

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia

Dissertação de Mestrado:

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL CITOCINÉRGICO NO HIPOCAMPO DE FILHOTES

MANIPULADOS NO PERÍODO NEONATAL E CONTROLES

Aluno: Cláudio Felipe Kolling da Rocha

Orientação: Aldo Bolten Lucion

Co-orientação: Carmem Juracy Silveira Gottfried

Porto Alegre, Março de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia

Dissertação de Mestrado:

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL CITOCINÉRGICO NO HIPOCAMPO DE FILHOTES

MANIPULADOS E CONTROLES

Aluno: Cláudio Felipe Kolling da Rocha

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do professor Dr. Aldo Bolten Lucion, como requisito parcial para obtenção de grau de mestre.

“A mais bela experiência que podemos vivenciar é a do mistério. É a emoção fundamental existente na origem da verdadeira arte e ciência. Aquele que não a conhece e não pode se maravilhar com ela está praticamente morto e seus olhos estão ofuscados.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais pelas “*lambidas*” em quantidade adequada. Agradeço pelo apoio sempre presente, tanto emocional quanto financeiro.

Agradeço aos meus irmãos pelo apoio e carinho, e pela fé que sempre depositaram em mim.

Agradeço ao meu orientador por me permitir ser um livre pensador e estimular essa característica em seus alunos.

Agradeço à minha co-orientadora pela parceria e apoio nos momentos em que a vontade era abandonar tudo.

Agradeço aos colegas do laboratório 11 pelos momentos de descontração e trabalho e por sempre tornarem tudo mais fácil e divertido.

Agradeço à Silvia do laboratório 21 da bioquímica pelo apoio na difícil jornada de decifrar os protocolos experimentais da Bencton e Dicson.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelos já 6 anos de abrigo e investimento.

Agradeço ao programa de pós-graduação em ciências biológicas: fisiologia pelo acompanhamento nesses dois anos e, também, nos próximos quatro.

E por fim, agradeço aos órgãos de fomento que tornaram a realização desse trabalho possível: CNPq, CAPES e FAPERGS

I. SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
I. SUMÁRIO.....	6
II. LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
III. LISTA DE FIGURAS.....	11
RESUMO	12
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Período Perinatal	14
1.2 Experiências no Período Perinatal e Desenvolvimento.....	15
1.2.1 Intervenções Severas e suas Repercussões	17
1.2.2 Intervenções Moderadas - Manipulação Neonatal	17
1.3 Neuroimunologia	19
1.4 Citocinas.....	22

1.4.1	Fator de Necrose Tumoral (TNF).....	22
1.4.2	Interleucina 1 beta (IL-1 β).....	23
1.4.3	Interleucina 10 (IL-10).....	23
1.4.4	Interleucina 6 (IL-6).....	24
1.4.5	Interleucina 4 (IL-4).....	24
1.4.6	Interferon Gama (INF- γ).....	24
1.4.7	Citocinas e o Sistema Nervoso Central	25
2.	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo geral.....	27
2.2	Objetivos específicos	27
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	Animais.....	29
3.1.1	Ninhadas.....	29
3.2	Manipulação Neonatal.....	30
3.3	Grupos.....	30
3.3.1	Controle.....	30
3.3.2	Manipulação até o 5º dia	30
3.4	Coleta de Tecidos.....	31
3.5	Extração de proteína dos tecidos	31
3.6	Quantificação de Citocinas por ELISA	31

3.7	Quantificação de Citocinas por CBA	33
3.8	Quantificação de Proteínas Totais	33
3.9	Análise Estatística	33
4.	RESULTADOS	35
4.1	Interleucina 1 β	35
4.2	Interleucina 4	35
4.3	Interleucina 6	36
4.4	Interleucina 10	36
4.5	Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)	36
4.6	Interferon Gama (INF- γ).....	37
5.	DISCUSSÃO	41
6.	CONCLUSÕES	47
7.	PERSPECTIVAS	49
8.	REFERÊNCIAS	50

II. LISTA DE ABREVIATURAS

5HT – Serotonina ou 5 hidroxí-triptofano

ACh – Acetilcolina

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico ou corticotrofina

AP – Área Postrema

APOM – Área Pré-óptica Medial

AVP – Arginina-vasopressina

CBA – *Cytometric Bead Array*

CRF – Fator Liberador de Corticotrofina

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina ou CRF

EDTA – Ácido Etilendiamino tetra acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

ELISA – Enzyme Linked Immune Sorbent Assay

GCs – Glicocorticóides

GR – Receptor de Glicocorticóides

HHA – Hipotálamo-hipófise-adrenal

IGF-1 – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

IL-10 – Interleucina 10

IL1-ra – Antagonista do receptor de interleucina 1 (*Interleukin 1 receptor antagonist*).

IL-1 α - Interleucina 1 alfa

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

INF- γ – Interferon Gama

LPS – Lipopolissacarídeo

MHCII – Complexo Maior de histo-compatibilidade de Classe II

NPV – Núcleo Paraventricular

NSO – Núcleo Supra-óptico

NTS – Núcleo do Trato Solitário

OVLT – Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal

PMSF – *phenylmethanesulfonylfluoride*

SI – Sistema Imune

SNC – Sistema Nervoso Central

SNS – Sistema Nervoso Simpático

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

VLM – Bulbo ventrolateral – *ventrolateral medula*

α -MSH – Hormônio Estimulador de Melanócitos Alfa

III. LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Demonstração dos tratamentos recebidos por cada grupo do experimento.

Figura 4.1 – Conteúdo de Interleucina 1 beta no hipocampo de filhotes de ratos no 5º dia de vida pós-natal

Figura 4.2 – Conteúdo de Interleucina 1 beta no hipocampo de filhotes de ratos no 5º dia de vida pós-natal, com separação por sexo.

Figura 4.3 – Conteúdo de Interleucina 6 no hipocampo de filhotes de ratos no 5º dia de vida pós-natal

Figura 4.4 – Conteúdo de Interleucina 6 no hipocampo de filhotes de ratos no 5º dia de vida pós-natal, com separação por sexo

Figura 4.5 – Conteúdo de Fator de Necrose Tumoral Alfa no hipocampo de filhotes de ratos no 5º dia de vida pós-natal

Figura 4.6 – Conteúdo de Fator de Necrose Tumoral Alfa no hipocampo de filhotes de ratos no 5º dia de vida pós-natal com separação por sexo

RESUMO

No início da década de 50 foi primeiramente descrito que mamíferos apresentam um período de hiporresponsividade ao estresse, durante o qual estímulos normalmente estressores não elicitam uma resposta clássica, com aumento de glicocorticóides circulantes. Desde então, tem-se estudado intervenções nesse período e efeitos na idade adulta. Algumas intervenções, consideradas severas, conseguem induzir resposta ao estresse, como separação maternal repetida (mais de 30 minutos por dia) e privação materna (separação da mãe por 24h ou mais). No entanto, intervenções moderadas, como a manipulação neonatal (separação acompanhada de manipulação gentil durante 1 a 10 minutos por dia), não desencadeiam resposta ao estresse, mas levam a uma série de alterações morfofuncionais e comportamentais, indicando que algum tipo de resposta às variações ambientais está presente. Existem muitos trabalhos descrevendo os efeitos a curto e longo prazo da manipulação neonatal, no entanto pouco se sabe sobre os mediadores de tais alterações.

As citocinas imunológicas vêm sendo descritas como de grande importância para o funcionamento do sistema nervoso central (SNC), tanto em processos patológicos

quanto fisiológicos. Estão presentes durante a formação e desenvolvimento do SNC desempenhando funções como indução da proliferação, migração e diferenciação celular.

Nesse contexto, ao estudarmos o perfil citocinérgico no hipocampo de ratos manipulados até o 5º dia de vida pós-natal, encontramos aumento nos níveis de interleucina 1 beta (IL-1 β) e redução nos níveis de interleucina 6. A IL-1 β tem sido descrita como um importante indutor de neurogênese hipocampal em animais jovens e adultos, enquanto a interleucina 6 apresenta efeito oposto. Juntos, o aumento de IL-1 β e a redução de IL-6 podem estar criando um ambiente favorável à proliferação celular hipocampal que, por sua vez, pode estar envolvido nas alterações cognitivas e de regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal encontradas em animais manipulados no período neonatal.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Período Perinatal

Ao longo do processo evolutivo alguns grupos de animais desenvolveram estratégias de sobrevivência complementares e alternativas à estratégia vigente de procriar em grandes números e curtíssimos espaços de tempo, assumindo novas razões energia gasta/sucesso reprodutivo. As proles são relativamente menores do que as de outros animais, no entanto, o emprego do cuidado parental funciona como uma forma adicional de garantir a sobrevivência do indivíduo e o sucesso da espécie. Os ratos e humanos estão entre os principais exemplos, uma vez que são animais altriciais: nascem com sistemas motor e sensorial pouco desenvolvidos, dependendo do cuidado parental para sobreviver.

O período de tempo que circunda o nascimento é chamado de período perinatal variando muito de duração entre diferentes espécies, estando muito bem caracterizados em ratos. Constitui um período crítico da vida no qual as experiências vividas pelo animal irão influenciar de forma definitiva seu desenvolvimento e suas caracterís-

ticas morfofisiológicas e comportamentais quando jovem e adulto. O cuidado parental é essencial durante esse período, sendo que a experiência vivida pelos genitores pode alterar o cuidado para com a prole, funcionando como uma via de informação do contexto externo para os filhotes (*Macrì et al. 2007*). As alterações do cuidado parental por sua vez induzem a alterações significativas no desenvolvimento do filhote, como se fosse uma tentativa de preparar o animal para o ambiente no qual ele irá viver. A adaptação desse animal, no entanto, dependerá de fatores como o ambiente continuar o mesmo durante desenvolvimento e de o organismo desse animal ter interpretado corretamente as dicas passadas através do cuidado parental (*Liu et al. 1997; Würbel 2001*).

Durante esse período o filhote apresenta toda uma biologia diferenciada, sendo esta o substrato sobre o qual irão atuar possíveis intervenções, gerando modificações a longo prazo. Como já citamos acima, são animais altriciais: capacidade de locomoção extremamente reduzida, audição ineficiente, olhos fechados e sistema nervoso imaturo, sendo o tato, o olfato e as vocalizações as principais formas de interação com o mundo. Uma característica marcante da fisiologia do neonato é a hiporresponsividade ao estresse, traduzida por uma resposta inexistente ou atenuada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HHA) a estímulos normalmente considerados estressores para animais jovens e adultos (*Levine 1957a; Levine 1962; Levine 2001*).

1.2 Experiências no Período Perinatal e Desenvolvimento

A noção de que as experiências no período neonatal podem influenciar o comportamento e a fisiologia do adulto já vem de muito tempo, datando do início do sécu-

lo XX com as sugestões de Freud de que a neurose advinha de experiências da infância (Freud 1918; Macrì et al. 2011).

A partir de meados do mesmo século o tema começou a atrair interesse da comunidade científica e evidências experimentais começaram a ser produzidas (Weininger 1954; Macrì et al. 2011). A partir de então inúmeras evidências dão suporte e descrevem a influência das experiências no período neonatal sobre o repertório comportamental e a homeostasia do adulto nas mais diversas espécies: pássaros (Groothuis et al. 2005); porcos-da-índia (Hennessy et al. 2006), ratos (Padoin et al. 2001); camundongos e primatas não-humanos (Cirulli et al. 2009).

Os modelos animais que visam estudar como o ambiente neonatal pode influenciar o desenvolvimento do animal podem ser divididos, de forma geral, em dois tipos de intervenção: moderada e severa. Como exemplos de intervenções moderadas temos o forrageamento¹ sob condições de desafio moderado (Macrì et al. 2007) e o procedimento conhecido por *gentling*, *handling* ou manipulação, primeiramente descrito por Otto Weininger na década de 50 (Weininger 1954) e Seymour Levine (Levine 1957a; Levine 1957b). Uma variação desse último modelo é a intervenção utilizada nesse trabalho e será abordada em mais detalhes posteriormente. Dentre as formas de intervenção severa temos o forrageamento sob alta demanda (Macrì et al. 2007), separação maternal prolongada (Macrì et al. 2004b; Rüedi-Bettschen et al. 2004) e exposição a altos níveis de corticosterona (Yority et al. 2004). As intervenções modera-

¹ No caso de roedores, e no contexto apresentado, consiste na saída da mãe do ninho para a busca de alimento.

das e severas diferem não apenas na intensidade da intervenção, mas também quanto à resposta ao estímulo e ao desfecho no repertório comportamental e fisiológico do animal ainda quando filhote e também na idade jovem e adulta (Macri et al. 2011).

1.2.1 Intervenções Severas e suas Repercussões

Dentre os principais paradigmas de estresse neonatal severo estão a separação maternal prolongada, 4 a 6 horas diárias por uma ou duas semanas (Macri et al. 2004b; Rüedi-Bettschen et al. 2004) e a privação materna, uma única separação de 24h durante a segunda semana de vida (Macri et al. 2004a). Os animais submetidos a esses protocolos mostram uma resposta aumentada ao estresse e ao medo (Huot et al. 2004; Macri et al. 2004a), aumento na expressão e liberação de fator liberador de corticotrofina (CRF) no hipotálamo, aumento dos níveis de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) circulante e conseqüente produção aumentada de corticosterona além de expressão cortical reduzida de receptores de glicocorticóides (GR) (Huot et al. 2004), menor mobilidade na tarefa de nado forçado, um indicador de depressão (Lee et al. 2007), e desempenho reduzido em tarefas de memória dependente de hipocampo, como o labirinto aquático de Morris (Huot et al. 2002).

1.2.2 Intervenções Moderadas - Manipulação Neonatal

No início dos anos 50 foi primeiramente demonstrado que a manipulação neonatal (MN), separar mãe e filhotes e gentilmente tocá-los por 10 minutos nas primeiras três semanas de vida, era capaz de atenuar os efeitos de estressores e o comportamento induzido por medo em filhotes de ratos (Weininger 1954). Na segunda metade da mesma década, uma segunda publicação apresentou resultados semelhantes com uma forma mais branda de intervenção, separação mãe-filhotes por 3 minutos duran-

tes as três primeiras semanas de vida, sem manipulação. Desde então inúmeros trabalhos com manipulação neonatal têm demonstrado sua ação reguladora sobre o eixo HPA e seus efeitos a longo prazo. Macrì e Würbel, em uma revisão (Macrì *et al.* 2006), citam os resultados de alguns deles: ratos adultos que sofreram manipulação no período neonatal têm baixa ativação do eixo HPA em resposta ao estresse, maior movimentação e menor defecação no teste de campo aberto; níveis reduzidos de corticosterona e ACTH em resposta a um estressor; restabelecimento mais rápido dos níveis de corticosterona após um evento estressor; e menor expressão de CRF no hipotálamo. Em suma, ratos manipulados durante o período hiporresponsivo apresentam um *feedback* negativo aumentado para glicocorticóides, diretamente relacionado com o aumento da expressão de receptores para glicocorticóides no hipocampo (Meaney 2001).

Estudos realizados pelo nosso grupo corroboram os dados que demonstram que mesmo intervenções moderadas podem induzir efeitos pronunciados sobre o desenvolvimento. Encontramos associação entre o procedimento de separação maternal breve acompanhada de manipulação e alterações plásticas no hipotálamo, com redução do número de células nos núcleos paraventricular (NPV) e supra-óptico (NOS) (Winkelmann-Duarte *et al.* 2007) e área pré-óptica medial (APOM) (Camozzato *et al.* 2009) em fêmeas; redução do número de neurônios positivos para ocitocina na porção parvocelular do NPV e redução do número de neurônios positivos para vasopressina na porção magnocelular do mesmo núcleo (Todeschin *et al.* 2009); redução no número de receptores para angiotensina II no NPV e APOM (Gomes *et al.* 2006); além de aumento no número de células no hipocampo (dados não publicados) e redução no número de células no *locus coeruleus* (Lucion *et al.* 2003), importante núcleo modulatório

do tronco encefálico, indicando profundas alterações nos centros reguladores das respostas endócrinas desses animais.

Nossos estudos mostram ainda alterações de cunho comportamental, como redução da resposta de medo condicionado e inato (Madrugá *et al.* 2006), redução do tempo de investigação social e aumento de agressividade em machos (Todeschin *et al.* 2009) e aumento de medo e agressividade em fêmeas de 8 dias (Giovenardi *et al.* 2005); além de alterações fisiológicas interessantes como a indução de ciclo estral-anovulatório (Gomes *et al.* 1999).

1.3 Neuroimunologia

Durante muito tempo o sistema imunológico (SI) foi visto e estudado como um sistema de função única: proteger o organismo contra ataques externos de patógenos. Nas últimas décadas, um olhar mais atento nos permitiu descobrir que ele não só é o grande responsável pela proteção do organismo durante processos patológicos, mas também apresenta inúmeras funções em processos fisiológicos (Ziv *et al.* 2008).

Inicialmente o sistema imunológico era estudado com um sistema composto por células difusas com diferentes funções trabalhando em conjunto para proteção do organismo. A partir das observações de que estados de humor poderiam facilitar ou dificultar o desenvolvimento de uma infecção, passou-se a investigar uma possível ligação entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imunológico. A primeira grande relação descrita foi o papel dos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, os glicocorticóides e a adrenalina, sobre os componentes do sistema imune. Com o passar do tempo se evidenciou que a interação entre sistema nervoso e imunológico era muito mais complexa do que isso, com a participação das moléculas de sinalização do sis-

tema imune, as citocinas, na modulação de diversas funções do sistema nervoso central, como resposta ao estresse (*Turnbull et al.* 1999), e proliferação e diferenciação celular (*Butovsky et al.* 2006b). Como as citocinas são um tema chave neste trabalho, serão discutidas em maiores detalhes em um tópico específico.

Ainda dentro do contexto de interação entre o SI e o SNC, uma das grandes descobertas dos últimos dez anos foi a relativa inexistência de locais imunologicamente privilegiados², dos quais o maior exemplo sempre foi o sistema nervoso central (SNC). Para a grande surpresa da comunidade científica verificou-se que o SNC não se caracteriza como um local imunologicamente privilegiado na concepção clássica do termo uma vez que células T periféricas migram através do plexo coróide e outras vias (*Kleine et al.* 2006) e que a sua presença é essencial para o correto funcionamento e desenvolvimento desse sistema através da sustentação do perfil citocinérgico local (*Kipnis et al.* 2004). Atualmente um grande volume de evidências tem sido publicadas demonstrando que em condições fisiológicas existem células do sistema imune, linfócitos T primariamente de memória, no sistema nervoso central. Mais interessante ainda é o fato de esses linfócitos serem auto-reativos e estarem sobre forte influência de uma segunda classe de linfócitos T chamados de células T reguladoras, que expressam os marcadores de superfície CD4 e CD25 (células T CD4+CD25+).

A presença de células T auto-reativas no SNC pode ser vista como um balanço evolutivo entre risco e necessidade, uma vez que são essenciais para o correto funcio-

² Aceita-se por local imunologicamente privilegiado os compartimentos desprovidos de células do sistema imune em condições fisiológicas.

namento do sistema e, ao mesmo tempo, são as mesmas células que medeiam os efeitos de doenças auto-imunes como esclerose múltipla(Schwartz *et al.* 2002).

Em condições fisiológicas, nas quais os mecanismos de defesa do organismo estejam intactos, não se encontra nenhum antígeno estranho no sistema nervoso central. Dessa forma as respostas imunes protetoras em caso de lesão devem ser mediadas por apresentação de antígenos próprios e liberadas pela desinibição das células T reguladoras mediante um sinal de perigo. De fato evidências apontam para um papel protetor dessas células auto-reativas na recuperação do SNC após lesão(Moalem *et al.* 1999; Hauben *et al.* 2000).

Durante eventos lesivos, que podem ser considerados um sinal de perigo e, conseqüentemente, um sinal de desinibição das células T regulatórias, ocorre a ativação de células apresentadoras de antígenos, como células microgliais e dendríticas, que interagem com as células T auto-reativas iniciando uma resposta imunológica capaz de estimular a produção de fatores neurotróficos(Moalem *et al.* 2000; Muhallab *et al.* 2002), como citocinas, e estabelecer um fenótipo microglial protetor, evitando uma lesão mais pronunciada.

Tendo em vista o papel do sistema imune na recuperação de lesões do SNC, Ziv e Schwartz (2008) propuseram a idéia de que células T auto-imunes não são importantes apenas para a recuperação do SNC em processos patológicos, mas também para a sustentação dos estados fisiológicos e do correto funcionamento dos processos cognitivos. Essa proposta foi baseada em estudos anteriores nos quais se evidenciou que camundongos desprovidos de sistema imunológico (SCID e *nude*) apresentam neurogênese hipocampal reduzida em comparação com o fenótipo selvagem, que poderia

ser parcialmente restaurada pela adição de um sistema imune a esses animais. (Ziv *et al.* 2006). Outro dado interessante é o desempenho reduzido desses animais em tarefas de memória espacial (Labirinto aquático de Morris), que dependem de hipocampo, tendo seu desempenho melhorado pelo restabelecimento do sistema imune (Kipnis *et al.* 2004), de forma similar ao que ocorre com o processo de neurogênese, indicando um papel essencial do componente imunológico sobre o correto funcionamento do SNC.

1.4 Citocinas

As citocinas são moléculas protéicas secretadas pelas células do sistema imune e também por inúmeras outras células, com função de sinalização autócrina, parácrina, mas que também podem agir de forma endócrina, semelhante à sinalização hormonal, mediando a comunicação entre regiões diversas do organismo.

Além da constatação inicial de que essas moléculas atuam como meio de comunicação do sistema imune, muitas funções novas vêm sendo descritas, como a de mediadores da comunicação entre o sistema nervoso central e o restante do organismo informando ao primeiro o estado fisiológico do segundo e vice-versa.

1.4.1 Fator de Necrose Tumoral (TNF)

O TNF- α , ou apenas TNF, é um dos principais mediadores da resposta inflamatória aguda em resposta a infecções bacterianas. Sua principal função imunológica descrita é o recrutamento para o local de infecção de monócitos e neutrófilos e consequente ativação dessas células com o intuito de erradicar o microorganismo (Abbas *et al.* 2005).

Quando produzido em grandes quantidades apresenta ações sistêmicas como a indução de febre por ação direta em células hipotalâmicas, sendo, em conjunto com a Interleucina 1 beta, considerado o pirógeno endógeno derivado do hospedeiro. Age também sobre os hepatócitos induzindo a produção de proteínas envolvidas no processo inflamatório como proteína amilóide A sérica e fibrinogênio (*Abbas et al. 2005*).

Uma importante característica do TNF é sua capacidade de agir sobre fagócitos mononucleados, como os macrófagos e células da microglia, induzindo a secreção de IL-1 β , uma citocina com funções semelhantes as do TNF e que será discutida a seguir.

1.4.2 Interleucina 1 beta (IL-1 β)

A IL-1 β , assim como o TNF, é uma citocina da imunidade inata mediadora da resposta inflamatória que, quando em pequenas concentrações, possui ação local de recrutamento de células e manutenção da resposta inflamatória. Ainda de forma análoga ao TNF, quando em grandes concentrações possui ações centrais de indução de febre ao agir sobre células hipotalâmicas induzindo a produção de prostaglandinas, além de induzir a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado (*Abbas et al. 2005*).

Além da interleucina 1 beta, existem duas outras moléculas envolvidas nos processos de sinalização mediados pelos receptores de interleucina 1, são elas a interleucina 1 alfa (IL-1 α) e o antagonista de receptor de interleucina 1 (IL-1ra), que juntas formam o sistema de sinalização interleucina 1.

1.4.3 Interleucina 10 (IL-10)

É a principal citocina delimitadora de resposta inflamatória. Tem funções antagônicas as do TNF e da IL-1 β , contendo e até mesmo extinguindo o processo inflama-

tório. Age sobre os fagócitos mononucleados revertendo a ativação induzida pelas citocinas anteriormente descritas (Abbas et al. 2005).

1.4.4 Interleucina 6 (IL-6)

A interleucina 6 pode ser considerada uma citocina tanto da imunidade inata quanto adaptativa. Exerce funções como a estimulação da produção de neutrófilos por células precursoras da medula óssea e indução da produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, funções características da imunidade inata. Ela é comumente produzida por fagócitos mononucleados e outras células em resposta a infecção por microorganismos e por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF, atuando também sobre células da imunidade adaptativa, como linfócitos B, induzindo sua diferenciação em células produtoras de anticorpos (Abbas et al. 2005), sendo o braço de ligação entre esses dois tipos de resposta.

1.4.5 Interleucina 4 (IL-4)

É o principal estímulo para diferenciação de linfócitos T CD4⁺ virgens em linfócitos T auxiliares de padrão Th2. Funciona também como um fator de crescimento autócrino para essas células. Tem ação sobre as células B induzindo a troca de classe da cadeia pesada das imunoglobulinas para o isotipo IgE.

1.4.6 Interferon Gama (INF- γ)

O INF- γ é a principal citocina ativadora de macrófagos, exercendo funções de grande importância tanto na imunidade inata quanto adaptativa mediada por células. Ao contrário dos demais interferons, ou INFs tipo I, não apresenta grande atividade antiviral, sendo preferencialmente uma citocina efetora de respostas imunes. Facilita a

ativação de macrófagos por linfócitos T e células NK, essenciais para estruturação de uma resposta imunológica contra microrganismos fagocitados. Estimula a produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos, sendo essa uma das principais formas de inativação do patógeno.

Na resposta celular, também induz a diferenciação de linfócitos T auxiliares em T_h1 inibindo a proliferação de células T_h2.

1.4.7 Citocinas e o Sistema Nervoso Central

As células da microglia apresentam papel chave no efeito que o sistema imune exerce sobre o sistema nervoso, uma vez que são as principais produtoras de citocinas, em especial pró-inflamatórias, do SNC. A ativação dessas células por compostos como o lipopolissacarídeo (LPS) e o peptídeo beta-amilóide, que podem exercer efeito direto sobre essas células através de receptores específicos, faz com que elas assumam um fenótipo deletério que modula negativamente a neurogênese através da produção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Butovsky *et al.* 2005), sendo que esses efeitos deletérios podem ser revertidos com o uso de drogas antiinflamatórias.

Embora processos inflamatórios como o descrito acima possam indicar um papel prejudicial do SI sobre o SNC, outros efeitos são descritos na literatura. Estudos utilizando co-culturas de microglia com precursores neurais de hipocampo de ratos adultos demonstraram que níveis moderados de citocinas derivadas de células T, como IL-4 (T_h2) e INF-g (T_h1), induzem um fenótipo microglial de suporte à neurogênese com produção de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), aumento da expressão do complexo maior de histo-compatibilidade de classe II (MHC de classe II),

característico de microglia ativada, associado à produção de baixos níveis de TNF (*Butovsky et al. 2005; Butovsky et al. 2006b*). Estudos *in vivo* mostram que a injeção de IL-4 e INF- γ no fluido cerebroespinal, anterior ao desafio com LPS, em animais saudáveis aumenta o número de neurônios recém formados, além de prevenir a ativação da microglia e produção de TNF, o que levaria a um fenótipo deletério para a neurogênese (*Ziv et al. 2008*). Em contrapartida, exposição a níveis aumentados de citocinas derivadas de células T, como o INF- γ , por períodos prolongados, pode induzir à formação de uma resposta inflamatória acentuada com indução de fenótipo microglial prejudicial levando a redução da renovação celular (*Butovsky et al. 2006a*), indicando a dualidade de efeito dessas moléculas dependendo da dose e tempo de exposição.

A interleucina 1 beta é descrita como importante mediador de alterações morfológicas e comportamentais no sistema nervoso central em desenvolvimento em resposta a processos inflamatórios ocorridos na infância ou durante a gestação. Níveis elevados dessa proteína reduzem a neurogênese hipocampal (*Ziv et al. 2008*). No entanto níveis moderados dessa proteína são necessários para o correto funcionamento dos processos cognitivos (*Avital et al. 2003*) e da neurogênese hipocampal (*McPherson et al. 2010*).

As citocinas imunológicas têm um papel importante sobre a regulação da proliferação celular no sistema nervoso central e a sustentação da neurogênese e gliogênese em adultos, apresentando uma dualidade de ação dependendo de suas concentrações, podendo estimular ou inibir a renovação celular. Outro fator importante na atividade dessas moléculas é a sua inter-relação, sendo o contexto citocinérgico tão importante quanto a atividade individual de cada uma delas (*Ziv et al. 2008*).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar se o procedimento de manipulação neonatal interfere com a regulação de processos imunológicos no sistema nervoso central, alterando os níveis de citocinas do padrão de resposta adaptativa Th1 e Th2 e resposta inata (IL-1 β , TNF e IL-6) no hipocampo desses animais, uma vez que o balanço entre estas citocinas é importante para a manutenção do sistema nervoso central, principalmente nos aspectos de proliferação e diferenciação celular, verificando a possibilidade de serem mediadores da resposta às variações no ambiente perinatal.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar as citocinas de padrão de resposta adaptativa Th1 (INF- γ) e Th2 (IL-4 e IL-10), no em hipocampo de ratos machos e fêmeas, manipulados e controles, de cinco dias de vida.

- Quantificar as citocinas de padrão de resposta inata IL-1 β e TNF- α em hipocampo de ratos machos e fêmeas, manipulados e controles, de cinco dias de vida.
- Quantificar a citocinas de padrão de resposta inata e adaptativa IL-6 em hipocampo de ratos machos e fêmeas, manipulados e controles, de cinco dias de vida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratas prenhas foram obtidas do Biotério central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo transportadas ao biotério setorial do laboratório aproximadamente uma semana antes do parto. Cada prenha é colocada em uma caixa individual (com as seguintes dimensões: 65 x 55 x 25 cm), sendo observadas diariamente para controle do dia de nascimento dos filhotes e aplicação dos diferentes tratamentos. Após o nascimento todas as caixas continuam recebendo acompanhamento diário para avaliação das condições da ninhada e da mãe.

As condições ambientais são temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclo claro escuro 12-12h e comida e água *ad libitum* (Rodent Show, Nutrilab, Colombo, Brasil).

3.1.1 Ninhadas

Nesse experimento foram utilizadas 24 fêmeas prenhas sendo que, com as perdas por morte de ninhada, mãe comer os filhotes e ninhadas abaixo de 8 filhotes, tivemos um total de 15 ninhadas, 7 controles e 8 manipuladas. De cada ninhada fora

coletados 2 machos e 2 fêmeas, sendo um animal de cada sexo para dosagem e o outro para armazenamento de material como duplicata.

3.2 Manipulação Neonatal

A separação maternal seguida de manipulação neonatal consiste no seguinte protocolo:

- Levar a caixa-moradia do biotério para uma sala adjacente onde há menor estimulação sensorial, estando esta ambientada à temperatura e ao ciclo claro-escuro a que os animais estão submetidos no biotério;
- Retirar a mãe da caixa-moradia, colocando-a em uma caixa próxima;
- Pegar a ninhada toda de uma vez com as duas mãos, manipulando-a gentilmente durante um minuto.
- Devolver a mãe à caixa-moradia, e retornar essa ao biotério.

3.3 Grupos

3.3.1 Controle

O grupo controle consiste em animais que sofrem apenas uma intervenção no primeiro dia de vida para a padronização das ninhadas em oito filhotes (Figura 3.1 - A).

3.3.2 Manipulação até o 5º dia

Este grupo sofre uma intervenção no primeiro dia de vida para a padronização da ninhada e também o procedimento de manipulação neonatal do primeiro ao quinto dia de vida pós-natal (Figura 3.1 - B).



Figura 3.1 – Demonstração dos tratamentos recebidos por cada grupo do experimento. (A) Filhotes Controles; (B) Filhotes Manipulados;

3.4 Coleta de Tecidos

No 5º dia de vida pós-natal, animais controles e manipulados (30 a 60 minutos após a última manipulação) foram sacrificados por decapitação e o encéfalo foi dissecado sobre uma placa no gelo. Foi coletado o hipocampo seguindo-se o congelamento rápido em isopentano resfriado com gelo seco.

3.5 Extração de proteína dos tecidos

Para efetuar as dosagens das citocinas anteriormente citadas os tecidos foram homogeneizados em aproximadamente 250µl de tampão contendo Tris-HCl 10mM pH 7,4, EDTA 1mM, PMSF 0,001mM, pepstatina 1µg/ml e Triton X-100 1%, permanecendo por 1 hora em gelo. Após as amostras foram centrifugadas em 12000g por 25 minutos e o sobrenadante foi coletado em diferentes alíquotas para dosagem por ELISA, CBA e quantificação de proteínas.

3.6 Quantificação de Citocinas por ELISA

Para medir os níveis de interleucina-1 beta (IL-1β) nos tecidos coletados utilizamos kits de ELISA específicos para IL-1β de rato da eBioscience. Nº de catálogo 88-6010-22. Todo o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

te. O método de ELISA foi escolhido por não haver kits disponíveis para medição por citometria de fluxo.

ELISA é um imunoensaio, utiliza um ou mais anticorpos específicos para um determinado antígeno, que depende de uma enzima para a detecção/quantificação da molécula de interesse.

Embora existam diversas variações, o princípio comum envolve um conjugado anticorpo-enzima, sendo esta geralmente uma peroxidase, que se ligará ao antígeno revelando sua presença após a conversão de um substrato em uma cor detectável e quantificável. O ELISA pode ser, simplificarmente, dividido nas seguintes etapas:

1. Sensibilização: uma placa acrílica de 96 é revestida com o anticorpo (quando se quer detectar antígenos) ou antígeno (quando se quer detectar anticorpos) de escolha.
2. Ligação: a substância contendo o antígeno ou anticorpo a ser dosado é posta em contato com os poços da placa para que se liguem e fiquem retidos. A placa é lavada diversas vezes para eliminar as moléculas que não se quer detectar.
3. Adição do conjugado: o conjugado enzima-anticorpo é adicionado ao poço para ligar-se com a molécula que se quer detectar. Novamente o excesso é retirado por múltiplas lavagens do poço.
4. Adição do substrato: o substrato a ser convertido pela enzima é adicionado ao poço. Esse substrato pode ser diretamente convertido a uma substância de cor detectável, ou ainda um reagente pode ser adicionado formando a cor.

5. Leitura: a detecção/quantificação é feita por um espectrofotômetro, lendo-se a absorbância do poço e calculando-se a concentração a partir de uma curva de quantidades conhecidas.

3.7 Quantificação de Citocinas por CBA

Utilizamos citometria de fluxo para avaliar os níveis de Interleucina-4, 6 e 10, além de TNF- α e INF- γ utilizando kits CBA flex da BD Bioscience. Todo o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

O CBA é uma técnica que utiliza a citometria de fluxo para dosar até 30 moléculas solúveis ao mesmo tempo em uma pequena quantidade de amostra. Explora o mesmo princípio do ELISA sanduíche, descrito no item 3.6, no entanto, ao invés de utilizar uma placa sensibilizada com anticorpo de captura, utiliza esferas revestidas por ele. A quantificação, como no ELISA, é feita através da comparação da intensidade de fluorescência da amostra e de uma curva padrão de concentrações conhecidas.

A vantagem dessa técnica sobre o ELISA é o número de moléculas que podem ser dosadas em uma mesma amostra.

3.8 Quantificação de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais no extrato obtido a partir do protocolo descrito anteriormente foi avaliada pelo método de Bradford (*Bradford 1976*).

3.9 Análise Estatística

Com a intenção de avaliar as possíveis diferenças nos níveis das citocinas acima citadas entre controles e manipulados e, posteriormente, entre controles e manipula-

dos de um mesmo sexo, utilizamos o teste t de student assumindo um intervalo de confiança de 95%. Todos os testes e gráficos foram realizados utilizando o programa Graphpad Prism 5.

4. RESULTADOS

4.1 Interleucina 1 β

O conteúdo de interleucina 1 beta foi medido por ELISA em extrato de tecido hipocampal. Os níveis da citocina foram significativamente diferentes entre controles ($62,08 \pm 7,5$; $N=12$) e manipulados ($97,6 \pm 8,89$; $N=10$; $p=0,006$; $t=3,074$; $df=20$) (Figura 4.1). Ao efetuarmos a análise separando os resultados por sexo, encontramos diferença estatística entre os grupos de fêmeas, controles ($55,78\text{pg/mg} \pm 10,44$; $N=6$) e manipulados ($96,23 \text{ pg/mg} \pm 13,87$; $N=5$; $p=0,04$; $t=2,375$; $df=9$). Os machos apresentam o mesmo padrão de distribuição dos dados, no entanto não há diferença estatística entre os grupos controle ($68,37 \text{ pg/mg} \pm 10,93$; $N=6$) e manipulado ($99,03 \text{ pg/mg} \pm 13,03$ $N=5$; $p=0,10$; $t=1,818$; $df=9$) (Figura 4.2).

4.2 Interleucina 4

O níveis de interleucina 4 ficaram abaixo do nível teórico mínimo mensurável pelo nosso kit, sendo os resultados obtidos não utilizáveis. O limite é de 3,4pg/ml de amostra.

4.3 Interleucina 6

O níveis de interleucina 6 foram medidos por citometria de fluxo, estando reduzidos em animais manipulados ($8,046\text{pg/mg de proteína} \pm 0,9648$; $N=8$) em comparação com controles ($11,91\text{pg/mg de proteína} \pm 1,101$ $N=12$; $p=0,02$; $t=2,468$; $df=18$) (Figura 4.3). Ao realizarmos as análises separando os sexos não houve diferença estatística: Fêmeas controles ($13,03 \text{ pg/mg de proteína} \pm 1,595$; $N=6$) e manipuladas ($7,632\text{pg/mg de proteína} \pm 1,797$ $N=3$ $p=0,078$; $t=2.064$; $df=7$) e machos controles ($10,80 \text{ pg/mg de proteína} \pm 1,514$; $N=6$) e manipulados ($8,294 \text{ pg/mg de proteína} \pm 1,263$; $N=5$; $p=0,24$; $t=1,236$; $df=9$) (Figura 4.4). No entanto a distribuição dos dados segue o mesmo padrão da análise feita sem a separação por sexo, sendo a diferença provavelmente mascarada pelo pequeno número de animais por grupo.

4.4 Interleucina 10

Os níveis de interleucina 10 ficaram abaixo do nível teórico mínimo mensurável pelo nosso kit, retornando erro durante os cálculos por estarem fora dos limites calculáveis. O limite é de $19,4\text{pg/ml}$ de amostra.

4.5 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)

O TNF foi medido por citometria de fluxo. A análise estatística dos resultados mostrou não haver diferença entre os grupos, Controles ($24,65\text{pg/mg de proteína} \pm 1,79$ $N=8$) e manipulados ($35,8\text{pg/mg de proteína} \pm 7,45$ $N=8$ $p=0,21$ $t=1,31$ $df=16$). Quando efetuamos a análise separando os sexos também não houve diferença estatística, fêmeas controles ($26,76 \text{ pg/mg de proteína} \pm 2,32$ $N=4$) e manipuladas ($52,08\text{pg/mg de proteína} \pm 10,7$ $N=5$ $p=0,078$; $t=2.065$; $df=7$); machos controles ($22,04$

pg/mg de proteína ± 2,503 N=4) e manipulados (*19,5pg/mg de proteína ± 1,744 N=5*
 $p=0,34$; $t=1,03$; $df=7$), no entanto o resultado não é claro e requer aumento do número de animais.

4.6 Interferon Gama (INF- γ)

Os valores de INF- γ ficaram no limiar de detecção do kit, alguns acima outros abaixo, não fornecendo dados confiáveis para análise. O limite mínimo teórico de detecção é 6,8pg/ml de amostra.

Conteúdo de IL-1 β em Hipocampo de Filhotes Controles e Manipulados

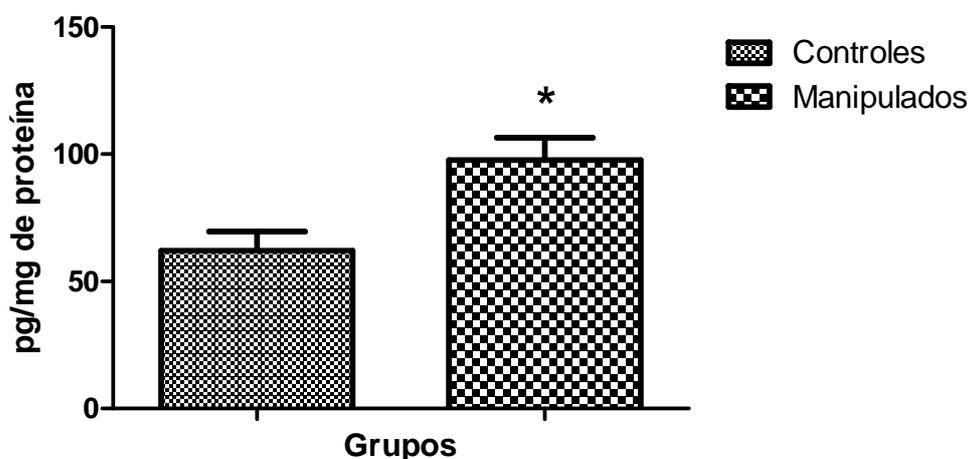


Figura 4.1 – Conteúdo de IL-1 β no hipocampo de filhotes de ratos no 5º dia de vida pós-natal. Os resultados são expressos em médias do grupo \pm erro padrão da média em picograma de IL-1 β a cada miligrama de tecido. Controles (62,08pg/mg de proteína \pm 7,453 N=12) e manipulados (97,63pg/mg de proteína \pm 8,984 N=10). O asterisco indica a diferença estatística entre o grupo controle e manipulado ($p=0,006$ $t=3,074$ $df=20$).

Conteúdo de IL-1 β em Hipocampo de Filhotes Controles e Manipulados

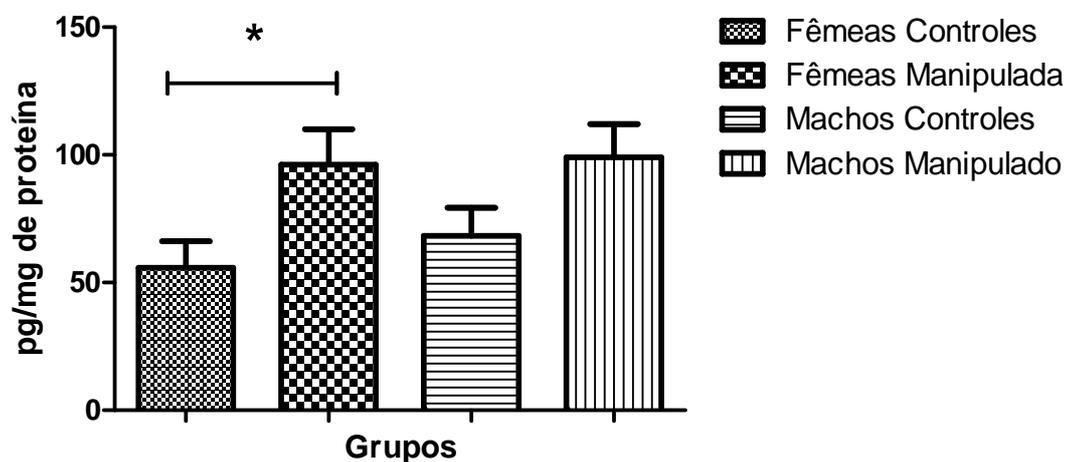


Figura 4.2 – Conteúdo de IL-1 β no hipocampo de filhotes de ratos no 5º dia de vida pós-natal, com separação por sexo. Os resultados são expressos em médias do grupo \pm erro padrão da média em picograma de IL-1 β a cada miligrama de tecido. Fêmeas controles (55,78pg/mg \pm 10,44 N=6) e manipuladas (96,23pg/mg \pm 13,87 N=5) e machos controles (68,37 pg/mg \pm 10,93 N=6) e manipulados (99,03 pg/mg \pm 13,03 N=5) são mostrados. O asterisco indica a diferença estatística entre o grupo controle e manipulado no sexo feminino ($p=0,041$ $t=2,375$ $df=9$).

Conteúdo de IL-6 em Hipocampo de Filhotes Controles e Manipulados

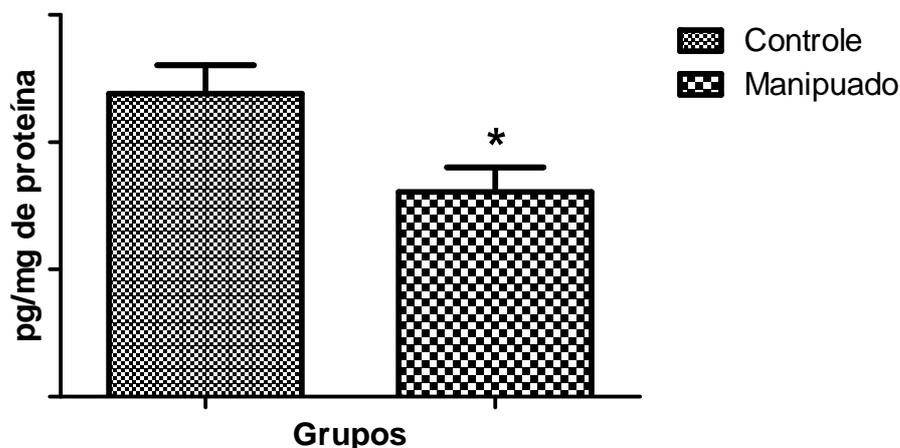


Figura 4.3 – Conteúdo de IL-6 no hipocampo de filhotes de ratos no 5º dia de vida pós-natal. Os resultados são expressos em médias do grupo \pm erro padrão da média, em picograma de IL-6 a cada miligrama de tecido. Controles (11,9pg/mg de proteína \pm 1,10 N=12) e manipulados (8,1pg/mg de proteína \pm 0,96 N=8). O asterisco indica a diferença estatística entre o grupo controle e manipulado ($p=0,02$ $t=2,47$ $df=18$).

Conteúdo de IL-6 em Hipocampo de Filhotes Controles e Manipulados

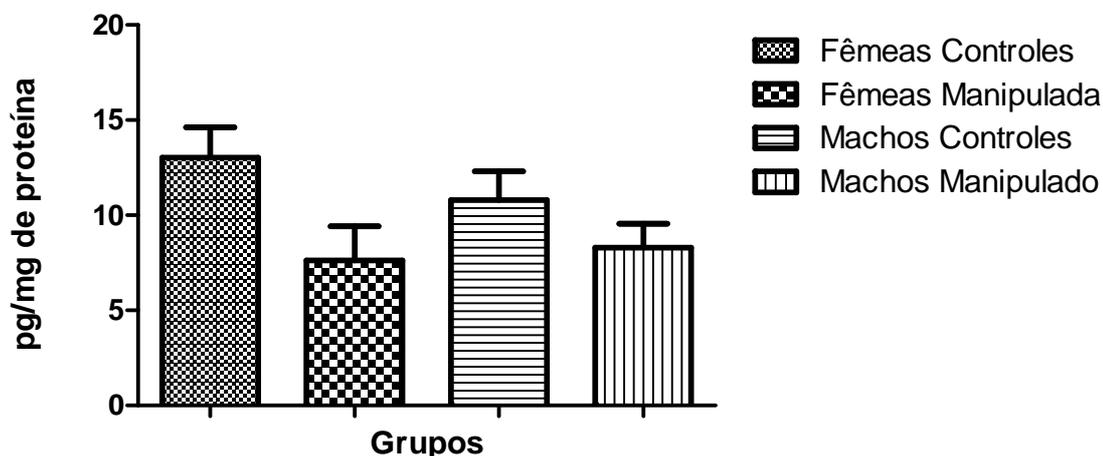


Figura 4.4 – Conteúdo de IL-6 no hipocampo de filhotes de ratos no 5º dia de vida pós-natal com separação por sexo. Os resultados são expressos em médias do grupo \pm erro padrão da média em picograma de IL-6 a cada miligrama de tecido. Fêmeas controles (13,03 pg/mg de proteína \pm 1,595 N=6) e manipuladas (7,632pg/mg de proteína \pm 1,797 N=3 $p=0,078$; $t=2,064$; $df=7$) e machos controles (10,80 pg/mg de proteína \pm 1,514 N=6) e manipulados (8,294 pg/mg de proteína \pm 1,263 N=5 $p=0,24$; $t=1,236$; $df=9$) são mostrados.

Conteúdo de TNF- α em Hipocampo de Filhotes Controles e Manipulados

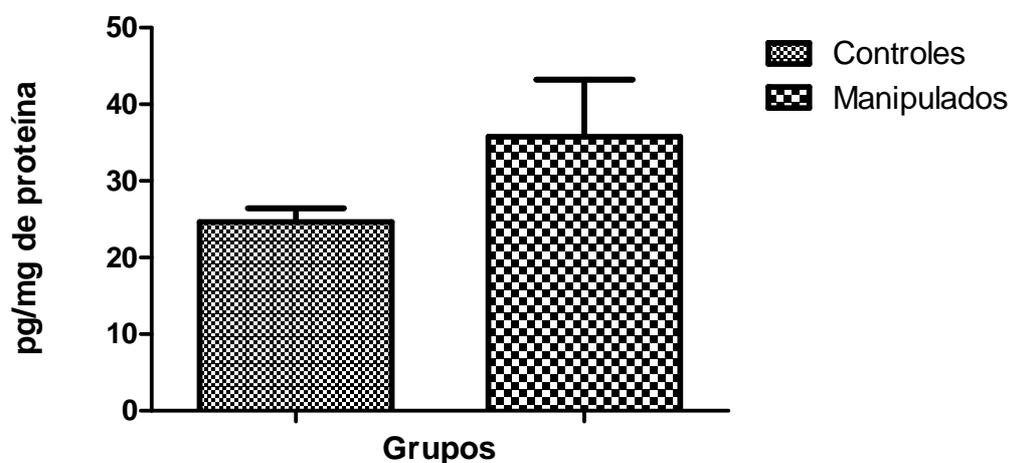


Figura 4.3 – Conteúdo de TNF no hipocampo de filhotes de ratos no 5º dia de vida pós-natal. Os resultados são expressos em médias do grupo \pm erro padrão da média, em picograma de TNF a cada miligrama de tecido. Controles (24,65pg/mg de proteína \pm 1,79 N=8) e manipulados (35,8pg/mg de proteína \pm 7,45 N=8 p=0,21 t=1,31 df=16).

Conteúdo de TNF- α em Hipocampo de Filhotes Controles e Manipulados

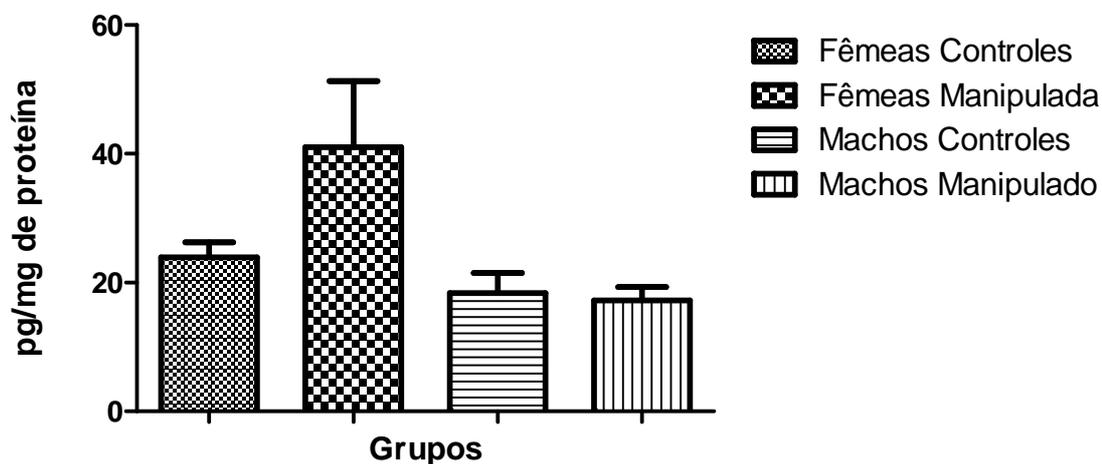


Figura 4.4 – Conteúdo de TNF no hipocampo de filhotes de ratos no 5º dia de vida pós-natal com separação por sexo. Os resultados são expressos em médias do grupo \pm erro padrão da média em picograma de TNF a cada miligrama de tecido. Fêmeas controles (26,76 pg/mg de proteína \pm 2,32 N=4) e manipuladas (52,08pg/mg de proteína \pm 10,7 N=5 p=0,078; t=2.065; df=7) e machos controles (22,04 pg/mg de proteína \pm 2,503 N=4) e manipulados (19,5pg/mg de proteína \pm 1,744 N=5 p=0,34; t=1,03; df=7) são mostrados.

5. DISCUSSÃO

Nossos experimentos indicaram haver um aumento nos níveis da proteína interleucina 1 beta e redução da proteína interleucina 6 no hipocampo de filhotes em resposta ao procedimento de manipulação neonatal, no quinto dia de vida pós-natal, sem haver diferenças entre os grupos quanto aos níveis de TNF- α (Figuras 4.1, 4.3 e 4.5). Ao efetuarmos as análises separando os animais por sexo, as diferenças ficam estatisticamente evidentes apenas para a IL-1 β em fêmeas, estando mascarado nos demais grupos provavelmente por problemas com o número de animais, uma vez que a distribuição dos dados na análise sexo-específica é semelhante à da análise sem a separação por sexo.

Com exceção do TNF, a manipulação neonatal parece atuar de forma semelhante em machos e fêmeas, quando consideramos os níveis de citocinas pró-inflamatórias, tendo em vista que analisar machos e fêmeas juntos aumenta a significância do efeito. Com os dados atuais dos níveis de TNF não se pode inferir muita coisa. Embora haja indícios de que ele esteja alterado em fêmeas manipuladas, e não em machos manipu-

lados, a dosagem precisa ser refeita para refutarmos ou aceitarmos o efeito da manipulação sobre os níveis hipocâmpais de TNF em fêmeas.

Como citado anteriormente, a manipulação neonatal é uma intervenção com inúmeros efeitos sobre o desenvolvimento, levando a alterações morfofuncionais e comportamentais tanto em ratos filhotes, quanto em jovens e adultos. Muito se sabe sobre efeitos da manipulação, no entanto, pouco tem sido demonstrado no que se refere a possíveis mediadores dessas alterações. As citocinas, como moléculas de caráter pleiotrópico, ou seja, apresentam inúmeras funções, além de apresentarem expressão difusa pelo sistema nervoso central, tanto da proteína como de seus receptores (*Cunningham et al. 1992*), são bons candidatos a mediadores dos efeitos da manipulação, uma vez que têm efeito sobre a proliferação e diferenciação celular no sistema nervoso central, bem como sobre a estruturação de processos cognitivos (*Avital et al. 2003; Kipnis et al. 2004*).

Embora a idéia geral seja a de que os processos inflamatórios tenham efeitos deletérios sobre a homeostase do SNC, a produção regulada dos mediadores da inflamação (IL-1 β , TNF e IL-6) são de vital importância para o correto funcionamento desse sistema. (*Ekdahl et al. 2003*). Dentre as moléculas pró-inflamatórias, a IL-1 β parece ter um efeito indutor de proliferação, estimulando a neurogênese hipocâmpal em ratos jovens, quando em níveis moderados, enquanto que a IL-6 apresenta efeito contrário (*McPherson et al. 2010*).

O papel das citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento do sistema nervoso central tem sido extensamente estudado nos últimos anos, sendo descritas como de grande importância nos mecanismos de migração e diferenciação celular e maturação

sináptica, em especial o sistema IL-1 (Nawa et al. 2006). Além disso, IL-1 β , IL-6 e TNF encontram-se elevados nos primeiros dias de desenvolvimento em roedores, reduzindo seus níveis a medida que o animais crescem. Como mediadoras a longo prazo das alterações cognitivas induzidas por desafios imunológicos nos primeiros dias pós-nascimento, a IL-1 parece ser a citocina pró-inflamatória de maior importância, uma vez que é a única que responde a injeções de LPS com aumento de seus níveis no hipocampo (Bilbo et al. 2009).

Considerando o efeito da manipulação neonatal sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo, aumentando IL-1 β e reduzindo IL-6, esse modelo de intervenção poderia estar induzindo um ambiente propício à proliferação celular nessa região, o que corrobora dados anteriores do laboratório no qual se evidenciou um aumento de número de células no hipocampo de animais manipulados no período neonatal (dados não publicados). Além disso, animais submetidos a estresse pré-natal apresentam neurogênese hipocampal reduzida, sendo este efeito revertido pela manipulação neonatal, tanto no aspecto proliferação celular, quanto diferenciação e sobrevivência de novos neurônios (Lemaire et al. 2006), corroborando nossos achados. Outros dados que embasam a idéia de que a manipulação neonatal facilita a neurogênese são ilustrados pelo aumento do desempenho de adultos manipulados no período neonatal em tarefas de memória espacial (labirinto aquático de Morris) (Bilbo et al. 2007), considerando-se que a sustentação imunológica da neurogênese está envolvida com o correto funcionamento dos processos cognitivos (Kipnis et al. 2004), pelo menos em adultos.

É importante ressaltar que as citocinas mediadoras da resposta celular, INF- γ e IL-4, e antiinflamatória, IL-10, também importantes para a sustentação da neurogênese e cognição no adulto (*Kipnis et al. 2004; Butovsky et al. 2006b; Ziv et al. 2006*) encontram-se em baixos níveis ou até mesmo inexistentes, como indicado pela incapacidade de mensurarmos seu conteúdo em nossas amostras pelas técnicas a nossa disposição. A ausência dos dados dessas citocinas reduz o poder de análise do efeito da manipulação sobre o perfil citocinérgico hipocampal, uma vez que apenas podemos dizer que seus níveis são baixos, mas não é possível avaliar uma eventual diferença entre controles e manipulados. No entanto as citocinas sustentadoras da inflamação, IL-1 β , IL-6 e TNF, encontram-se em níveis facilmente mensuráveis, indicando que talvez, para o desenvolvimento, essas citocinas sejam mais importantes que as citocinas mediadoras da resposta celular, que teriam um papel mais significativo sobre a neurogênese do adulto (*Ziv et al. 2008*).

Ao considerarmos que uma das características marcantes do desenvolvimento de roedores são os baixos níveis de glicocorticóides circulantes durante os primeiros dias de vida (*Levine 1957b; Levine 2001*) e que esses hormônios são inibidores potentes da produção de citocinas (*Goshen et al. 2009*), temos mais um dado reforçando a hipótese das citocinas imunológicas como sinalizadores centrais das variações do ambiente durante o desenvolvimento, uma vez que sua produção e liberação está facilitada pelos baixos níveis de glicocorticóides circulantes.

É importante ressaltarmos também o papel do hipocampo na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o principal eixo efetor da resposta ao estresse. Se considerarmos que a alteração do perfil citocinérgico hipocampal altera sua morfologia e

funcionamento a longo prazo, com aumento no número de células, talvez essas alterações possam estar mediando os efeitos da manipulação neonatal sobre a resposta ao estresse em adultos, uma vez que a ativação do eixo é mais intensa porém menos duradoura em animais manipulados (*Beane et al. 2002*). O número de células no hipocampo e a capacidade de formar novos neurônios estão relacionados com a sua efetividade em inibir o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em resposta aos glicocorticóides circulantes (*Schoenfeld et al. 2010*), podendo este ser um dos mecanismos para o *feedback* negativo aumentado em manipulados. Mas aqui são apenas suposições a serem estudadas em trabalhos subsequentes.

Dentro do contexto de estudo da neurogênese hipocampal, um fator a ser considerado é a forma como os animais são mantidos no biotério e as implicações para a proliferação celular. Os animais, por estarem confinados a uma caixa, encontram-se em um ambiente com baixíssima estimulação ambiental, sendo essa falta de estímulo prejudicial para os processos de neurogênese (*Llorens-Martín et al. 2010*). Sabe-se que no habitat natural os roedores enfrentam inúmeros desafios e são constantemente estimulados pela diversidade do ambiente, sendo a caixa moradia um ambiente praticamente isento de variações. Outro fator importante é a mobilidade desses animais. Normalmente eles percorrem grandes distâncias diárias, e o exercício físico é um importante modulador positivo da neurogênese hipocampal (*Bednarczyk et al. 2010*). Dessa forma fica a questão: os achados que sugerem que a manipulação neonatal melhora o desempenho cognitivo e estimula a neurogênese hipocampal descrevem um efeito desse procedimento em especial, ou estamos apenas vendo o efeito de um pequeno estímulo ambiental, seja ele o toque do manipulador ou o aumento do cuidado maternal, sobre um animal com severa privação de estímulos? Se compararmos ani-

mais manipulados com controles mantidos em ambiente enriquecido veríamos esse aumento na cognição e neurogênese? Se mantivermos animais manipulados em ambiente enriquecido, veríamos diferença para animais controles também mantidos em ambiente enriquecido? De toda forma, a manipulação neonatal continua sendo uma forma de variação do ambiente neonatal, e os mediadores dessa intervenção merecem ser estudados. No entanto, talvez seja necessário repensar a forma como os experimentos são controlados.

O sistema imune tem sido descrito como um importante modificador da morfologia e fisiologia do sistema nervoso central, uma vez que infecções no período perinatal levam ao desenvolvimento de toda uma gama de vulnerabilidades na idade adulta, envolvendo desde redução nos processos cognitivos (*Bilbo et al. 2007*) até estabelecimento de transtornos psiquiátricos (*Buka et al. 2008*). Assim sendo, é plausível sugerir que ele tenha um papel na sinalização das variações do ambiente no período perinatal, mediando mudanças morfofuncionais e comportamentais a longo prazo.

Esse trabalho abre um novo capítulo na investigação de mediadores imunológicos para as variações ambientais em animais no período hiporresponsivo, apresentando muitos caminhos possíveis de continuação. Todo o processo de sinalização do sistema interleucina 1 precisa ser avaliado. Os níveis de IL-1 β em comparação com os da IL-1 α e IL1-ra, sendo a última o antagonista natural dos receptores das duas primeiras, precisam ser medidos e os receptores e as rotas de sinalização intracelular também devem ser abordadas, levando em consideração o tipo celular o grau de ativação de cada rota.

6. CONCLUSÕES

O hipocampo é uma estrutura com importantes funções cognitivas, mediando processos de aprendizagem contextual, e de regulação da homeostase corporal por ser um importante ponto de *feedback* negativo através do qual os glicocorticóides circulantes inibem a atividade do eixo HHA.

Algumas das alterações induzidas pela manipulação neonatal estão ligadas às funções hipocampais, como aumento do desempenho cognitivo em tarefas de aprendizado contextual, reversão dos danos ao processo de neurogênese em animais estressados no período pré-natal, e *feedback* negativo aumentando para glicocorticóides. De certa forma, todas essas alterações estão ligadas ao correto funcionamento da neurogênese hipocampal, sem haver, até agora, mediadores descritos que facilitassem esse processo.

Esse trabalho sugere um possível caminho pelo qual as variações no ambiente neonatal poderiam estar levando à alterações morfológicas e funcionais no hipocam-

po, através do estabelecimento de um ambiente propício para a proliferação celular, podendo acarretar em efeitos a longo prazo.

Dessa forma sugerimos que a manipulação neonatal facilita a proliferação celular hipocámpal através do aumento de Interleucina 1 beta e da redução de interleucina 6 no hipocampo de animais submetidos a esse procedimento do primeiro ao quinto dia de vida pós-natal.

Sugerimos também que as citocinas imunológicas, em especial as pró-inflamatórias, são bons candidatos a mediadores dos efeitos da variação do ambiente perinatal, tendo em vista seu caráter pleiotrópico e sua resposta a paradigmas como a manipulação neonatal, infecções maternas durante a gestão e da prole no período neonatal.

7. PERSPECTIVAS

- Em nosso modelo:
 - Investigar os níveis de IL-1 β em outras estruturas do sistema nervoso;
 - Investigar a participação da IL-1 α e IL-1ra na regulação do eixo HHA;
 - Avaliar as vias de sinalização do sistema interleucina 1 de forma célula-específica nas diversas estruturas do eixo HHA e no hipocampo;
 - Avaliar os efeitos da inibição do sistema interleucina 1 sobre a resposta ao estresse em adultos;
 - Buscar meios de entender melhor o papel da interleucina 1 e seus processos de sinalização em situações de ausência ou baixos níveis de glicocorticóides e como mediadores da resposta às variações do ambiente perinatal.

8. REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K. e Lichtman, A. H.** (2005). *Imunologia Celular e Molecular*. São Paulo, Saunders-Elsevier.
- Avital, A., Goshen, I., Kamsler, A., Segal, M., Iverfeldt, K., Richter-Levin, G. e Yirmiya, R.** (2003). "Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity." *Hippocampus* **13**(7): 826-834.
- Beane, M. L., Cole, M. A., Spencer, R. L. e Rudy, J. W.** (2002). "Neonatal Handling Enhances Contextual Fear Conditioning and Alters Corticosterone Stress Responses in Young Rats." *Hormones and Behavior* **41**(1): 33-40.
- Bednarczyk, M. R., Hacker, L. C., Fortin-Nunez, S., Aumont, A., Bergeron, R. e Fernandes, K. J. L.** (2010). "Distinct stages of adult hippocampal neurogenesis are regulated by running and the running environment." *Hippocampus*: n/a-n/a.
- Bilbo, S. D., Newsom, N. J., Sprunger, D. B., Watkins, L. R., Rudy, J. W. e Maier, S. F.** (2007). "Differential effects of neonatal handling on early life infection-induced alterations in cognition in adulthood." *Brain, Behavior, and Immunity* **21**(3): 332-342.
- Bilbo, S. D. e Schwarz, J. M.** (2009). "Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **3**.
- Bradford, M. M.** (1976). "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analitical Biochemistry* : 248-254(72): 248 - 254.

- Buka, S. L., Cannon, T. D., Torrey, E. F. e Yolken, R. H. (2008).** "Maternal Exposure to Herpes Simplex Virus and Risk of Psychosis Among Adult Offspring." Biological Psychiatry **63**(8): 809-815.
- Butovsky, O., Landa, G., Kunis, G., Ziv, Y., Avidan, H., Greenberg, N., Schwartz, A., Smirnov, I., Pollack, A., Jung, S. e Schwartz, M. (2006a).** "Induction and blockage of oligodendrogenesis by differently activated microglia in an animal model of multiple sclerosis." The Journal of Clinical Investigation **116**(4): 905-915.
- Butovsky, O., Talpalar, A. E., Ben-Yaakov, K. e Schwartz, M. (2005).** "Activation of microglia by aggregated β -amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN- γ and IL-4 render them protective." Molecular and Cellular Neuroscience **29**(3): 381-393.
- Butovsky, O., Ziv, Y., Schwartz, A., Landa, G., Talpalar, A. E., Pluchino, S., Martino, G. e Schwartz, M. (2006b).** "Microglia activated by IL-4 or IFN-[gamma] differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells." Molecular and Cellular Neuroscience **31**(1): 149-160.
- Camozzato, T. S. C., Winkelmann-Duarte, E. C., Padilha, C. B., Miguel, S. P. R., Bonzanini, L., Anselmo-Franci, J. A., Fernandes, M. C. e Lucion, A. B. (2009).** "Neonatal handling reduces the number of cells in the medial preoptic area of female rats." Brain Research **1247**: 92-99.
- Cirulli, F., Francia, N., Berry, A., Aloe, L., Alleva, E. e Suomi, S. J. (2009).** "Early life stress as a risk factor for mental health: Role of neurotrophins from rodents to non-human primates." Neuroscience & Biobehavioral Reviews **33**(4): 573-585.
- Cunningham, E., Wada, E., Carter, D., Tracey, D., Battey, J. e De Souza, E. (1992).** "In situ histochemical localization of type I interleukin-1 receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary, and adrenal gland of the mouse." The Journal of Neuroscience **12**(3): 1101-1114.
- Freud, S. (1918).** From the History of an Infantile Neurosis. London, Hogarth Press.
- Giovenardi, M., de Azevedo, M. S., da Silva, S. P., Hermel, E. d. E. S., Gomes, C. M. e Lucion, A. B. (2005).** "Neonatal handling increases fear and aggression in lactating rats." Physiology & Behavior **86**(1-2): 209-217.
- Gomes, C., Sanvitto, G. L., Anselmo-Franci, J. A. e Lucion, A. B. (1999).** "Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats." Brazilian Journal of Medical and Biological Research **32**: 1239-1242.

- Gomes, C. M., Donadio, M. V. F., Franskoviaki, I., Anselmo-Franci, J. A., Franci, C. R., Lucion, A. B. e Sanvitto, G. L. (2006). "Neonatal handling reduces angiotensin II receptor density in the medial preoptic area and paraventricular nucleus but not in arcuate nucleus and locus coeruleus of female rats." Brain Research **1067**(1): 177-180.
- Goshen, I. e Yirmiya, R. (2009). "Interleukin-1 (IL-1): A central regulator of stress responses." Frontiers in Neuroendocrinology **30**(1): 30-45.
- Groothuis, T. G. G. e Carere, C. (2005). "Avian personalities: characterization and epigenesis." Neuroscience & Biobehavioral Reviews **29**(1): 137-150.
- Hauben, E., Butovsky, O., Nevo, U., Yoles, E., Moalem, G., Agranov, E., Mor, F., Leibowitz-Amit, R., Pevsner, E., Akselrod, S., Neeman, M., Cohen, I. R. e Schwartz, M. (2000). "Passive or Active Immunization with Myelin Basic Protein Promotes Recovery from Spinal Cord Contusion." J. Neurosci. **20**(17): 6421-6430.
- Hennessy, M. B., Hornschuh, G., Kaiser, S. e Sachser, N. (2006). "Cortisol responses and social buffering: A study throughout the life span." Hormones and Behavior **49**(3): 383-390.
- Huot, R. L., Gonzalez, M. E., Ladd, C. O., Thrivikraman, K. V. e Plotsky, P. M. (2004). "Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation." Psychoneuroendocrinology **29**(2): 279-289.
- Huot, R. L., Plotsky, P. M., Lenox, R. H. e McNamara, R. K. (2002). "Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats." Brain Research **950**(1-2): 52-63.
- Kipnis, J., Cohen, H., Cardon, M., Ziv, Y. e Schwartz, M. (2004). "T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: Implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(21): 8180-8185.
- Kleine, T. O. e Benes, L. (2006). "Immune surveillance of the human central nervous system (CNS): Different migration pathways of immune cells through the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier in healthy persons." Cytometry Part A **69A**(3): 147-151.
- Lee, J.-H., Kim, H. J., Kim, J. G., Ryu, V., Kim, B.-T., Kang, D.-W. e Jahng, J. W. (2007). "Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation." Neuroscience Research **58**(1): 32-39.

- Lemaire, V., Lamarque, S., Le Moal, M., Piazza, P.-V. e Abrous, D. N.** (2006). *"Postnatal Stimulation of the Pups Counteracts Prenatal Stress-Induced Deficits in Hippocampal Neurogenesis."* Biological Psychiatry **59**(9): 786-792.
- Levine, S.** (1957a). *"Infantile experience and resistance to physiological stress."* Science(126).
- Levine, S.** (1957b). *"Infantile experience and the maturation of the pituitary adrenal axis."* Science(126): 1.
- Levine, S.** (1962). *"Plasma-free corticosterone response to electric shock in rats stimulated in infancy."* Science(135): 2.
- Levine, S.** (2001). *"Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat."* Physiology & Behavior **73**(3): 255-260.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M. e Meaney, M. J.** (1997). *"Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress."* Science **277**(5332): 1659-1662.
- Llorens-Martín, M., Tejada, G. S. e Trejo, J. L.** (2010). *"Differential Regulation of the Variations Induced by Environmental Richness in Adult Neurogenesis as a Function of Time: A Dual Birthdating Analysis."* PLoS ONE **5**(8): e12188.
- Lucion, A. B., Pereira, F. M., Winkelmann-Duarte, E. C., Sanvito, G. L. e Anselmo-Franci, J. A.** (2003). *"Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats."* Behavioral Neuroscience **117**(5): 894-903.
- Macrì, S. e Laviola, G.** (2004a). *"Single episode of maternal deprivation and adult depressive profile in mice: interaction with cannabinoid exposure during adolescence."* Behavioural Brain Research **154**(1): 231-238.
- Macrì, S., Mason, G. J. e Würbel, H.** (2004b). *"Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats."* European Journal of Neuroscience **20**(4): 1017-1024.
- Macrì, S. e Würbel, H.** (2006). *"Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: A critical review of the maternal mediation hypothesis."* Hormones and Behavior **50**(5): 667-680.
- Macrì, S. e Würbel, H.** (2007). *"Effects of variation in postnatal maternal environment on maternal behaviour and fear and stress responses in rats."* Animal Behaviour **73**(1): 171-184.

Macrì, S., Zoratto, F. e Laviola, G. (2011). "*Early-stress regulates resilience, vulnerability and experimental validity in laboratory rodents through mother-offspring hormonal transfer.*" Neuroscience & Biobehavioral Reviews **In Press, Corrected Proof**.

Madruga, C., Xavier, L. L., Achaval, M., Sanvitto, G. L. e Lucion, A. B. (2006). "*Early handling, but not maternal separation, decreases emotional responses in two paradigms of fear without changes in mesolimbic dopamine.*" Behavioural Brain Research **166**(2): 241-246.

McPherson, C. A., Aoyama, M. e Harry, G. J. (2010). "*Interleukin (IL)-1 and IL-6 regulation of neural progenitor cell proliferation with hippocampal injury: Differential regulatory pathways in the subgranular zone (SGZ) of the adolescent and mature mouse brain.*" Brain, Behavior, and Immunity **In Press, Corrected Proof**.

Meaney, M. J. (2001). "*Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations.*" Annual Review of Neuroscience **24**(1): 1161-1192.

Moalem, G., Gdalyahu, A., Shani, Y., Otten, U., Lazarovici, P., Cohen, I. R. e Schwartz, M. (2000). "*Production of Neurotrophins by Activated T Cells: Implications for Neuroprotective Autoimmunity.*" Journal of Autoimmunity **15**(3): 331-345.

Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Yoles, E., Mor, F., Cohen, I. R. e Schwartz, M. (1999). "*Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy.*" Nat Med **5**(1): 49-55.

Muhallab, S., Lundberg, C., Gielen, A. W., Lidman, O., Svenningsson, A., Piehl, F. e Olsson, T. (2002). "*Differential Expression of Neurotrophic Factors and Inflammatory Cytokines by Myelin Basic Protein-Specific and Other Recruited T Cells Infiltrating the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.*" Scandinavian Journal of Immunology **55**(3): 264-273.

Nawa, H. e Takei, N. (2006). "*Recent progress in animal modeling of immune inflammatory processes in schizophrenia: Implication of specific cytokines.*" Neuroscience Research **56**(1): 2-13.

Padoin, M., Cadore, L., Gomes, C., Barros, H. e Lucion, A. (2001). "*Long-lasting effects of Neonatal Stimulation on the Behaviour of Rats.*" Behavioral Neuroscience **115**(6): 1332-1340.

Rüedi-Bettschen, D., Feldon, J. e Pryce, C. R. (2004). "*Circadian- and temperature-specific effects of early deprivation on rat maternal care and pup development: Short-term markers for long-term effects?*" Developmental Psychobiology **45**(2): 59-71.

Schoenfeld, T. J. e Gould, E. (2010). "*Stress, stress hormones, and adult neurogenesis.*" Experimental Neurology **In Press, Corrected Proof**.

Schwartz, M. e Kipnis, J. (2002). "*Autoimmunity on alert: naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells as part of the evolutionary compromise between a "need and a risk".*" Trends in Immunology **23**(11): 530-534.

Todeschin, A. S., Winkelmann-Duarte, E. C., Jacob, M. H. V., Aranda, B. C. C., Jacobs, S., Fernandes, M. C., Ribeiro, M. F. M., Sanvitto, G. L. e Lucion, A. B. (2009). "*Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats.*" Hormones and Behavior **56**(1): 93-100.

Turnbull, A. V. e River, C. L. (1999). "*Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Cytokines: Actions and Mechanisms of Action.*" Physiological Reviews **79**(1): 1-71.

Weininger, O. (1954). "*Physiological damage under emotional stress as a function of early experience.*" Science(119): 285-286.

Winkelmann-Duarte, E. C., Todeschin, A. S., Fernandes, M. C., Bittencourt, L. C., Pereira, G. A. M., Samios, V. N., Schuh, A. F. S., Achaval, M. E., Xavier, L. L., Sanvitto, G. L., Mandarim-de-Lacerda, C. A. e Lucion, A. B. (2007). "*Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats.*" Brain Research **1170**: 20-30.

Würbel, H. (2001). "*Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour.*" Trends in Neurosciences **24**(4): 207-211.

Yorty, J. L., Schultz, S. A. e Bonneau, R. H. (2004). "*Postpartum maternal corticosterone decreases maternal and neonatal antibody levels and increases the susceptibility of newborn mice to herpes simplex virus-associated mortality.*" Journal of Neuroimmunology **150**(1-2): 48-58.

Ziv, Y., Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N., Cohen, H., Kipnis, J. e Schwartz, M. (2006). "*Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood.*" Nat Neurosci **9**(2): 268-275.

Ziv, Y. e Schwartz, M. (2008). "*Immune-based regulation of adult neurogenesis: Implications for learning and memory.*" Brain, Behavior, and Immunity **22**(2): 167-176.