliada indiretamente pela produção de radicais livres de oxigênio) de populações de neutrófilos no sangue de camundongos de diferentes idades tratados com LPS pela via i.p.

Os resultados de intensidade de fagocitose e porcentagem de neutrófilos que realizaram fagocitose revelaram que ambos parâmetros aumentaram em camundongos C3H/HePas idosos tratados com LPS. Entretanto, analisando os dados com cautela, observaremos que a diferença desses índices na verdade, foi devido à uma diminuição da intensidade de fagocitose e da porcentagem de neutrófilos realizando fagocitose nos animais adultos tratados com LPS, e não a um aumento dos animais idosos.

Com relação ao burst oxidativo, não houve diferenças observadas no burst oxidativo basal de neutrófilos, tanto na intensidade, quanto na porcentagem de células realizando o burst oxidativo. Com relação ao burst induzido pela bactéria, em geral, houve maior produção de radicais livres de oxigênio nos animais idosos, para a linhagem C3H/HePas. Da mesma forma, a porcentagem de neutrófilos realizando esse burst oxidativo, nos idosos, foi maior. Ou seja, nesses animais, parece haver mais neutrófilos produzindo radicais livres de oxigênio, em maior intensidade.

A maioria dos estudos com neutrófilos de idosos, tem sido realizada em humanos. Como é o caso de Butcher et al., que em 2001 relatou que a capacidade fagocítica de neutrófilos de

humanos idosos apresentou-se diminuída, devido à uma diminuição da ingestão de microrganismos por célula (neutrófilo), e não à quantidade de neutrófilos realizando fagocitose. O receptor para imunoglobulina, CD 16, também apresentou menor expressão nos neutrófilos de indivíduos idosos, que poderia influenciar a redução de fagocitose (através de menor opsonização da bactéria). Já, o burst oxidativo induzido por fMLP aumentou significativamente com a idade. Nossos resultados de fagocitose, após indução com LPS foram contrários aos de Butcher et al. (2001); nossos experimentos demonstraram que camundongos C3H/HePas idosos tratados com LPS apresentaram intensidade de fagocitose maior, assim como um aumento da porcentagem de neutrófilos realizando fagocitose. Já, a maior produção de radicais livres (verificada através do burst oxidativo) em neutrófilos de indivíduos idosos, está em acordo com nossos resultados.

Algumas suposições podem ser realizadas em relação às diferenças nos resultados de fagocitose. Além de tratar-se de experimentos realizados em espécies diferentes (humanos e camundongos), os experimentos de Butcher et al. (2001) envolveram neutrófilos sanguíneos que receberam apenas estímulos *in vitro*. Já, em nossos experimentos, apesar da incubação *in vitro* com a bactéria *Staphylococcus aureus*, o LPS foi injetado na cavidade peritoneal dos animais, e apenas após 2 horas o sangue foi coletado para a análise dos neutrófilos sanguíneos. O esclarecimento das diferenças metodológicas faz-se importante para a interpretação dos resultados apresentados nessa dissertação. Assim, sugerimos duas alternativas. A primeira é de que, diferentemente dos resultados obtidos por Butcher et al. (2001), os camundongos idosos tratados com LPS apresentaram maior intensidade de fagocitose e neutrófilos realizando fagocitose. A segunda é a de que nesses camundongos, existe uma deficiência na quimiotaxia e migração de neutrófilos sanguíneos para a cavidade peritoneal. Dessa forma, nossa análise dos neutrófilos sanguíneos abrangeria apenas aqueles neutrófilos que após 2 horas ainda

encontravam-se na circulação sanguínea, sendo que os neutrófilos mais ativados já se encontravam na cavidade peritoneal.

A presença de endotoxina bacteriana no tecido induz à migração massiva de neutrófilos do sangue para o tecido, primeiramente através da expressão de moléculas de quimiotaxia e adesão e então da efetiva migração e diapedese de neutrófilos da circulação para o tecido. Num segundo momento, ocorre a liberação de novos neutrófilos da medula óssea para o sangue. Essa segunda etapa poderá ocorrer após alguns dias (BUSH, 1991; LATIMER, MAHAFFEY, PRASSE, 2003), portanto provavelmente não influenciou nossos resultados, já que o sangue era coletado após 2 horas dos tratamentos.

O processo de fagocitose é iniciado através da ligação de receptores presentes nos neutrófilos com moléculas do microrganismo infeccioso. Agentes infecciosos, aos quais o organismo já tenha sido exposto, poderão induzir à produção de anticorpos. Esses, opsonizam o microrganismo e ativam neutrófilos (através de receptores nos mesmos). Moléculas do complemento também podem opsonizar bactérias e fungos, aprimorando a fagocitose. Já, receptores CD11b e CD11c de neutrófilos são importantes para estágios mais iniciais e para microrganismos aos quais o organismo ainda não tenha sido exposto. Esses receptores ligam-se à moléculas do complemento, mas também reconhecem LPS e lipoproteínas (BUTCHER, CHAHÉL, LORD; 2000).

Revisaremos alguns trabalhos sobre as funções de neutrófilos sanguíneos desenvolvidos tanto em humanos, como em animais. Como veremos, muitos dados são contraditórios, o que indica que mais estudos relacionados a esse assunto fazem-se importante para o melhor entendimento do efeito da idade na atividade de neutrófilos.

Experimentos *in vitro* para avaliar a atividade de neutrófilos demonstraram que a fagocitose de bactérias por essas células, na ausência de soro, apresentou níveis muito baixos,

tanto em humanos adultos, quanto em humanos idosos. Já, a fagocitose de bactérias por neutrófilos na presença de soro, apresentou-se deficiente em neutrófilos de indivíduos idosos (EMANUELLI et al., 1986). Talvez, o estudo da fagocitose de bactérias opsonizadas por neutrófilos pudesse responder algumas questões em relação à atividade de neutrófilos dos camundongos idosos em nossos experimentos.

Ainda com relação a estudos com neutrófilos humanos, Niwa et al. (1989) demonstraram que a quimiotaxia de neutrófilos de indivíduos idosos apresentou-se reduzida. E que a menor quimiotaxia estava relacionada com menor sobrevivência desses indivíduos: comparando-se indivíduos idosos que sobreviveram por períodos mais prolongados, com relação àqueles que sobreviveram por menos tempo, a maior intensidade de quimiotaxia relacionou-se com maior sobrevivência (NIWA et al., 1989). Já, MacGregor e Shalit (1990) não encontraram diferenças com relação à aderência de neutrófilos ao endotélio e à migração dessas células. Da mesma forma, Biasi et al. (1996) encontraram índices semelhantes de migração de neutrófilos de indivíduos idosos e adultos.

Wenisch et al. (2000) demonstraram que alterações na atividade de neutrófilos de indivíduos idosos dependiam do estímulo em questão. Neutrófilos estimulados *in vitro* com *S. aureus* ou *E. coli* demonstraram diferenças com relação à produção de radicais livres; a produção foi menor apenas em neutrófilos estimulados com *S. aureus* (ao contrário dos nossos resultados) e manteve-se semelhante à produção de radicais livres por neutrófilos de indivíduos adultos quando estimulados com *E. coli*. Já, a fagocitose apresentou-se diminuída em ambos. A quimiotaxia de neutrófilos de indivíduos idosos (avaliada por estímulos de fMLP) apresentou uma tendência à redução. Novamente, esses experimentos foram realizados com neutrófilos estimulados *in vitro*, após o isolamento dessas células do sangue periférico de humanos.

Com relação a estudos realizados em animais, a incubação de neutrófilos de ratos adultos com plasma de ratos idosos demonstrou alteração na quimiotaxia desses neutrófilos induzida por LPS, devido à uma menor resposta à substâncias quimiotáticas derivadas do complemento. Os autores acreditam que o plasma dos ratos idosos continha uma proteína capaz de se ligar em receptores para essas substâncias quimiotáticas em neutrófilos, e neutralizar sua ação. Como a locomoção de neutrófilos provenientes de ratos idosos, por si só, não foi alterada, os autores acreditam que não exista uma deficiência na locomoção dos neutrófilos em si (MELLO et al., 1992).

Camundongos idosos infectados por *Pseudomonas aeruginosa* na córena apresentaram déficits na migração de neutrófilos ao local infectado. Esses dados estavam relacionados à menor expressão da molécula de adesão ICAM-1 (PIER, 1998). Estudos com o mesmo modelo (infecção ocular com *Pseudomonas aeruginosa*) também demonstraram menor recrutamento de neutrófilos em fases iniciais da infecção, e menor destruição da bactéria em camundongos (KERNACHI et al., 2000). Da mesma forma, infecções experimentais no trato respiratório de ratos com *Pseudomonas aeruginosa* demonstraram redução da fagocitose dessa bactéria opsonizada por neutrófilos recrutados do peritônio de ratos idosos. Entretanto, houve um aumento da fagocitose por macrófagos alveolares (MANCUSO et al., 20014).

Como se pode notar, existem muitos trabalhos contraditórios com relação à atividade de neutrófilos em animais e humanos idosos. Muitas variáveis podem ser responsáveis por essas disparidades: experimentos *in vitro* ou *in vivo*; análise de bactérias opsonizadas ou não opsonizadas; experimentos com humanos ou animais; análise de neutrófilos no sangue, ou no tecido; análise da quimiotaxia (capacidade de neutrófilos em serem atraídos por substâncias quimiotáticas) ou a efetiva migração de neutrófilos ao tecido. Entretanto, a maioria dos trabalhos

demonstra redução da fagocitose por neutrófilos com o avançar da idade, em animais e humanos. Dessa forma, acreditamos que em nossos experimentos, o aumento da intensidade da fagocitose por neutrófilos e da porcentagem de neutrófilos realizando fagocitose nos camundongos idosos seja devido à menor migração desses neutrófilos do sangue para a cavidade peritoneal, após o tratamento com LPS. Dessa forma, neutrófilos de camundongos idosos que foram ativados por citocinas pró-inflamatórias, teriam permanecido no sangue. Da mesma forma, a maior intensidade de burst oxidativo e a maior quantidade de neutrófilos produzindo radicais livres de oxigênio no sangue de camundongos idosos, retratariam a permanência dessas células no sangue. Uma outra suposição ao aumento da atividade dos neutrófilos nesses animais idosos seria a de que outro tipo de receptor para o LPS, além do TLR4 estaria participando dessa resposta, aumentando a capacidade de fagocitose dos neutrófilos, já que animais C3H/HeJ idosos também apresentaram maior intensidade de fagocitose e burst oxidativo após estímulo com a bactéria.

Supondo que a migração dos neutrófilos sanguíneos para a cavidade peritoneal após o tratamento com LPS realmente estivesse prejudicada nos camundongos idosos, poderíamos sugerir que esses animais seriam mais susceptíveis ao choque endotóxico do que adultos, já que neutrófilos e seus produtos (principalmente radicais livres de oxigênio) participam da patogênese do choque séptico (ALDRIDGE, 2002) e durante o choque séptico existe uma deficiência de migração de neutrófilos do sangue para o tecido (ALVES-FILHO et al., 2005).

De fato, a DL50 (50% da dose letal; dose em que 50% dos animais morrem) de LPS para camundongos idosos é menor do que para adultos, existindo uma sensibilidade aumentada para os efeitos do LPS em camundongos idosos, devido à maior produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α , para cujos efeitos tóxicos também demonstraram maior sensibilidade (TATEDA et al., 1996). A administração de LPS i.p. (1 mg/kg) em camundongos,

induziu maior produção de TNF no soro e no lavado peritoneal de animais idosos. Além disso, o tratamento com dexametasona apresentou menor efeito na redução da produção de TNF nesses animais (HYDE, McCALLUM, 1992). Dessa forma, a presença de maior quantidade de neutrófilos ativados no sangue de camundongos idosos poderia representar maior risco de desenvolvimento de choque endotóxico nesses animais.

Nos camundongos idosos, as alterações na expressão do comportamento doentio e da resposta de neutrófilos, encontradas no presente trabalho, associadas à dificuldade de desenvolvimento de febre e maior sensibilidade aos efeitos tóxicos do LPS, relatadas na literatura, representam desequilíbrios do organismo idoso frente a desafios imunológicos. Acreditamos que, em conjunto, essas alterações comprometam a recuperação e a manutenção da homeostase nesses animais, na presença de estímulos estressores e / ou imunológicos. Seria muito difícil, talvez impossível, elucidar causas e conseqüências das alterações relacionadas ao envelhecimento. Por esta razão, acreditamos que uma perspectiva multi sistêmica e interdisciplinar poderia auxiliar a compreensão desse processo inerente a homens e animais.

7 CONCLUSÕES

- Camundongos de meia idade e idosos apresentaram maior peso corpóreo, maior peso relativo do baço, menor peso relativo do timo, sem alterações no peso relativo das adrenais.
- O LPS induziu menor consumo de alimentos e maior perda de peso corpóreo nos camundongos de meia idade.
- Camundongos idosos apresentaram manutenção dos parâmetros de atividade geral e exploração no Campo Aberto após o tratamento com LPS.
- A locomoção de camundongos idosos apresentou uma queda progressiva após o tratamento com LPS desses animais.
- Camundongos idosos apresentaram manutenção dos parâmetros de exploração no Labirinto em Cruz Elevado após o tratamento com LPS.
- Camundongos de meia idade apresentaram um padrão intermediário entre camundongos adultos e idosos, com relação aos parâmetros comportamentais analisados no Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado, após o tratamento com LPS.
- Neutrófilos sanguíneos de camundongos idosos apresentaram maior intensidade de fagocitose e maior quantidade de neutrófilos realizando fagocitose, após o tratamento com LPS.
- Neutrófilos sanguíneos de camundongos idosos apresentaram maior intensidade de burst oxidativo e maior quantidade de neutrófilos realizando burst oxidativo, quando estimulados com a bactéria *Staphylococcus aureus*, após o tratamento com LPS.

Através dos resultados obtidos, e com base nos trabalhos da literatura internacional, acreditamos que camundongos idosos apresentaram alteração na expressão do comportamento doentio, representada por diferente motivação de exploração de novos ambientes, e essa alteração nos pareceu ser progressiva. Ainda, acreditamos que a quimiotaxia e / ou migração de neutrófilos sanguíneos de camundongos idosos esteja prejudicada frente a estímulos de LPS, dessa forma, a maior quantidade de neutrófilos ativados na circulação sanguínea poderia tornar esses animais ainda mais susceptíveis aos efeitos do choque séptico.

REFERÊNCIAS

- ADER, R.; COHEN, N. Conditioning and Immunity. **Psychoneuroimmunology**. Thrid edition, v.2, Academic Press San Diego, 2000
- ALDRIDGE A. J. Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome. **The European Journal of Surgery**, v. 168, n. 4, p. 204 – 214, 2002
- ALVES-FILHO, J. C.; BENJAMIM, C.; TAVARES-MURTA, B. M.; CUNHA, F. Q. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, suppl. 1, p. 223 – 226, 2005.
- AUBERT A. Sickness and behavior in animals: a motivational perspective, **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 1029–1036, 1999.
- BAN, E.; HAOUD, F.; LENSTRA, R. Brain interleukin-1 gene expression induced by peripheral lipopolysaccharide administration. **Cytokine**, v. 4, p. 48-54, 1992.
- BARBIERI, M.; RIZZO, M. R.; MANZELLA, D.; PAOLISSO, G. Age-related insulin resistance: is it na obligatory finding? The lesson from healthy centenarians. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 17, n. 1, p. 19 – 26, 2001.
- BELVIN, M. P.; ANDERSON, K. V. A conserved signaling pathway: the Drosophila Toll-dorsal pathway. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 12, p. 393-416, 1996.
- BERKOWITZ, D. E.; BROWN, D.; LEE, K. M.; EMALA, C.; PALMER, D.; AN, Y.; BRESLOW, M. Endotoxin-induced alteration in the expression of leptin and beta3-adrenergic receptor in adipose tissue. **The American Journal of Physiology**, v. 274, p. 992 – 997. 1998.
- BERMAN, P.; FOX, R. A. Fever in the elderly. **Age Ageing**, v. 14, p. 327 – 332, 1985.
- BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. The cytokine-HPA axis feed-back circuit. **Zeitschrift für Rheumatologie**, v. 59, p. 26-30, 2000.
- BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-Neuro-Endocrine Interactions: Facts and Hypotheses. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 1, p. 64-102, 1996.
- BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DA PRADA M.; LELLER H. A. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. **Cellular immunology**, v. 48, p. 346-355, 1979.
- BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DINARELLO, C.A. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, v. 233, p. 652– 654, 1986.
- BESEDOVSKY, H.; FELIX, D.; HAAS, H. Hypotalamic changes during the immune response. **European Journal of Immunology**, v. 7, n. 5, p. 323 – 325, 1977.

BEUTLER, B. Endotoxin, Toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity. **Current Opinion on Microbiology**, v. 3, p. 23 – 28, 2000.

BIASI, D.; CARLETTO, A.; DELL'AGNOLA, C.; CARAMASCHI, P.; MONTESANTI, F.; ZAVATERI, G.; ZEMINIAN, S.; BELLAVITE, P.; BAMBARA, L. M. Neutrophils migration, oxidative metabolism, and adhesion in elderly and young subjects. **Inflammation**, v. 20, n. 6, p. 673 – 681, 1996.

BIBBY, D. C.; GRIMBLE, R. F. Effect of age on hypothalamic prostaglandin E2 production and fever in response to tumor necrosis factor (cachectin) and endotoxin in rats. **Clinical Science**, v. 81, n. 3, p. 313 – 317, 1991.

BLALOCK, J. E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. **Physiological Review**, v. 69 n. 1, p. 1-27, 1989.

BLALOCK, J. E.; SMITH, E. M. Conceptual development of the immune system as the sixth sense. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 21, p. 23-33, 2007.

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

BLUTHÉ, R. M.; BEAUDU, C.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Differential effects of IL-1ra on sickness behavior and weight loss induced by IL-1 in rats. **Brain Research**, v. 677, p. 171 – 176, 1995.

BLUTHÉ, R. M.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. **Brain Research**, v. 573, p. 318 – 320, 1992.

BLUTHÉ, R. M.; MICHAUD, B.; POLI, V.; BERNAY, F.; PAMET, P.; DANTZER, R. Interleukin-6 is active only in presence of other proinflammatory cytokines to induce sickness behavior. **Neuroimmunomodulation**, v. 5, p. 67, 1998.

BUCHANAM, J. B.; PELOSO, E.; SATINOFF, E. Thermoregulatory and metabolic changes during fever in young and old rats. **American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 285, p. 1165 – 1196, 2003.

BUCHER, S. K.; LORD, J. M. Stress responses and innate immunity: aging as a contributory factor. **Aging Cell**, p. 151 – 160, 2004.

BUSH, B. M. Interpretation of Laboratory Results for Small Animal Clinicians. Blackwell Scientific Publications. Capítulo 3 (White Blood Cells) , p. 160, 1991.

BUTCHER, S. K.; CHAHAL, H.; NAYAK, L.; SINCLAIR, A.; HENRIQUEZ, N. V.; SAPEY, E.; O'MAHONY D.; LORD, J. M. Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD 16 expression in elderly humans. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 70, p. 881 – 886, 2001.

BUTCHER, S.; CHAHAL, H.; LORD, J. M. Ageing and the neutrophil: no appetite for killing? **Immunology**, v. 100, p. 411 – 416, 2000.

CHANG, H. R.; BISTRAN, B. The role of cytokines in the catabolic consequences of infection and injury. **JPEN Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 22, n. 3, p. 156 -166, 1998.

CHEUNG, H. T.; NADAKAVUKAREN, M. J. Age-dependent changes in the cellularity and ultrastructure of the spleen of Fischer F344 rats **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 22, n. 1, p. 23 – 33, 1983.

CHROUSOS, G. P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 851, p. 311–335, 1998.

COHN, D. W. H.; SÁ-ROCHA, L. C. Differential effects of lipopolysaccharide in the social behavior of dominant and submissive mice. **Physiology & Behavior**, v. 87, p. 932 – 937, 2006.

CONNOY, A. C.; TRADER, M.; HIGH, K. P. Age-related changes in cell surface and senescence markers in the spleen of DBA/2 mice: a flow cytometric analysis. **Experimental Gerontology**, v. 41, n. 2, p. 225 – 229, 2006.

DANTZER, R. Innate immunity at the forefront of psychoneuroimmunology. **Brain Behavior and Immunity**, v. 18, p. 1 –6, 2004.

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

DE LA GARZA, R. Endotoxin- or pro-inflammatory cytokine-induced sickness behavior as an animal model of depression: focus on anhedonia. **Neuroscience and biobehavioral review**, v. 29, p. 761-770, 2005.

DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H. O.; SORKIN, E. Endogenous blood levels of corticosterone control the immunological cell mass and B cell activity in mice. **Journal of Immunology**, v. 133, p. 572-575, 1984.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, p. 503-508, 2000.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 51 – 95, 1984.

DING, A.; HWANG, S.; SCHWAB, R. Effect of aging on murine macrophages – Diminished response to IFN-gamma for enhanced oxidative metabolism. **Journal of Immunology**, v. 153, p. 2146 – 2152, 1994.

DUNN, A. J. Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone. **Life Sciences**, v. 43, p. 429 – 435, 1988.

EMANUELLI G.; LANZIO M.; ANFOSSI T.; ROMANO S.; ANFOSSI G.; CALAMUGGI G. Influence of age on polymorphonuclear leukocytes *in vitro*: phagocytic activity in healthy human subjects. **Gerontology**, v. 32, p. 308 - 316, 1986.

ESPOSTIO, A. L.; POIRIER, W. J.; CLARK, C. A. In vitro assessment of chemotaxis by peripheral blood neutrophils from adult and senescent C57BL/6 mice: Correlation with in vivo responses to pulmonary infection with type 3 *Sptetococcus pneumoniae*, v. 36, n. 1, p. 2 – 11. 1990.

FELTEN, D. L.; FELTEN, S. Y.; CARLSON, S. L.; OLSCHOWKA, J. A.; LIVNAT, S. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. **Journal of Immunology**, v. 135, p. 755– 765, 1985.

FELTEN, S. Y.; OLSCHOWKA, J. A. Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: II. Tyrosine hydroxylase (TH)-positive nerve terminal form synaptic-like contact on lymphocytes in the splenic white pulp. **Journal of Neuroscience Research**, v. 18, p. 37–48, 1987.

FERRARI, E.; CASAROTTI, D.; MUZZONI, B.; ALBERTELLI, N.; CRAVELLO, L.; FIORAVANTI, M.; BRUNO SOLERTE, S.; MAGRI, F. Age-related changes of the adrenal secretory pattern: Possible role in pathological brain aging. **Brain Research Reviews**, v. 37, p. 294 – 300, 2001.

FLOREZ-DUQUET, M.; PELOSO, E.; SATINOFF, E. Fever and behavioral thermoregulation in young and old rats. **American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, p. 1457 – 1461, 2001.

FRANCESCHI, C.; BONAFÉ, M.; VALENSIN, S.; OLIVIERI, F.; de LUCA, M.; OTTAVIANI, E.; de BENEDICTIS, G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 908, p. 244 – 254, 2000.

GINALDI, L.; DE MARTINIS, M.; D'OSTILIO, A.; MARINI, L.; LORETO, M. F.; QUALIGNO, D. The immune system in the elderly III. Innate immunity. **Immunologic Research**, v. 20, p. 117 – 126, 1999.

GINALDI, L.; LORETO , M. F.; CORSI, M. P.; MODESTI, M.; de MARTINIS, M. Immunosenescence and infectious diseases. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 851 – 857, 2001.

GODBOUT, J. P.; CHEN, J.; ABRAHAM, J.; RICHWINE, A. F.; BERG, B. M.; KELLEY, K. W.; JOHNSON, R. W. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice after activation of the peripheral innate immune system. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 10, p. 1329 – 1331, 2005.

GOEHLER, L. E.; RELTON, J. K.; DRIPPS, D.; KIECHLE, R.; TARTAGLIA, N.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: A possible mechanism for immune-to-brain communication. **Brain Research Bulletin**, v. 43, n. 3, p. 357 – 364. 1997.

- GOUJON, E.; PARNET P.; LAYÉ, S.; COMBE, C.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Stress downregulates lipopolisaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines in the spleen, pituitary, and brain of mice. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 9, p. 292 – 303, 1995.
- GRAHAM, P.; SOLANA, R.; REMARQUE, E.; MARIANI, E. Impact of aging on innate immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, p. 703 – 712, 1998.
- GRAHN, D.; NORMAN, D. C.; YOSHIKAWA, T. T. Fever and aging: Central nervous system prostaglandin E2 in response to endotoxin. **Experimental Gerontology**, v. 22, n. 4, p. 249 – 255, 1987.
- GREENE, E. NARANJO, J. N. Degeneration of hippocampal fibers and spatial memory deficit in the aged rat. **Neurobiology of Aging**, v. 8, p. 35 – 43, 1987.
- GRUVER, A. L.; HUDSON, L. L.; SEMPOWSKI, G. D. Immunosenescence of ageing. **Journal of Pathology**, v. 211, p. 144 – 156, 2007.
- HARMAN, D. A theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, v. 11, p. 298 – 300, 1956.
- HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 12, p. 123 – 137, 1988.
- HAZLETT L. D.; MASINICK-MCCLELLAN S. A.; BARRETT R. P. Complement defects in aged mice compromise phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa*. **Current Eye Research**, v. 19, n. 1, p. 26 – 32, 1999.
- HERBERT, T.B.; COHEN, S. Stress and immunity in humans: a metaanalytic review. **Psychosomatic Medicine**, v. 55, p. 364–379, 1993.
- HORI, T.; KATAFUCHI, T.; TAKE, S.; SHIMIZU, N.; NIJIMA, A. The autonomic nervous system as a communication channel between the brain and the immune system. **Neuroimmunomodulation**, v. 4, p. 203– 215, 1995.
- HOSBOER, F.; STALLA, G. K.; VON BARDELEBEN, U.; HAMMAN, K.; MULLER, H.; MULLER, O.A. Acute adrenocortical stimulation by recombinant gamma interferon in human controls. **Life Sciences**, v. 48, p. 1 – 5, 1988.
- HOSHINO, K.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; SANJO, H.; OGAWA, T.; TAKEDA, Y.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 3749–3752, 1999.
- HOSOI, T.; OKUMA, Y.; NOMURA, Y. Electrical stimulation of afferent vagus nerve induces IL-1beta expression in the brain and activates HPA axis. **American Journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 279, n. 1, p. 141 – 147, 2000.

HYDE, S. R.; McCALLUM, R. E. Lipopolysaccharide-tumor necrosis factor-glucocorticoid interactions during cecal ligation and puncture-induced sepsis in mature versus senescent mice. **Infection and immunity**, v. 60, n. 3, p. 976-982, 1992.

IRWIN, M. Psychoneuroimmunology of depression: clinical implications. **Brain Behavior and Immunity**, v. 16, p. 1-16, 2002.

JACOB FILHO, W.; SOUZA, R. R. Anatomia e fisiologia do envelhecimento. In: Caravvalho filho, E. T. (ed.) – Geriatria: fundamentos, clínica e terapêutica. Rio de Janeiro, editora Atheneu, p. 31 – 40, 1994.

KALRA S. P.; DUBE M.G.; PU O. S.; XU B.; HORVATH T. L.; KALRA P. S. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. **Endocrine Reviews** 1999, v. 20, p. 68-100, 1999.

KELLEY, A. E. Locomotor activity and exploration. **Methods in behavioral pharmacology**, v. , p. 499–518, 1993.

KELLEY, S. M.; FELTEN, D. L. Experimental basis for neural-immune interactions. **Physiological review**, v. 75. p. 77-106, 1995.

KENT, S.; BLUTHE, R. M.; DANTZER, R.; HARDWICK, A. J.; KELLYE, K. W.; ROTHWELL, N. J.; VANNICE, J. L. Pyrogenic, anorexic and behavioral effects of interleukin-1 are mediated by different receptor mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 9117 – 9120. 1992.

KENT, S.; BRET-DIBAT, J. L.; KELLEY, K. W. DANTZER, R. Mechanisms of sickness-induced decreases in food-motivated behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 20, n. 1, p. 171 – 175, 1996.

KERNACKI, K. A.; BARRET, R. P.; MCCLELLAN, S. A.; HAZLETT, L. D. Aging and PMN response to *P. aeruginosa* infection. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 41, n. 10, p. 3019 – 3025, 2000.

KIM, Y. K.; MAES, M. The role of cytokines network in psychological stress. **Acta neuropsychiatrica**, v. 15, p. 184-155, 2003.

KIRKWOOD, T. B. L. The origins of human ageing. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences**, v. 352, p. 1765 – 1772, 1997.

KIRKWOOD, T. B. L.; HOLLIDAY, R. The evolution of ageing and longevity. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 205, p. 531 – 546, 1979.

KLUGER, M. J.; RINGLER, D. H.; ANVER, M. R. Fever and survival. **Science**, v. 188, p. 166 – 168, 1975.

KOVACS, E. J.; PLACKETT, T. P.; WITTE, P. L. Estrogen replacement, aging, and cell-mediated immunity after injury. **Journal of Leukocyte Bioloty**, v. 76, n. 1, p. 36 – 41, 2004.

- KURIYAMA, K.; HORI, T.; MORI, T.; NAKASHIMA, T. Actions of interferon α and interleukin-1 β on the glucose-responsive neurons in the ventromedial hypothalamus. **Brain Research Bulletin**, v. 24, n. 6, p. 803 – 810, 1990.
- LANGHANS, W. Anorexia of Infection: Current Prospects. **Nutrition**, v. 16, n. 10, p. 996 – 1005, 2000.
- LARSON, S. J.; COLLINS, S. M.; WEINGARTEN, H. P. Dissociation of temperature changes and anorexia after experimental colitis and LPS administration in rats. **American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 271, n. 4, p. 40 – 44.
- LARSON, S. J.; DUNN, A. J. Behavioral Effects of Cytokines. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 15, p. 371 – 387, 2001.
- LATIMER, K. S.; MAHAFFEY, E. A.; PRASSE, K. W. Veterinary Laboratory Medicine. Clinical Pathology. Fourth Edition. Blackwell Publishing. Duncan & Prasse's. Capítulo 2 (Leukocytes), p. 69, 2003.
- LAYER, S.; PARNET, P.; GOUJON, E.; DANTZER, R. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 27, p. 157 – 162. 1994.
- LEE, A.; Whyte, M. K. B.; Haslett, C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 54, p. 283 – 288. 1993.
- LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J. M.; HOFFMANN, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in drosophila adults. **Cell**, v. 86, p. 973 – 983, 1996.
- LENCZOWSKI, M. J. P.; BLUTHÉ, R. M.; ROTH, J.; REES, G. S.; RUSHFORTH, D. A.; VAN DAM, A. M.; TILDERS, F. J. H.; DANTZER, R.; ROTHWELL, N. J.; LUHESHI, G. N. Central administration of rat interleukin-6 induces hypothalamus-pituitary-adrenal activation and fever but not sickness behavior in rats. **American Journal of Physiology**, v. 276, p. 652 – 658, 1999.
- LINTHORST, A. C.; FLACHSKAMM, C.; MÜLLER-PREUSS, P.; HOLSBOER, F.; REUL J. M. Effect of bacterial endotoxin and interleukin-1 beta on hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioral activity, and free corticosterone levels: an in vivo microdialysis study. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 2920 – 2934, 1995.
- LISTER R. G. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse, **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, p. 180–185, 1987.
- LONGO, V. D.; MITTELDORF, J.; SKULACHEV, V. P. Programmed and altruistic ageing. **Nature Reviews Genetis**, v. 6, p. 866 – 872.

- LORD, J. M.; BUCHER, S.; KILLAMPALI, V.; LASCELLES, D.; SALMON, M. Neutrophil ageing and immunesenescence. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 122, p. 1521 – 1535.
- MACGREGOR, R. R.; SHALIT, M. Neutrophil function in healthy elderly subjects. **Journal of Gerontology**, v. 45, n. 2, p. 55 – 60, 1990.
- MAIER, S. F.; GOEHLER, L. E.; FLESHNER, M.; WATKINS, L. R. The role of vagus nerve in cytokine-to-brain communication. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, p. 289 – 300, 1998.
- MANCUSO, P.; McNISH, R. W.; PETERS-GOLDEN, M.; BROCK, T. G. Evaluation of phagocytosis and arachidonate metabolism by alveolar macrophages and recruited neutrophils from F344xBN rats of different ages. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 122, n. 15, p. 1899 – 1913, 2001.
- MARQUES, A. H.; CIZZA, G.; STERNBERG, E. Brain-immune interactions and implications in psychiatric disorders. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, p. 27-32, 2007.
- MCCARTHY, D. O.; KLUGER, M. J.; VANDER, A. J. Effect of centrally administered interleukin-1 and endotoxin on food intake of fasted rats. **Physiology and Behavior**, v. 36, n. 4, p. 745 – 749, 1986.
- MCCARTHY, D. O.; KLUGER, M. J.; VANDER, A. J. Suppression of food intake during infection: is interleukin-1 involved? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 42, n. 6, p. 1179 – 1182, 1985.
- MCEWEN, B. S.; BIRON, C. A.; BRUNSON, K. W.; BULLOCH, K.; CHAMBERS, W. H.; DHABHAR, F. S.; GOLDFARB, R. H.; KITSON, R. P.; MILLER, A. H.; SPENCER, R. L.; WEISS, J. M. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. **Brain Research Review**, v. 23, n.1-2, p. 79-133, 1997.
- McLACHLAN, J. A.; SERKIN, C. D.; MORREY, K. M.; BAKOUCHE, O. Antitumoral properties of aged human monocytes. **Journal of Immunology**, v. 154, p. 832 – 843, 1995.
- McLAY, R. N.; KASTIN, A. J.; ZADINA, J. E. Passage of interleukin-1-beta across the blood-brain barrier is reduced in aged mice: A possible mechanism for diminished fever in aging. **NeuroimmunoModulation**, v. 8, n. 3, p. 148 – 153. 2000.
- MEDAWAR, P. B. An unsolved problem in biology. **London: H. K. Lewis**, 1952.
- MELLO, S. B. V.; FARSKY, S. H. P.; Sannomiya, P.; Garcia-Leme, J. Inhibition of neutrophil chemotaxis and chemokinesis associated with a plasma protein in aging rats: selective depression of cell responses mediated by complement-derived chemoattractants. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 51, p. 46 – 52. 1992.

- MILES, L.; QUINTANS, J.; CHELMICKA-SCHORR, E.; ARNASON, E. G. W. The sympathetic nervous system modulates antibody response to thymus-independent antigens. **Journal of Neuroimmunology**, v. 1, p. 101-105, 1981.
- MILLER, D.; YOSHIKAWA, T.; CASTLE, S. C.; NORMAN, D. Effect of age on fever response to recombinant tumor necrosis factor alpha in a murine model. **Journals of Gerontology**, v. 6, n. 5, p. 176 – 179, 1991.
- MILLER, N. E. Some psychophysiological studies of motivation and of the behavioral effects of illness. **Bulletin of the British Psychological Society**, v. 17, p. 1 – 20, 1964.
- MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 186 – 192, 2004.
- MONTZOROS C. S.; MOSCHOS S.; AVRAMOPOULOS I.; KAKLAMANI V.; LIOLIOS A.; DOULGERAKIS D. E. GRIVEAS, I.; KATSILAMBROS, N.; FLIER, J.S. Leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor-alpha system in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, p. 3408-3413, 1997.
- MORATO, E. F.; GERBASE DELIMA, M.; GORCZYNSKI, R. M. Conditioned immunosuppression in orally immunized mice. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 10, p. 44-54, 1996.
- MORRISON, J. H.; HOF, P. R. Life and death of neurons in the aging brain. **Science**, v. 278, p. 412 – 419, 1997.
- MOSLEY, R. L. Aging, immunity and neuroendocrine hormones. **Advances in Neuroimmunology**, v. 6, p. 419 – 432, 1996.
- MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**, v. 19, p. 138-46, 1996.
- NAITOH, Y.; FUKATA, J.; TOMINAGA, T.; NAKAI, Y.; TAMAI, S.; MORI, K.; IMURA, H. Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 3, p. 1459-1463, 1988.
- NELSON, K. P.; MARKS, N. L.; HEYEN, J. R. R.; JOHNSON, R. W. Behavior of adult and aged mice before and after central injection of Interleukin-1 β . **Physiology and Behavior**, v. 66, n. 4, p. 673 – 679, 1999.
- NIJIMA, A. The afferent discharges from sensors for interleukin-1 β in the hepatoportal system in the anesthetized rat. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 61, p. 287 – 291, 1996.
- NIWA, Y.; KASAMA, T.; MIYACHI, Y.; KANO, T. Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and parameters of reactive oxygen species in human aging: cross-sectional and longitudinal studies. **Life Sciences**, v. 44, n. 22, p. 1655 – 1664, 1989.

- NORMAN, D. C.; YAMAMURA, R. H.; YOSHIKAWA, T. T. Fever response in old and young mice after injection of interleukin 1. **Journals of Gerontology**, v. 43, n. 4, p. 80 – 85, 1988.
- NOWICKI, B.; SINGHAL, J.; FANG, L.; NOWICHI, S.; YALLAMPALLI, C. Inverse relationship between severity of experimental pyelonephritis and nitric oxide production in C3H/HeJ mice. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 2421 – 2427, 1999.
- O'BRIEN, A. D.; ROSENSTREICH, D. L.; TAYLOR, B. A. Control of natural resistance to *Salmonella typhimurium* and *Leishmania donovani* in mice by closely linked but distinct genetic loci. **Nature**, v. 287, p. 440 – 442, 1980.
- OITZL, M. S.; OERS, V.; SCHÖBITZ, B.; KLOET, E. R. Interleukin-1 β , but not interleukin-6, impairs spatial navigation learning. **Brain Research**, v. 613, p. 160 – 163, 1993.
- OOMURA, Y. Chemical and neuronal control of feeding motivation. **Physiology and Behavior**, v. 44, p. 55 – 560, 1988.
- OTTERNESS, I. G.; SEYMOUR, P. A.; GOLEDN, H. W.; REYNOLDS, J. A.; DAUMY, G. O. The effects of continuous administration of murine interleukin-1 α in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 43, n. 6, p. 797 – 804, 1988.
- OUGHTON, J. A.; PEREIRA, C. B.; DEKREY, G. K.; COLLIER, J. .; FRANK, A. A.; KERKVLIT, N. I. Phenotypic analysis of spleen, thymus, and peripheral blood cells in aged C57B1/6 mice following long-term exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 60 – 69, 1995.
- PAPET, I.; DARDEVET, D.; SORNET, C.; BE'CHEREAU, F.; PRUGNAUD, J.; POYET, C.; OBLED, C. Acute Phase Protein Levels and thymus, spleen and plasma protein synthesis rates differ in adult and old rats. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 1, p. 215–219, 2003.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY M. Validation of open:closed arms entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.
- PELOSO, E.; FLOREZ-DUQUET, M.; BUCHANAN, J. B.; SATINOFF, E. LPS fever in old rats depends on the ambient temperature. **Physiology and Behavior**, v. 78, p. 651 – 654, 2003.
- PIER GB. *Pseudomonas aeruginosa*: a key problem in cystic fibrosis. **ASM News**, v. 64, p. 339–347, 1998.
- PLATA-SALAMAN, C, R., OOMURA, Y.; KAI, Y. Tumor necrosis factor and interleukin-1 β : Suppression of food intake by direct action in the central nervous system. **Brain Research**, v. 448, n. 1, p. 106 – 114, 1988.
- POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M. Y.; HUFFEL, C. V.; DU., X. BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG. M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57Bl/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, p. 2085 – 2088, 1998.

REICHE, E. M.; NUNES, S. O.; MORIMOTO, H. K. Stress, depression, the immune system and cancer. **The lancet Oncology**, v. 5, p. 617-625, 2004.

RITTNER, H. L.; MACHESLKA, H.; STEIN, C. Leucocytes in the regulation of pain and analgesia. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 78, p. 1215 – 1222, 2005.

SAPOLSKY, R. M.; KREY, L. C.; MCEWEN, B. S. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. **Journal of Neuroscience**, v. 5. p. 1222 – 1227. 1985.

SAPOLSKY, R.; RIVIER, C.; YAMAMOTO, G.; PLOSTKY, P.; VALE, W. Interleukin-1 stimulates the secretion of the hypothalamic corticotropin-releasing factor. **Science**, v. 238, p. 522 – 524, 1987.

SATINOFF, E.; McEWEN, G. N. Jr.; WILLIAMS, B. A. Behavioral fever in newborn rabbits. **Science**, v. 193, p. 1139 – 1140, 1976.

SCARPACE, P. J.; MATHENY, M.; BENDER B. S.; BORST, S. E. Impaired febrile response with age: role of thermogenesis in brown adipose tissue. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 200, p. 353 – 358, 1992.

SCHNEIDER, E. L. Infectious diseases in the elderly. **Annals of Internal Medicine**, v. 98, p. 395 – 400, 1983.

SCHOEFFNER, D. J.; WARREN, D. A.; MURALIDHARA, S.; BRUCKNER, J. V.; SIMMONS, J. E. Organ weights and fat volume in rats as a function of strain and age. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 56, p. 449–462, 1999.

SEGRETI, J.; GHEUSI, G.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W.; JOHNSON, R. W. Defect in interleukin-1 β secretion prevents sickness behavior in C3H/HeJ mice. **Physiology and Behavior**, v. 61, n. 6, p. 873 – 878, 1997.

SEYLE H. What is stress? **Metabolism**, v. 5, p. 525 – 530. 1956.

SMITH, E. M.; GALIN, F. S.; LEBOEUF, R. D.; COPPENHAVER, D. H.; HARBOUR, D. V.; BLALOCK, J. E. Nucleotide and amino acid sequence of lymphocyte-derived corticotropin: endotoxin induction of a truncated peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 87, n. 3, p. 1057 – 1060, 1990.

SPADARO, F.; DUNN, A. J. Intracerebroventricular administration of interleukin-1 to mice alters investigation of stimuli in a novel environment. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 4, n. 4, p. 308 – 322. 1990.

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

- TATEDA, K.; MATSUMOTO, T.; MIYAZAKI, S.; YAMAGUCHI, K. Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. **Infeccion and. Immunity**, v. 64, p. 769–774, 1996.
- TIMIRAS, P. S. Definitions, evolution and theories. In: **Hormones and aging**, eds Timiras, P. S.; QUAY, W. D. VERNADAKIS, A, p. 3 – 22. CRC Press, Inc. Boca Ranton, FL, 1995.
- TRITOS N. A.; MANTZOROS C.S. Leptin: its role in obesity and beyond. **Diabetologia**, v. 40, p. 1371- 1979, 1997.
- VAM DAM, A. M.; BROUNS, M.; LOUISSE, S.; BERKENBOSCH, F. Appearance of interleukin-1 in macrophages and in ramified microglia in the brain of endotoxin-treated rats: A pathway for the induction of non-specific symptoms of sickness? **Brain Research**, v. 588, n. 2, p. 291 – 296, 1992.
- VAUGHN, L. K.; BERNHEIM, H. A.; KLUGER, M. J. Fever in lizard *Dipsosaurus dorsalis*. **Nature**, v. 252, p. 473 – 474, 1974.
- WACHULEC, M.; PELOSO, E.; SATINOFF, E. Individual differences in response to LPS and psychological stress in aged rats. **American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 272, p. 1252 – 1257, 1997.
- WATKINS, L. R.; GOEHLER, L. E.; RELTON, J. K.; TARTAGLIA, N.; SILBERT, L.; MARTIN, D.; MAIER, S. F. Blockage of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. **Neuroscience Letters**, v. 183, p. 27 – 31, 1995.
- WENISCH, C.; PATUTA, S. DAXBO, F.; KRAUSE, R.; HO, W. Effect of age on human neutrophil function. **Journal of Leukocyte Bioloty**, v. 67, p. 40 – 45, 2000.
- WICK, G.; HU, Y.; SCHWARZ, S.; KROEMER, G. Immunoendocrine communication via the hypothalamo–pituitary–adrenal axis in autoimmune diseases. **Endocrine Reviews**, v. 14, p. 539–563, 1993.
- WIECZOREK, M.; SWIERGIEL, A. H.; POURNAJAFI-NAZARLOO, H.; DUNN, A. J. Physiological and behavioral responses to interleukin-1 β and LPS in vagotomized mice. **Physiology and Behavior**, v. 82, p. 500 – 511, 2005.
- WILLIAMS, C. G. Pleiotropic, natural selection and the evolution of senescence. **Evolution**, v. 11, p. 389 – 411, 1957.
- WIRTH-DZIECIOLOWSKA, E.; CZUMINSKA K. Longevity and aging of mice from lines divergently selected for body weight for over 90 generations. **Biogerontology**, v. 1, p. 171–178, 2000.
- YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K.; AKIRA S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. **Molecular Immunology**, v. 40, p. 861–868, 2004.

YIRMIYA, R.; AVISTUR, R.; DONCHIN, O.; COHEN, E. Interleukin-1 inhibits sexual behavior in femal byt not male rats. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 9, p. 220 – 233, 1995.

YOSHIKAWA, T. T. Geriatric infectious diseases. An emerging problem. **Jorunal of the American Geriatrics Society**, v. 31, p. 34 – 39. 1983.