AMANDA FLORENTINA DO NASCIMENTO

INFLUÊNCIA DO LPS E DO ZINCO NA INTERAÇÃO MÃE E FILHOTE

SÃO PAULO

2016

AMANDA FLORENTINA DO NASCIMENTO

Influência do LPS e do zinco na interação mãe e filhote

São Paulo

2016

AMANDA FLORENTINA DO NASCIMENTO

Influência do LPS e do zinco na interação mãe e filhote

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

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Luciano Freitas Felício

São Paulo

2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3274
FMVZ

Nascimento, Amanda Florentina do
Influência do LPS e do zinco na interação mãe e filhote / Amanda Florentina do
Nascimento. -- 2016.
115 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Freitas Felício.

1. Lipopolissacarídeo. 2. Febre. 3. Comportamento maternal. 4. Zinco. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "A influência do LPS e Zinco na interação mãe e filhote", protocolado sob o CEUA nº 5868070714, sob a responsabilidade de **Luciano Freitas Felicio e equipe; Amanda Florentina do Nascimento** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 17/09/2014.

We certify that the proposal "The influence of LPS and zinc in the interaction between mother and pup. ", utilizing 148 Isogenic rats (40 males and 108 females), protocol number CEUA 5868070714, under the responsibility of **Luciano Freitas Felicio and team; Amanda Florentina do Nascimento** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUA/FMZV) in the meeting of 09/17/2014.

Vigência da Proposta: de 30/07/14 a 01/04/15

Área: Vpt Fmvz Usp

Procedência: Biotério/VPT FMVZ USP

Espécie: Rato isogênico

Gênero: Machos

idade: 75

N: 40

Linhagem: Wistar

Peso: 270

Procedência: Biotério/VPT FMVZ USP

Espécie: Rato isogênico

Gênero: Fêmeas

idade: 75

N: 108

Linhagem: Wistar

Peso: 230

São Paulo, 05 de novembro de 2015

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 01 de julho de 2015
CEUA N [5868070714](#)

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Luciano Freitas Felicio
Depto/Disc: Vpt Fmvz Usp
Luciano Freitas Felicio (orientador)

Título do projeto: "A influência do LPS e Zinco na interação mãe e filhote".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 23/maio/2015) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Esse adendo tem por objetivo acrescentar ao projeto ratas gestantes e ratas virgens induzidas ou não a hiperprolactemia, e tratadas ou não com LPS e Zinco, no intuito de verificar possíveis diferenças entre ratas virgens e lactantes na temperatura, peso corporal, consumo de água e ração. ".

Comentário da CEUA: "Foi encaminhado um adendo informando que foi acrescentado ao projeto "ratas gestantes e ratas virgens induzidas ou não a hiperprolactemia, e tratadas ou não com LPS e Zinco, no intuito de verificar possíveis diferenças entre ratas virgens e lactantes na temperatura, peso corporal, consumo de água e ração". ".

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: NASCIMENTO, Amanda Florentina

Título: Influência do LPS e do zinco na interação mãe e filhote

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, por ter me dado saúde e forças para superar as dificuldades.

Aos meu pais, Basilio e Josenita, pelo amor, incentivo, apoio incondicional e sacrifício em todos esses anos, graças a vocês cheguei até aqui.

A minha filha Maria Rita, que me fez sentir o que é o comportamento maternal.

Ao meu orientador Professor Dr. Luciano Freitas Felício e minha co - orientadora Professora Dra. Maria Martha Bernardi, por me proporcionarem o conhecimento, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender.

Aos animais de laboratório, utilizados em meus experimentos!

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Patologia e Toxicologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), local aonde este trabalho foi realizado.

À Dra. Glauclie Jussilane Alves, Professora Dra. Cristina de Oliveira M. Salles Gomes e Dr. Andrey Grishin, por suas preciosas colaborações na elaboração desta tese.

Ao Professor Dr. Jorge Camilo Flório pela ajuda para a realização das análises estatísticas.

Aos colegas do departamento de patologia, Luana, Thiago Kirsten, Julieta, Thiago Marinho, Marianne Klein, Taíssa Sandini, Mariana Sayuri, Natalia e Sheila Rodrigues pela ajuda.

À Magali, do Laboratório de Neurociências e Comportamento (VPT-FMVZ-USP), pelo incentivo e pela ajuda.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia (VPT-FMVZ-USP): Herculano, Wagner e Nicole, por sempre estarem a disposição em ajudar.

Aos funcionários do Biotério (VPT-FMVZ-USP) por toda a dedicação.

Às funcionárias das secretarias (VPT-FMVZ-USP): Adriana, Milena e Cristina pelas
gentilezas.

A todos os colegas e professores de pós - graduação pelo aprendizado e a
agradável convivência.

Aos funcionários da biblioteca (VPT-FMVZ-USP) pela correção da tese e auxílio.

Aos funcionários da FMV-USP por toda a atenção.

A Professora Dra. Monica Levy Andersen e ao Dr. Daniel Ninello Polesel da
Universidade Federal de São Paulo, por todo treinamento a mim ofertado.

A Professora Dra. Adelaine Leung e ao Professor Dr. Steve Gagné da University of
Saskatchewan. Pela experiência maravilhosa vivenciada durante o período de
estágio realizado no laboratório Leung.

A minha família e amigos que sempre estiveram presente, me incentivando.

Ao pai de minha pequena Maria Rita, Francinério Cordeiro, por toda a ajuda,
compreensão, incentivo e amizade.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido.

“...Simbioses maternais...”

Constatando nobreza no comportamento de ratas,
Por um instante senti-me constrangido tendo pés,
E me inseri neste universo de pelos e patas,
Não se produz ciência retendo-se só ao convés.

Mesmo adoentadas e enfraquecidas, as ratas mães,
Não sonham amparo e leite aos seus filhotes,
Há nelas um saber que falta até em anciões,
E o fazem com um, dois, três, quatro, com lotes.

É curioso que tendo apenas limítrofes instintos,
Esbanjem as ratas, tanto aconchego e simbioses,
Ao passo que indiferenças, nevoeiros e labirintos.

Predominem tanto entre humanos que são racionais,
Insanidades produzem perdas de preciosas osmoses,
Trocando a magia da vida por coisas esmas e banais.

Paulo Sócrates

RESUMO

NASCIMENTO, A. F. **Influência do LPS e do zinco na interação mãe e filhote.** [Influence of LPS and zinc on Interaction mother and offspring.]. 2016. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O comportamento materno consiste em um conjunto de mudanças comportamentais e fisiológicas, exercidas pelos indivíduos adultos em torno dos indivíduos reprodutivamente imaturos, garantindo sua sobrevivência e a propagação de sua espécie. A interação mãe e filhote é tida tipicamente como simbiótica. Os filhotes quando separados da mãe sinalizam para serem recolhidos através de dicas olfativas, visuais e da vocalização que representa uma forma de comunicação filhote e mãe. O modelo de febre clássica é amplamente empregado envolve a utilização do lipopolissacarídeo (LPS), principal componente da parede celular de bactérias Gram-Negativas. Além da febre, as infecções apresentam uma cadeia de respostas não específicas do hospedeiro que se sabe estarem envolvidos em muitas das funções vitais, incluindo a resposta imune estas incluem a hipozinquemia. Sendo assim, fêmeas virgens, gestantes e lactantes receberam LPS (100 µg/kg, i.p.) e foram tratadas com zinco (2 mg/kg, s.c.) O peso corporal, consumo de água, ração, e a temperatura corporal foram medidas por noventa e seis horas, duas horas após a administração do LPS. No quinto dia de lactação foram observados o comportamento maternal, a atividade geral em campo aberto e a vocalização ultrassônica nos filhotes. No dia do desmame os filhotes dessas fêmeas receberam um desafio com LPS (50 µg/kg, i.p.) e duas horas após a administração, foram observados a atividade geral em campo aberto, e o *burst* e fagocitose de neutrófilos. Observamos que: 1) Em ratas virgens, gestantes e lactantes, a exposição ao LPS e o tratamento com zinco modificou de forma específica a temperatura e peso corporal, consumo de água e ração e a atividade geral observadas em campo aberto; 2) No período de lactação, houve redução da latência para busca do primeiro filhote. Na prole das fêmeas lactantes verificou-se que: 3) Houve alteração no padrão de vocalização dos filhotes; 4) houve alteração na atividade geral observada em campo aberto e no *burst* e fagocitose de neutrófilos no vigésimo primeiro dia pós natal, após um desafio com a endotoxina, Assim, os resultados indicam que a

administração de LPS e o tratamento com zinco têm seus efeitos modulados conforme o estágio fisiológico em que a fêmea se encontra, e interfere com a interação mãe/filhote, resultando em efeitos de curto e longo prazo sobre o comportamento dos filhotes. A partir deste trabalho, a possibilidade da exposição de mães à endotoxina bacteriana e da modulação de seus efeitos pelo zinco programar as respostas inflamatórias dos filhos torna-se factível

Palavras - chave: Lipopolissacarídeo. Febre. Comportamento maternal. Zinco

ABSTRACT

NASCIMENTO, A. F. **Influence of LPS and zinc on Interaction mother and offspring.** [Influência do LPS e do zinco na interação mãe e filhote]. 2016. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The maternal behavior consists of a set of behavioral and physiological changes, performed by adults around the reproductively immature individuals, ensuring their survival and propagation of their species. The mother and pups' interaction is typically seen as symbiotic. Puppies give signal to be collected when separated from their mother, through olfactory, visual and vocalization tips that represents a form of communication between mother and pup. The classic disease model is widely used involves the use of lipopolysaccharide (LPS), the major component of the cell wall of Gram-negative bacteria. In addition to fever, infections present a chain of non-specific host responses known to be involved in many vital functions, including the immune response these include hypokinemia. Therefore, virgin, pregnant and lactating female rats received LPS (100 µg/kg, ip) and were treated with zinc (2 mg/kg, sc). Temperature and Body weight, water and food consumptions were measured for ninety-six hours, two hours after LPS administration. On the fifth day of lactation were observed maternal behavior, the overall activity in the open field and ultrasonic vocalization in puppies. On the day of weaning pups of these females received a challenge with LPS (50 µg/kg, ip) two hours after administration were observed general activity in the open field and the burst and phagocytosis of leukocytes. We observed that: In virgin, pregnant and lactating, the exposure to LPS and the treatment with zinc, modified of the form differentially between these females, the temperature and body weight, water and food consumption, and the general activity observed in the open field; In the lactation period the latency to search the first pup was reduced. In the offspring, it was found that: There was a change in the pattern of vocalization of the puppies; changes in general activity observed in the open field and in burst and phagocytosis of leukocytes in the twenty-first day of lactation after challenge with endotoxin. Thus, the results indicate that administration of LPS and treatment with zinc have effects modulated according to the physiological stage when the female is, and interferes with the interaction

between mother and puppies, resulting in short and long term effects on behavior their offspring. From this work, the possibility of the exposure of mothers to bacterial endotoxin modulates the effects caused by zinc, programing the inflammatory responses in their offspring, becomes feasible

Keywords: Lipopolysaccharide. Fever. Maternal behavior. Zinc

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental – Ratas Virgens.....	34
Figura 2 - Delineamento experimental - Ratas virgens induzidas a hiperprolactinemia.....	35
Figura 3 - Delineamento experimental - Ratas Gestantes.....	36
Figura 4 - Delineamento - Ratas lactantes.....	37
Figura 5 - Delineamento experimental - Filhotes.....	38
Figura 6 - Modelo de termômetro digital de ouvido utilizado.....	44
Figura 7 - Modelo de campo aberto utilizado.....	46
Figura 8 - Comparação entre os grupos em relação à temperatura de ratas virgens tratadas com LPS e zinco. Pós teste <i>Bonferroni</i> de comparações múltiplas.....	52
Figura 9 - Comparação entre os grupos em relação ao ganho ou perda de peso, consumo de água e de ração de ratas virgens tratadas com LPS e zinco. Pós teste <i>Bonferroni</i> de comparações múltiplas.....	52
Figura 10 - Médias com os respectivos desvios – padrão da temperatura, ganho ou perda peso de corporal, bem como o consumo de água e ração de ratas virgens tratadas com LPS e zinco.....	53
Figura 11 - Temperatura, ganho ou perda de peso corporal, bem como o consumo de água e ração de ratas virgens que receberam no estro 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p e 2 mg/kg de zinco por via s.c., observadas 2 horas após o tratamento e por mais 96 horas. *P<0.05. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de <i>Bonferroni</i>	54
Figura 12 - Comparação entre os grupos em relação a temperatura de ração de ratas virgens induzidas ou não a hiperprolactinemia e tratadas com LPS e zinco. Pós teste <i>Bonferroni</i> de comparações múltiplas.....	57
Figura 13 - Comparação entre os grupos em relação ao ganho ou perda de peso, consumo de água e de ração de ratas virgens induzidas ou	

	não a hiperprolactinemia e tratadas com LPS e zinco. Pós teste <i>Bonferroni</i> de comparações múltiplas	57
Figura 14 -	Médias com os respectivos desvios – padrão da temperatura, ganho ou perda de peso corporal, bem como do consumo de água e ração de ratas virgens induzidas ou não a hiperprolactinemia e tratadas com LPS e zinco	58
Figura 15 -	Temperatura de ratas virgens induzidas a hiperprolactinemia com domperidona e tratadas com 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p. e 2mg/kg de zinco por via s.c. Observadas 2 horas após o tratamento e por mais 96 horas. *P<0.05. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de <i>Bonferroni</i>	59
Figura 16 -	Comparação entre os grupos em relação à temperatura de ratas gestantes tratadas com LPS e zinco. Pós teste <i>Bonferroni</i> de comparações múltiplas	62
Figura 17 -	Comparação entre os grupos em relação ao ganho ou perda de peso, consumo de água bem como do consumo de ração de ratas gestantes e tratadas com LPS e zinco. Pós teste <i>Bonferroni</i> de comparações múltiplas.....	62
Figura 18 -	Médias com os respectivos desvios – padrão da temperatura de ratas gestantes tratadas com LPS e zinco	63
Figura 19 -	Temperatura e peso corporal, bem como o consumo de água e ração de ratas gestantes que receberam GD 9,5 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p., e 2mg/kg de zinco por via s.c., observadas 2 horas após o tratamento e por mais 96 horas. *P<0.05. Anova de duas vias seguida pelo teste de <i>Bonferroni</i>	64
Figura 20 -	Comparação entre os grupos em relação à temperatura de ratas lactantes tratadas com LPS e zinco. Pós teste <i>Bonferroni</i> de comparações múltiplas.....	67
Figura 21 -	Comparação entre os grupos em relação ao ganho ou perda de peso, consumos de água e de ração de ratas lactantes tratadas com LPS e zinco. Pós teste <i>Bonferroni</i> de comparações múltiplas	67
Figura 22 -	Médias com os respectivos desvios – padrão da temperatura e peso corporal, bem como do consumo de água e ração de ratas lactantes tratadas com LPS e zinco	68

Figura 23 - Temperatura de ratas lactantes que receberam no 3. ^o dia de lactação 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p., e 2 mg/kg de zinco por via s.c., observadas 2 horas após o tratamento e por mais 96 horas. *P<0.05. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de <i>Bonferroni</i>	69
Figura 24 - Frequências de locomoção, levantar e tempo de parada de ratas virgens que receberam no estro 100 µg /kg de LPS por via i.p., e 2 mg/kg de zinco por via s.c., e foram observadas 2 horas após o tratamento com a endotoxina. *P<0.05. ANOVA de uma via seguida pelo teste de <i>Tukey</i>	71
Figura 25 - Frequências de locomoção, levantar e tempo de parada de ratas que receberam no GD 9,5 100 µg/kg de LPS por via i.p., e 2mg/kg de zinco por via s.c., e foram observadas 2 horas após o tratamento com a endotoxina. *P<0.05. ANOVA de uma via seguida pelo teste de <i>Tukey</i>	73
Figura 26 - Frequências de locomoção, levantar e tempo de ratas receberam no 3. ^o dia de lactação 100 µg/kg de LPS ou solução Salina por via i.p e 2 mg/kg de Zinco por via s.c, observadas no 5. ^o dia de lactação. *P<0.05. Anova de uma via seguida pelo teste de <i>Tukey</i>	75
Figura 27 - Latências para contato com o 1. ^o filhote e o 8 ^o filhote, para carregar o primeiro e entre carregar o primeiro e o último filhote, de ratas lactantes que receberam no 3. ^o dia de lactação 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p., e 2 mg/kg de zinco por via s.c., observadas no 5. ^o dia de lactação. *P<0.05. Anova de uma via seguida pelo teste de <i>Tukey</i>	77
Figura 28 - Número e o total de duração de vocalizações ultrassônicas de filhotes de ratas lactantes que receberam no 3. ^o dia de lactação 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p., e 2 mg/kg de zinco por via s.c., observados de 2 a 72 horas após o tratamento. *P<0.05. Anova de duas vias seguida pelo teste de <i>Bonferroni</i>	79
Figura 29 - Frequências de locomoção, levantar e tempo de parada no PND21 de filhotes machos de ratas que receberam no 3. ^o dia de lactação 100 µg /kg de LPS por via i.p., e 2 mg/kg de zinco por	

via s.c. Foram observados 2 horas após receberem um desafio com 50 µg/kg de LPS por via i.p. *P<0.05. ANOVA de uma via seguida pelo teste de <i>Tukey</i>	81
Figura 30 - <i>Burst</i> e fagocitose de neutrófilos no PND21 da prole das ratas lactantes tratadas no LD3 com LPS ou solução salina e/ou zinco e desafiadas com 50 µg/kg de LPS duas horas antes das observações. São apresentadas as médias com os respectivos desvios – padrão.	83
Figura 31 - <i>Burst</i> e fagocitose de neutrófilos no PND21 da prole das ratas lactantes tratadas no LD3 com LPS ou solução salina e/ou zinco e desafiadas com 50 µg/kg de LPS duas horas antes das observações. Pós teste <i>Tukey</i> de comparações múltiplas.	83
Figura 32 - <i>Burst</i> e fagocitose de neutrófilos no PND21 da prole das ratas lactantes tratadas no LD3 com LPS ou solução salina e/ou zinco e desafiadas com 50 µg/kg de LPS duas horas antes das observações. *P<0.05. ANOVA de uma via seguida pelo teste de <i>Tukey</i>	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD	comportamento doentio
CM	comportamento maternal
DA	dopamina
DCFH-DA	Diacetato 2`7` Diclorofluorisceína
LPS	lipopolissacarídeo
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	gravidade
GD	dia de gestação
IL1	interleucina 1
IL2	interleucina 2
IL6	interleucina 6
i.p.	intraperitoneal
LPS	lipopolissacarídeo
NAc	núcleo accumbens
NaCl	cloreto de sódio
PBS	phosphate-buffered saline
PI	iodeto de propídio
PMA	miristato-acetato de forbol
PND	dia pós de vida
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
S	salina
s.c	subcutânea
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
SNC	sistema nervoso central
USP	Universidade de São Paulo
VPT	Departamento de Patologia
Zn	zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	FEBRE e LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS).....	22
1.2	ZINCO (Zn).....	22
1.3	FEBRE E ZINCO (Zn).....	23
1.4	O COMPORTAMENTO MATERNAL (CM).....	24
1.5	DOPAMINA E COMPORTAMENTO MATERNAL	25
1.6	LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) E DOPAMINA.	26
1.7	LPS, DOPAMINA E PROLACTINA.....	26
1.8	A INTERAÇÃO MÃE E FILHOTE	28
2	OBJETIVO	30
2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	ANIMAIS.....	32
3.2	O ACASALEMENTO	32
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	33
3.3.1	Ratas virgens	33
3.3.2	Ratas virgens induzidas a hiperprolactinemia.....	34
3.3.3	Ratas gestantes	35
3.3.4	Ratas lactantes	36
3.3.5	Filhotes.....	37
3.4	PRODUTOS BIOLÓGICOS.....	38
3.5	MEDICAMENTOS, REAGENTES E SOLUÇÕES	38
3.6	PREPARADO DAS SOLUÇÕES, DOS REAGENTES E DO ESTÍMULO DO <i>BURST</i> OXIDATIVO.....	39
3.6.1	Preparo das soluções	39

3.6.2	Preparo dos reagentes:.....	41
3.6.3	Preparo dos estímulos:.....	42
4	PROCEDIMENTOS	44
4.1	AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA E PESO CORPORAL, CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO EM RATAS VIRGENS, VIRGENS INDUZIDAS A HIPERPROLACTINEMIA, GESTANTES E LACTANTES.....	44
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO DE RATAS VIRGENS, GESTANTES, LACTANTES E FILHOTES	45
4.3	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNAL EM RATAS LACTANTES	46
4.4	VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA	47
4.5	AVALIAÇÃO DO <i>BURST</i> OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS POR CITOMETRIA DE FLUXO NA PROLE.....	47
5	ANALISE ESTATÍSTICA	50
6	RESULTADOS	51
6.1	EXPERIMENTO 1	51
6.1.1	Resultados	51
6.2	EXPERIMENTO 2	55
6.2.1	Resultados	55
6.3	EXPERIMENTO 3.....	60
6.3.1	Resultados	60
6.4	EXPERIMENTO 4.....	65
6.4.1	Resultados	65
6.5	EXPERIMENTO 5.....	70
6.5.1	Resultado	70
6.6	EXPERIMENTO 6.....	72
6.6.1	Resultado	72

6.7	EXPERIMENTO 7.....	74
6.7.1	Resultado	74
6.8	EXPERIMENTO 8.....	76
6.8.1	Resultados	76
6.9	EXPERIMENTO 9.....	78
6.9.1	Resultados	78
6.10	EXPERIMENTO 10.....	80
6.10.1	Resultado	80
6.11	EXPERIMENTO 11.....	82
6.11.1	Resultados	82
7	DISCUSÃO.....	85
8	CONCLUSÃO.....	101
	REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 FEBRE E LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

A febre é definida como um estado de elevação da temperatura corporal, fazendo parte de uma complexa reação fisiológica de defesa dos organismos multicelulares contra a invasão de patógenos ou corpos estranhos (MACKOWIAK; PLAISANCE, 1998). O modelo de febre clássico e amplamente empregado envolve a utilização do lipopolissacarídeo (LPS). Além da febre, as infecções apresentam uma cadeia de respostas não específicas do hospedeiro que se sabe estarem envolvidos em muitas das funções vitais, incluindo a resposta imune estas incluem a hipozinquemia. A hipozinquemia durante infecções, também tem sido observada tanto experimentalmente como clinicamente (TRUMBO et al., 2001). Um exemplo é encontrado na meningite meningocócica, em animais com hipozinquemia acompanhada por febre induzida pela injeção de *Ehrlichia Fagocitofilia* ou *Escherichia coli* (endotoxina) ou enterotoxina B de estafilococos (TRUMBO et al., 2001). Atualmente, o mecanismo da hipozinquemia durante infecções não está claro, mas se sabe que hipozinquemia transitória pode ocorrer durante a fase de aumento da temperatura corporal devido a infecções. Quando um paciente está infectado por um agente patogênico que liberta a IL-1, a infecção atua reduzindo o nível de zinco no plasma. No caso de uma infecção aguda, a hipozinquemia pode ocorrer devido a um atraso na absorção e na mobilização de zinco.

1.2 ZINCO (Zn)

O zinco é um micronutriente necessário à reprodução, diferenciação celular, crescimento, desenvolvimento, reparação tecidual e imunidade. Nutriente essencial é constituinte de mais de 300 metaloenzimas que participam no metabolismo de carboidratos, de lipídios e de proteínas e na síntese e degradação de ácidos nucléicos (TRUMBO et al., 2001). A deficiência de zinco é responsável por diversas

anormalidades bioquímicas e funcionais no organismo, devido à participação desse micronutriente em uma ampla gama de processos metabólicos. Os prejuízos na velocidade de crescimento rápido como na infância, e em fases onde as necessidades apresentam-se aumentadas como na gestação e lactação, na função imune e nos resultados obstétricos, são consequências dessa carência nutricional que podem ser corrigidas através de suplementação específica (TRUMBO et al., 2001). A deficiência deste nutriente é capaz de promover retardo na capacidade de resposta imunológica do lactente (DOMELLÖF, 2014). Por outro lado, a suplementação em gestantes foi responsável pelo aumento na idade gestacional na ocasião do parto e pelo aumento no peso ao nascer, segundo um estudo realizado com mulheres afro-americanas (TRUMBO et al., 2001). O padrão da concentração de zinco no leite materno pode colaborar na redução da taxa de crescimento do lactente (DOMELLÖF, 2014).

1.3 FEBRE E ZINCO (Zn)

Sabe-se que o Zinco tem papel importante no controle da temperatura (AWOR et al., 2015; HEMILÄ; CHALKER, 2015; FERNANDEZ; LEUNG, 2015; SOMÉ et al., 2015). O zinco pode ajudar a reduzir as citocinas, proteínas do sistema imunológico que ajudam a controlar a inflamação (SANDESTEADA; PRASADA, 2009). O comportamento doentio (CD) é uma resposta comportamental e imune, específica e temporária, que ocorre em diversas espécies em diferentes processos inflamatórios/infecciosos (KENT et al., 1992; HART, 1998; YIRMIYA et al., 1999; LARSON; DUNN, 2001). É geralmente acompanhado por febre, prostração, diminuição da atividade exploratória, do comportamento social, alimentar e sexual, além de prejuízos cognitivos (KELLEY, 2007). O tratamento com zinco foi capaz de prevenir o CD nos animais expostos ao LPS após o desafio estressor (GALVÃO et al., 2013). Quando um paciente está infectado por um agente patogênico que libera a IL-1, a infecção atua reduzindo o nível de zinco no plasma. No caso de uma infecção, tal como a causada pelo LPS, pode ocorrer queda de zinco devido a um atraso na absorção e na mobilização de zinco (OMS, 1998; TRUMBO et al., 2001). O zinco também suprime a ICAM-1, que serve como um receptor para o vírus, e

inibe a protease de HIV tipo 1.6. A deficiência de zinco na dieta é uma condição que atinge pelo menos uma em cada cinco pessoas no mundo todo, em parte por causa da baixa ingestão de alimentos derivados de carne animal, especialmente carne vermelha, a mais rica fonte alimentar comum de zinco e consumo elevado de produtos de cereais de grãos integrais e legumes ricos em fitato (OMS, 1998; TRUMBO et al., 2001). A presença de zinco na alimentação afeta vários aspectos da imunidade mediada por células, incluindo a expressão de interleucina-2 e interferon- γ . A interleucina-2 estimula a produção de células *natural killer* e células T citolíticas que matam vírus, bactérias e células tumorais. Interferon- γ e interleucina-2 juntamente ativam monócitos, macrófagos que matam parasitas (OMS, 1998; TRUMBO et al., 2001). O efeito da suplementação de zinco pode resultar no aumentando do controle de infecções, bem como no favorecimento uma rápida recuperação das funções do sistema imune (ALLEN, 1998).

1.4 O COMPORTAMENTO MATERNAL (CM)

O CM consiste de uma série de cuidados que os membros adultos de uma determinada espécie realizam em torno dos indivíduos reprodutivamente imaturos, para auxiliar na propagação de sua espécie. Entendemos CM em mamíferos como todo o cuidado dado pelas mães aos seus filhotes, desde o nascimento até que eles desenvolvam características e habilidades que assegurem sua própria sobrevivência, tornando-se independente da dieta láctea e dos demais cuidados maternos (CROWELL-DAVIS; HOUP, 1986). Em mamíferos, a gravidez, o parto e a lactação são diferentes fases do ciclo reprodutivo caracterizadas por mudanças adaptativas a fim de prover um ambiente ótimo à prole imatura. Uma rata lactante integra um conjunto de comportamentos adaptativos no cuidado e nutrição da prole para que ela sobreviva. Em ratas as ações maternas são observadas e registradas quando a rata apresenta comportamentos diretamente relacionados aos filhotes, como a busca, o agrupamento e ficar sobre eles aquecendo-os no ninho, além dos indiretos como agressividade e construção do ninho. Os cuidados maternos que se expressam desde o nascimento da prole, se mantêm por todo o período de lactação e se transformam ao longo do desenvolvimento desta (NUMAN, 1994). O controle

do CM envolve fatores neuroendócrinos e sensoriais. Os hormônios gestacionais preparam o animal para agir de forma maternal para com os filhotes enquanto que os neurotransmissores o regulam durante a fase de manutenção e lactação (ROSENBLATT et al., 1985; NUMAN, 1994; MATTSON; MORELLI, 2005).

1.5 DOPAMINA E COMPORTAMENTO MATERNAL

A dopamina (DA) controla funções fisiológicas como atividade locomotora, comportamento sexual e o comportamento de ingestão de alimentos (PIJNENBURG; VAN ROSSUM, 1973; HERNANDEZ; HOEBEL, 1988; CRUZ-CASALLAS et al, 1999). A DA influencia motivações de incentivo, via sistema mesolímbico, principalmente em N.Ac (ROBBINS; EVERITT, 1996; PARKINSON et al., 2000; WILLNER; SCHEEL-KRUGER., 1991). Esta catecolamina está envolvida tanto com a fase inicial como com a fase de manutenção do CM (HANSEN et al., 1991; STERN; TAYLOR, 1991). Neste sentido, dentre as monoaminas a DA é a mais estudada no que diz respeito a CM. O comportamento de trazer os filhotes para o ninho é o parâmetro mais frequentemente quantificado do CM em ratos, e consiste em uma sequência motora repetitiva que depende de DA (STERN, 1989; STERN, 1996). Injeções sistêmicas de antagonistas competitivos de DA (0,2 mg/Kg) como o haloperidol ou raclopride dose dependentemente aumentam o tempo para trazer os filhotes para o ninho (GIORDANO et al., 1990; STERN; TAYLOR, 1991; STERN; KEER, 1999; SILVA et al., 2001; LONSTEIN, 2002). Nos dois casos esse efeito foi revertido pela administração de 0,1 mg/Kg de apomorfina um agonista dopaminérgico (GIORDANO et al., 1990). Outros componentes motores do CM como construção de ninho e comportamento de limpeza dos filhotes são inibidos pela administração sistêmica de haloperidol (GIORDANO et al., 1990; STERN; TAYLOR, 1991).

1.6 LIPOPOLISSACARIDEO (LPS) E DOPAMINA.

Estudos sobre as interações entre o cérebro e o sistema imunológico revelaram conexões bidirecionais entre os sistemas neural, neuroendócrino e o sistema imunológico (ESKANDARI; WEBSTER; STERNBERG, 2003). Está bem estabelecida a ideia de que a ativação imune provoca modificações neuroendócrinas e de neurotransmissores centrais (RIVIER, 1993; ANISMAN; ZALCMAN; ZACHARKO, 1993; BLALOCK, 1994; RIVEST, 1995; MERALI; LACOSTA; ANISMAN, 1997; DUNN et al., 2006). O LPS é uma endotoxina bacteriana capaz de ativar o sistema imune liberando citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α , dentre outros) que resultam em alterações no sistema nervoso central, causando febre, sonolência e diversas alterações comportamentais associadas a enfermidades, sendo estas respostas em conjunto denominadas de “comportamento doentio” (AVITSUR; WEIDENFIEL; YERMEYA, 1999). As citocinas podem afetar o metabolismo do sistema dopaminérgico, por exemplo: a IL-1 pode induzir a síntese de DA; e a IL-2 pode diminuir a transmissão dopaminérgica na área nigroestriatal (DUNN et al., 2006). A DA é um neurotransmissor, com atividade estimulante no sistema nervoso central. A inflamação crônica induzida pelo LPS libera citocinas que irão agir no sistema dopaminérgico, que possui papel importante em patogenias de desordens neurológicas e psiquiátricas tais como esquizofrenia e Parkinson (HORNYKIEWICZ, 1998). A DA está relacionada também com o desempenho motor, a motivação locomotora e a modulação emocional (INGRAN, 2000). As citocinas afetam muitos comportamentos, incluindo o sono, apetite, comportamento sexual, memória e atividade motora. Desta forma o sistema dopaminérgico pode ter um papel importante na mediação do comportamento do filhote e nas interações com a mãe.

1.7 LPS, DOPAMINA E PROLACTINA

O LPS é uma endotoxina que provoca uma forte resposta por parte de sistemas imunitários de animais saudáveis. Macrófagos, monócitos, células dendríticas e linfócitos B que entram em contato com um LPS promovem resposta inflamatória,

febre, vasodilatação, por meio do óxido nítrico e secreção de eicosanoides (MORAN et al., 2001). A prolactina pode atuar como uma ponte entre os sistemas neuroendócrino e imune. Verificou-se em humanos, a síntese de prolactina em numerosos sítios extra-hipofisários, inclusive no sistema imunológico como linfócitos T e B, monócitos, neutrófilos, células 'natural killer' e timócitos (BEN-JONATHAN; HUGO, 2015). A prolactina é controlada tonicamente pela DA e secretada pelos neurônios que se projetam do núcleo arqueado para a eminência média no hipotálamo, formando o trato dopaminérgico túbero-infundibular. A DA assim produzida é liberada no sistema sanguínea porta-hipofisário e atinge a hipófise anterior (BEN-JONATHAN; HUGO, 2015). A atividade rítmica semi-circadiana dos neurônios dopaminérgicos do sistema túbero-infundibular determina os picos diurno e noturno de secreção de prolactina (TIMMERMAN et al., 1998). Esta atividade é mais evidente em ratas do que em ratos e envolve também a participação colinérgica, opioidérgica e serotoninérgica, podendo ser observada em qualquer fase do ciclo estral da rata (BEN-JONATHAN; HUGO, 2015). O trato retino-hipotalâmico, relacionado ao sistema temporizador central dos mamíferos, também pode inibir a secreção de prolactina estimulando a liberação de DA dos neurônios túbero-infundibulares (TIMMERMAN et al., 1998). Assim sendo, a principal função neuroendócrina conhecida da DA é o controle tônico que ela exerce sobre a síntese e a secreção de prolactina (FELICIO et al., 1996; BEN-JONATHAN; HUGO, 2015). Este fato pode ser mostrado por meio do uso de drogas que atuam sobre os sistemas dopaminérgicos. Drogas como bromopride ou a domperidona, antagonistas dopaminérgicos, provocam o aumento da secreção de prolactina. Já o uso de um agonista dopaminérgico, a bromocriptina, provoca a diminuição da secreção de prolactina (FELICIO et al., 1996). O papel da prolactina sobre o CM tem sido amplamente estudado principalmente com relação ao desencadeamento deste comportamento (GONZÁLEZ-MARISCAL, 2015; WANG, 2015).

1.8 A INTERAÇÃO MÃE E FILHOTE

Segundo Kirsten et al. (2008) já está bastante estabelecido que processos inflamatórios e infecções bacterianas ou virais em gestantes levam a interferências no ambiente fetal, podendo resultar em diversos danos a prole. Estudos mostram que danos comportamentais permanentes e severos podem ser causados não só por problemas genéticos, drogas ingeridas durante a gestação *etc.*, mas também simplesmente por uma infecção bacteriana. A que tantas mulheres grávidas podem ser expostas, por vezes continuamente. Sabe-se que infecções, podem diminuir a concentração plasmática materna de zinco, reduzindo sua disponibilidade para o feto. O rato, diferentemente do ser humano, nasce imaturo sendo que sua primeira semana de vida representa os últimos estágios intrauterinos da vida de um bebê humano. O período perinatal tem seu início ao nascimento da prole, sendo finalizado com o término da lactação. A interação mãe e filhote é tida tipicamente como simbiótica. Muitas das mudanças ocasionadas no CM são estimuladas por estimulações sensoriais vindas dos próprios filhotes, tais como a vocalização e o ato de sucção (WALKER et al., 2009). Os filhotes, quando separados da mãe, sinalizam para serem recolhidos através de dicas olfativas, visuais e da vocalização, que representam formas de comunicação de filhote para a mãe (TAKAHASHI; KASHINO; HIRONAKA, 2010). Por outro lado, o ambiente neonato é determinado pela mãe que é responsável pela sobrevivência do filhote. Intervenções na relação mãe e filhote podem afetar os comportamentos (HUOT et al., 2007). Poucos trabalhos se preocuparam em examinar os efeitos da ativação do sistema imune neste período. Durante o mestrado investiguei, em ratas, as possíveis alterações induzidas pela exposição de fêmeas lactantes ao LPS com sua prole. Para tanto, em fêmeas receberam LPS no 3º dia da lactação, foram observados os sinais de comportamento doentio. Assim, mediu-se: a atividade geral em campo aberto, o comportamento maternal e maternal agressivo, o peso corporal, consumo de ração e água e a temperatura corporal por 120 horas. Compararam-se estes efeitos com ratas virgens tratadas com a mesma dose de LPS. Observamos que 1) Em ratas virgens e lactantes o tratamento com LPS modificou a temperatura e peso corporal bem como o consumo de água e ração; 2) No período de lactação foi observada redução da latência para carregar o primeiro filhote. Na prole verificou-se que: 3)

Houve alteração no padrão de vocalização no 5.^o dia pós natal dos filhotes de mães expostas ao LPS no 3.^o dia de lactação 4) houve alteração no *burst* e fagocitose no 21.^o dia pós natal dos filhotes de mães expostas ao LPS no 3.^o dia de lactação. Concluiu-se que a exposição de ratas ao LPS promoveu alterações na interação mãe filhote (NASCIMENTO et al. 2013; NASCIMENTO et al. 2014). A lactação representa um momento biológico que merece o máximo de atenção com relação à oferta de micronutrientes, em especial o zinco, tendo em vista que a deficiência desse nutriente está relacionada com uma série de efeitos deletérios para a interação mãe e filhote, com consequente aumento das taxas de morbimortalidade, dentre outros agravos à saúde. Portanto este trabalho investigou se o tratamento com zinco poderia modificar as alterações causadas pelo LPS no período de lactação. Verificamos também as respostas comportamentais frente a um novo desafio imune para melhor caracterizar possíveis diferenças na sensibilidade ao LPS. O tratamento para as mães foi feito no 3.^o dia de lactação.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as adaptações comportamentais e neuroimunológicas de ratas e de sua prole decorrentes de uma inflamação experimental produzida pelo LPS e a possível influência do tratamento com zinco nessas adaptações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a:

- influência da administração de LPS e zinco em ratas virgens na temperatura, peso corporal, consumo de água e ração.
- influência da administração de LPS durante a hiperprolactinemia em ratas virgens na temperatura, peso corporal, consumo de água e ração.
- influência da administração de LPS e zinco em ratas gestantes na temperatura, peso corporal, consumo de água e ração tratadas no GD 9,5.
- influência da administração de LPS e zinco em ratas lactantes na temperatura, peso corporal, consumo de água e ração tratadas no terceiro dia de lactação.
- influência da administração de LPS e zinco em ratas virgens na atividade geral em campo aberto.

- influência da administração de LPS e zinco em ratas gestantes na atividade geral em campo aberto tratadas no GD 9,5 e observadas duas horas após o tratamento com a endotoxina.
- influência da administração de LPS e zinco em ratas lactantes na atividade geral em campo aberto tratadas no terceiro dia de lactação e observadas no quinto dia de lactação.
- influência da administração de LPS e zinco no Comportamento maternal de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação e observadas no quinto dia de lactação.
- vocalização ultrassônica no PND3 ao PND7 da prole de filhotes de mães tratadas com LPS e zinco no terceiro dia de lactação.
- atividade geral no PND21 da prole das ratas lactantes tratadas com LPS e zinco no PND3, desafiadas com LPS e observadas duas horas após o desafio.
- influência da administração de LPS e zinco em ratas lactantes no *burst* oxidativo e na fagocitose de leucócitos da prole.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos e ratas *Wistar* adultos, com 12 a 14 semanas de idade e peso corporal entre 200 e 350 gramas. Esses animais, provenientes do biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, permaneceram em gaiolas-moradia de polipropileno (38 x 32 x 16 cm), forradas com maravalha (esterilizada e livre de resíduos). Os ratos foram mantidos em sala com aeração, exaustão, umidade entre 65% e 70% e temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, controlados automaticamente por meio de um aparelho de ar condicionado central, com luz artificial (ciclo de 12-horas luz/12-horas escuro, luzes ligadas às 6h00) e com acesso a água filtrada e ração (Nuvilav®, Nuvital company, São Paulo, Brasil) *ad libitum*. Os animais foram utilizados nesse estudo de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil (Protocolo nº 5868070714). Essas diretrizes são baseadas nas normas do National Institutes of Health (Bethesda, MD). Os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos de boas práticas de laboratório com métodos de garantia de qualidade.

3.2 O ACASALEMENTO

As ratas empregadas no acasalamento eram virgens e os ratos eram sexualmente experientes e da mesma linhagem, mas de ninhadas diferentes. Para o acasalamento, as ratas foram acondicionadas nas gaiolas-moradia dos machos ao final do período de luz (17h00 – 18h00), sempre duas ratas por macho e lá mantidas durante o período noturno do ciclo de luz. Inicialmente as ratas foram colocadas com machos, duas para cada um, até a detecção da prenhez. Esta detecção da prenhez foi feita no começo da manhã (7:00 - 8:00 horas), por meio do lavado vaginal. Este procedimento consiste em introduzir uma pipeta plástica contendo salina (cloreto de

sódio 0,9%) na vagina da rata, mas não muito profundamente para evitar a indução de pseudo-prenhez, colhendo a secreção vaginal. Logo após esta etapa, o conteúdo líquido da pipeta foi colocado em uma lâmina de vidro e observado ao microscópio óptico. A constatação da presença de espermatozóides foi considerada como indicador do dia de prenhez (GD) 0 daquela fêmea. A partir desse dia, esses animais foram acondicionados individualmente em gaiolas moradia e ali permaneceram durante toda a gestação. Depois da etapa de acasalamento, os machos foram descartados. Ao nascimento da prole foi feita a padronização das ninhadas em 8 filhotes por fêmea para, quando possível, 4 fêmeas e 4 machos. O período de amamentação foi de 21 dias.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Ratas virgens

28 ratas virgens no estro foram divididas em 4 grupos S+S, S+Zn, LPS+S e LPS+Zn. As ratas dos grupos S+S e S+Zn receberam solução Salina por via i.p. e 1 hora após aplicação receberam 2 mg/kg de zinco por via s.c., ou solução salina por via i.p., já as dos grupos LPS+S ou LPS+Zn receberam 100 µg/kg de LPS por via i.p., e uma hora após a aplicação receberam solução Salina por via i.p., ou 2 mg/kg de zinco por via s.c., duas horas após a aplicação foi avaliada a atividade geral em campo aberto, e de duas até 96 horas foram avaliadas a temperatura e peso corporal, bem como o consumo de água e ração.

Figura 1 - Delineamento experimental – Ratas Virgens

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

3.3.2 Ratas virgens induzidas a hiperprolactinemia

Foram empregadas 20 fêmeas virgens. A hiperprolactinemia foi induzida com domperidona na dose de 1,7mg/kg por via s.c. 3 vezes ao dia (7h30, 15h00 e 22hs). A duração do tratamento foi de 5 dias consecutivos (FELICIO; BRIDGES, 1992). Depois do tratamento com a domperidona essas fêmeas foram divididas em 4 grupos, sendo os grupos S+S, S+Zn, LPS+S e LPS+Zn. As ratas dos grupos S+S e S+Zn receberam solução salina por via i.p., e 1 hora após aplicação receberam 2 mg/kg de zinco por via s.c., ou solução salina por via i.p., já as dos grupos LPS+S ou LPS+Zn receberam 100 µg/kg de LPS por via i.p., e uma 1 após a aplicação receberam solução salina por via i.p., ou 2mg/kg de zinco por via s.c. Após o tratamento, foram avaliadas a temperatura, o peso corporal, o consumo de água e ração das 2 horas até as 96 horas, após a administração do LPS.

Figura 2 - Delineamento experimental - Ratas virgens induzidas a hiperpolactinemia

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

3.3.3 Ratas gestantes

Foram empregadas 20 fêmeas gestantes divididas em quatro grupos, sendo os grupos S+S, S+Zn, LPS+S e LPS+Zn. As ratas dos grupos S+S e S+Zn receberam no GD 9,5 solução salina por via i.p., e uma hora após aplicação receberam 2mg/kg de zinco por via s.c., ou solução salina por via i.p. Já as dos grupos LPS+S ou LPS+Zn, receberam no GD 9,5 100µg/kg de LPS por via i.p., e 1 hora após a aplicação, receberam solução salina por via i.p., ou 2mg/kg de zinco por via s.c. Duas horas após a administração de LPS, foi avaliada a atividade geral em campo aberto e de 2 a 96 horas foram avaliadas a temperatura e o peso corporal, bem como o consumo de água e ração.

Figura 3 - Delineamento experimental - Ratas Gestantes

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

3.3.4 Ratas lactantes

Foram empregadas 28 lactantes divididas em quatro grupos, sendo os grupos S+S, S+Zn, LPS+S e LPS+Zn. As ratas dos grupos S+S e S+Zn receberam no 3º dia de lactação 100 µg/kg de solução salina por via i.p., e uma hora após aplicação, receberam 2 mg/kg de zinco por via s.c., ou solução Salina por via i.p. Já as dos grupos LPS+S ou LPS+Zn, receberam no 3º dia de lactação 100 µg/kg de LPS por via i.p., e 1 hora após a aplicação, receberam solução salina por via i.p., ou 2 mg/kg de zinco por via s.c. Duas horas após o tratamento, foi avaliada a atividade geral em campo aberto, de duas a 96 horas foram avaliadas a temperatura, o peso corporal, bem como o consumo de água e ração das duas até 96 horas e as 48 horas foi avaliado o comportamento maternal.

Figura 4 - Delineamento - Ratas lactantes

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

3.3.5 Filhotes

Foram empregados 36 filhotes, divididos em cinco grupos, sendo os grupos: Branco, S+S, S+Zn, LPS+S e LPS+Zn. Os filhotes do grupo Branco são filhotes de mães que não receberam qualquer tratamento anterior e não receberam um desafio no PND21. Já os filhotes dos grupos S+S e S+Zn, são filhotes de fêmeas que receberam, no 3º dia de lactação, solução salina por via i.p., e uma hora após a aplicação, receberam 2 mg/kg de zinco por via s.c., ou solução Salina por via i.p. Já as dos grupos LPS+S ou LPS+Zn receberam, no 3º dia de lactação, 100 µg/kg de LPS por via i.p., e uma após a aplicação, receberam solução salina por via i.p., ou 2 mg/kg de zinco por via s.c. Todos os filhotes dos grupos S+S, S+Zn, LPS+S e LPS+Zn no PND21 receberam 50 µg/kg de LPS por via i.p. duas horas após a administração de LPS. Foram avaliadas a atividade geral em campo aberto e o *burst* oxidativo e fagocitose de neutrófilos.

Figura 5 - Delineamento experimental - Filhotes

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

3.4 PRODUTOS BIOLÓGICOS

- ✓ LPS: lipopolissacarídeo obtido por extração fenólica a partir de *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8 (Sigma®).
- ✓ Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (DIFCO®) - bactéria marcada com Iodeto de Propídio (Sigma, St Louis, MO) utilizada para avaliar a atividade fagocítica realizada por macrófagos peritoneais e de neutrófilos sanguíneos

3.5 MEDICAMENTOS, REAGENTES E SOLUÇÕES

- ✓ Solução salina: solução aquosa de cloreto de sódio estéril a 0,9%.
- ✓ Solução de LPS: solução na concentração de 50,100 OU 200 mg / ml de LPS em solução aquosa de NaCl estéril a 0,9%.
- ✓ Domperidona: Domperidone ($C_{22}H_{24}ClN_5O_2$) TOCRIS, Bristol, UK, Cat No. 2536.

- ✓ Diacetato 2`7` Diclorofluorisceína (DCFH-DA/ Molecular Probes, Eugene, OR)- empregado na citometria de fluxo. Este reagente foi mantido congelado (-20° C), e protegido da luz, sendo dissolvido em PBS no momento de uso;
- ✓ EDTA (Sigma®)- utilizado na técnica de fagocitose, na concentração de 3 mM, com o objetivo de interromper a reação após o período de incubação das amostras;
- ✓ Heparina (Liquemine®-Roche)- utilizado para evitar a coagulação das amostras de sangue após a coleta;
- ✓ Iodeto de Propídio (PI) (Sigma®)- utilizado na técnica de citometria de fluxo, responsável pela emissão de fluorescência vermelha das amostras captadas pelo citômetro;
- ✓ NaCl 0,2% e 1,6%- Soluções utilizadas com o objetivo de romper as hemácias presentes nas amostras;
- ✓ NaCl 0,85% e NaCl 0,9% - Soluções utilizadas na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus*;
- ✓ PBS (Phosphate-buffered saline, pH=7,2-7,4)-Solução utilizada nas técnicas de *burst* oxidativo e fagocitose;
- ✓ PBS glicosado - Solução utilizada na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus*;
- ✓ PMA - Miristato-acetato de forbol-(Calbiochem®)- utilizado como estímulo para desencadear o *burst* oxidativo de macrófagos e neutrófilos.
- ✓ Zinco: Zinc sulfate heptahydrate (USP testing specifications) COD Z0635-100MG SIGMA.

3.6 PREPARADO DAS SOLUÇÕES, DOS REAGENTES E DO ESTIMULO DO *BURST* OXIDATIVO.

3.6.1 Preparo das soluções

PBS (Phosphate-buffered saline, pH=7,2-7,4)- Solução estoque 10x concentrada:

✓ Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O (Merck®)	42,96g
✓ NaH ₂ PO ₄ .1 H ₂ O (Nuclear®)	3,6g
✓ NaCl (Labsynth®)	82,0g
✓ H ₂ O destilada qsp 1000ml	

PBS 1x:

No momento do uso, dilui-se 100 ml da solução estoque 10x concentrada e completa-se com H₂O destilada para um volume de 1000 ml.

PBS glicosado:

✓ PBS 10x	100 ml
✓ glicose	0,9 g
✓ gelatina	1 g
✓ H ₂ O destilada qsp	1000 ml

Soluções Salina 0,2%, 0,85%, 0,9% e 1,6%:

Pesa-se 2g, 8,5g, 9g e 16g respectivamente de NaCl e completa-se cada solução com 1000 ml de H₂O destilada.

3.6.2 Preparo dos reagentes

DCFH-DA 25 mM-Soluções Estoque

Dilui-se 28,35 mg de DCFH-DA em 2 ml de etanol. Esta solução será acondicionada em frasco âmbar para protegê-la da luz, sendo mantida em freezer a -20°C.

Solução de DCFH-DA

No momento do uso, dilui-se a solução estoque em PBS 1 x de modo tal a permitir que o volume final desta solução esteja de acordo com o número de animais, isto é, que seja suficiente para contemplar todas as amostras do experimento.

Apenas para ilustrar e facilitar a compreensão podemos citar alguns exemplos desta diluição:

-100 µl DCFH-DA (solução estoque) +8,2 ml de PBS-para 13 animais;

-50 µl DCFH-DA (solução estoque) +4,1 ml de PBS-para 6 animais;

E assim por diante...

Solução de EDTA 3mM

Para o preparo desta solução, 3 ml da solução estoque de EDTA (1 mol/l) foram diluídos em 997 ml de PBS. Esta solução foi mantida em geladeira.

3.6.3 Preparo dos estímulos

Solução de PMA

A solução de PMA foi preparada utilizando-se de 1µl da solução estoque de PMA (100ng/100µl) e completando-se o volume com 999µl de PBS. Este volume, ou seja, 1ml, é suficiente para a realização da técnica de *burst* para um total de 10 animais.

Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923-SAPI

Antes de esta bactéria ser utilizada para a realização da técnica do *Burst* e da Fagocitose, foi necessário conjugá-la com o iodeto de propídio (PI), de forma tal a permitir que a bactéria emitisse uma fluorescência vermelha possibilitando, assim, sua leitura no citômetro.

O protocolo de conjugação da bactéria foi aquele proposto por Hasui, Hirabayashi e Kobayashi (1989), que consiste do seguinte procedimento:

- ✓ cultivar bactérias viáveis em ágar sangue por 48 horas;
- ✓ colocar as colônias de bactérias em tubos de ensaio estéreis, em um fluxo laminar próprio para bactérias;
- ✓ ressuspendê-las em NaCl 0,85% e centrifugá-las por 10 minutos a 2500 rpm;
- ✓ “inativar” as bactérias a 60°C por 30 minutos;
- ✓ lavar 3 x com NaCl 0,85% e após cada lavada, centrifugar por 10 minutos a 170 g;
- ✓ ajustar a concentração das bactérias de modo tal que sua leitura no espectrofotômetro (Uv/Visível) a uma absorbância de 620 nm tenha um valor que varie entre 2,4 a 2,7. Esses valores, nesta absorbância, são aqueles em que as bactérias, em suspensão, apresentam uma turbidez que corresponde

ao n ° 8 escala de Mc.Farland. Para a leitura no citômetro é necessário que as bactérias estejam nestas concentrações;

- ✓ preparar uma solução de iodeto de propídio a 5 %;
- ✓ centrifugar nas mesmas condições, desprezar o sobrenadante e adicionar 25 µl da solução de iodeto de propídio a 5%;
- ✓ incubar a temperatura ambiente por 30 minutos, no escuro; lavar a suspensão de bactéria marcada mais 3x com NaCl 0,85% e centrifugando após cada lavagem por 10 minutos a 170 g;
- ✓ ressuspender a bactéria em 5 ml de PBS glicosado (livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺);
- ✓ “aliquotar” em eppendorfs de 2 ml, proteger da luz e congelar ‘a -80°C;
- ✓ descongelar imediatamente antes do uso.

Após a inativação das bactérias e para evitar contaminações, todo o procedimento descrito acima citado, foi realizado dentro de um fluxo laminar empregando-se, sempre, soluções estéreis.

4 PROCEDIMENTOS

4.1 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA E PESO CORPORAL, CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO EM RATAS VIRGENS, VIRGENS INDUZIDAS A HIPERPROLACTINEMIA, GESTANTES E LACTANTES

Foram avaliados a temperatura e o peso corporal, o consumo de água e ração das fêmeas virgens, gestantes e lactantes de 2 horas até noventa e 96 horas após a administração de LPS e zinco. Para avaliação da temperatura corporal foi utilizado um termômetro clínico digital de ouvido (G -Tech – Accumed), onde todos os dias por volta das 10hs da manhã foram aferidas e anotadas as temperaturas de cada animal. Foi avaliado também o consumo de água, ração e peso. Isso foi feito da seguinte maneira, durante cinco dias, por volta do mesmo horário, foram medidas e pesadas as quantidades de água, ração ingeridas e o peso de cada animal.

Figura 6 - Modelo de termômetro digital de ouvido utilizado

Fonte: www.americanas.com.br (2015)

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO DE RATAS VIRGENS, GESTANTES, LACTANTES E FILHOTES

A atividade geral de fêmeas virgens, gestantes, lactantes e filhotes foi observada em campo aberto. Neste teste os animais foram colocados em um campo aberto sempre durante um mesmo período do dia. Cada animal foi colocado individualmente no centro do aparelho de campo aberto, e foi observado por 3 minutos. Para animais adultos o fundo deste aparelho é dividido em vinte e cinco partes aproximadamente iguais, já para filhotes de ratos foi construído segundo o modelo descrito por Broadhurst (1960) e consiste de uma arena de madeira, medindo 40 cm de diâmetro x 40 cm de altura, pintada de branco. No intervalo entre a observação de cada animal, o aparelho foi limpo com solução de álcool a 5%, para evitar a interferência do odor do animal anterior. Foram tomadas as seguintes medidas: locomoção, definiu-se como unidade de locomoção o ato de o animal penetrar com as quatro patas em uma das divisões do chão da arena; levantar, corresponde à postura de o animal permanecer apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima, podendo ou não tocar com as patas dianteiras as paredes do campo aberto; defecação, cada bolo de fezes produzido pelo animal durante o período de teste foi registrado como unidade de defecação. O registro da frequência dos parâmetros foi feito por intermédio de um contador manual. O tempo de imobilidade também foi medido, sendo este considerado quando o animal não apresenta locomoção e movimentos de farejar. Este parâmetro foi medido com o auxílio de um cronômetro.

Figura 7 - Modelo de campo aberto utilizado

Fonte: (DROMBROWSKI, P. A., 2005)

4.3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNA EM RATAS LACTANTES

O teste comportamental foi realizado no 5º dia da lactação com grupos de 7 animais. Aproximadamente às 8hs, a ninhada foi retirada da gaiola, sendo colocada em outra gaiola sem maravalha e permanecendo lá por 1 hora. A seguir, os oito filhotes, sendo 4 machos e 4 fêmeas, foram colocados de volta na gaiola, dividida em quadrantes e o comportamento materno foi observado por 60 minutos. A observação do comportamento materno foi realizada medindo-se: tempo de latência(s) para contato com o primeiro e com o último filhote, latência para carregar o primeiro filhote, e latência entre carregar o primeiro e o último filhote. Confirmando resultados anteriores., uma vez tendo buscado e agrupado os filhotes, todas as ratas apresentaram cifo fisiológica e amamentaram os filhotes sem que diferenças de latências nesse aspecto fossem constatadas (NASCIMENTO et al., 2014).

4.4 VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA

Um filhote de cada grupo foi individualmente colocado em gaiola de polipropileno (30 x 20 x 12 cm) e conduzido para a sala teste (com temperatura controlada, $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) separada da sala moradia. A vocalização ultrassônica foi detectada usando um microfone ultrassônico (modelo D940, Pettersson Elektronik AB®, Uppsala, Sweden) ajustado para uma escala centrada em 40 kHz e colocado distante 10 cm do piso da gaiola. As vocalizações foram gravadas como arquivos digitais .wav (Notebook HP Pavilion dv5 PC, Palo Alto, CA, EUA). Os parâmetros avaliados foram o tempo de latência para a primeira vocalização ultrassônica (em segundos) e o número de vocalizações ultrassônicas em um período de 5 minutos. Os testes foram realizados sempre entre às 9h30 e 10h30.

4.5 AVALIAÇÃO DO *BURST* OXIDATIVO E DA FAGOCITOSE DE NEUTRÓFILOS POR CITOMETRIA DE FLUXO NA PROLE

Foi utilizado um citômetro de fluxo (FACScalibur Becton Dickinson Immunocytometry Sistem, San Jose, Ca, USA) conectado com um computador (Macintosh Apple, CA, USA). Foram analisados 10.000 eventos utilizando-se o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades *FSC – Forward Scatter* e *SSC side Scatter* do aparelho que avaliam o tamanho e a complexidade interna, dos mesmos respectivamente. A fluorescência verde do DCFH foi mensurada a 530 ± 30 nm (detector FL1) sendo aquela de cor vermelha do *S. aureus* marcado com o iodeto de propídeo mensurada a 585 ± 42 nm. A fluorescência verde emitida pelo DCFH foi usada para estimar o *burst* oxidativo das células analisadas em diferentes situações de estimulação. A fagocitose foi estimada pela intensidade média de fluorescência/célula emitida pelo PI. A porcentagem de fagocitose (porcentagem de neutrófilos que fagocitaram as bactérias) foi calculada através do número de neutrófilos e macrófagos fluorescentes divididos pelo número total destas células e multiplicado por 100. As fluorescências do PI e do DCFH foram

analisadas utilizando-se compensação de fluorescências para corrigir quaisquer interferências de sinais emitidos pelos mesmos. Através do Cell Quest Pro[®] foram analisadas as populações de interesse em cada experimento (neutrófilos), excluindo-se as populações de linfócitos e monócitos por meio da análise dos *gates*. Além disso, para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo *branco* usado como controle de refringência basal da célula a ser analisada.

As células utilizadas para o estudo no citômetro de fluxo foram coletadas imediatamente após a eutanásia dos animais em câmara de CO₂. O sangue foi coletado através da veia porta hepática, com auxílio de seringas e agulhas previamente umedecidas em solução aquosa de etilenodiamino-tetracética-dissódica (EDTA) a 10%, sendo colocadas imediatamente em banho de gelo. Foram usadas amostras sanguíneas de 100 µl para a análise da atividade fagocítica. O preparo das amostras foi realizado de acordo com (HASUI; HIRABAYASHI; KOBAYASHI, 1989), da seguinte maneira: Uma bateria de 5 tubos foi, montada e numerada de “A” até “E” para cada animal. Cada tubo (de acordo com a letra) recebeu uma substância diferente, obedecendo-se sempre a uma mesma ordem. Desta forma, todos os tubos de “A” a “E” receberam alíquotas, que correspondem a 2×10^5 cel/100 µl de sangue. Os tubos com as letras “B”, “D” e “E” receberam 200 µl da solução de DCFH-DA 3 mM cada. Todos os tubos de letra “C” e “D” receberam 100 µl da solução de SAPI (100 ng). Os tubos de letra “E”, por sua vez, receberam 100 µl de PMA (100 ng). Como as amostras tinham o volume final de 1100 µl, todos os tubos foram completados com PBS 1x. Sendo assim, todos os tubos “A” receberam 1000 µl de PBS, os tubos “B” 800 µl, os “C” 900 µl e finalmente os tubos “D” e “E” receberam 700 µl. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria sob agitação a 37°C por 30 minutos. Depois da incubação, foram adicionados 2 ml de EDTA 3 mM em todos os tubos para interromper a reação, sendo os mesmos centrifugados posteriormente a 170 g por 10 minutos. Assim, foi desprezado o sobrenadante após a centrifugação; as células foram, então, ressuspensas por agitação manual, realizando-se a seguir a lise hipotônica das amostras com soluções de NaCl a 0,2% e 1,6%. Primeiramente, foi colocado em cada tubo 2 ml de NaCl 0,2% durante 20 segundos. Imediatamente após este período, foi colocado mais 2 ml de NaCl 1,6% para tornar a solução isotônica novamente. Após centrifugação foram realizadas novas lises hipotônica (uma segunda vez) com NaCl 0,2% e após, com NaCl 1,6%, seguindo-se todo o procedimento descrito acima. Após esta segunda lise, os tubos

foram centrifugados pela última vez sendo os sobrenadantes desprezados; as células resultantes foram ressuspensas em 1 ml de EDTA gelado. Após todo este procedimento, foi realizada a leitura das amostras no citômetro de fluxo; os tubos “A”, “C” e “D” foram utilizados para a avaliação da Fagocitose, enquanto que os tubos “B” e “E” foram utilizados na avaliação do *burst* oxidativo. Cada amostra passou pelo citômetro apenas uma vez, e de cada uma, foram adquiridos 10.000 eventos (células). A fluorescência foi obtida padronizando-se o número de eventos para cada tubo A, B, C, D e E. Os valores referentes ao *burst* oxidativo das amostras foram avaliados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pela população de neutrófilos. Este valor de média geométrica foi fornecido pelo aparelho sendo utilizado para indicar a intensidade de fluorescência das células. Com relação à atividade fagocítica, foi verificada a porcentagem de fagocitose, ou seja, o número de neutrófilos que fagocitaram o *S. Áureas* marcado com PI e, conseqüentemente que emitam fluorescência vermelha, divididos pelo número total destas células multiplicadas por 100. Foi avaliada, também, a intensidade de fagocitose (quantidade de bactérias fagocitadas) por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência vermelha emitida pelos neutrófilos.

5 ANALISE ESTATÍSTICA

O software GraphPad Prism 6.00 (GraphPad® Software, Inc., San Diego, CA, USA) foi utilizado para a análise estatística. Para variáveis contínuas, primeiramente verificou-se a homocedasticidade dos dados, que significa a ausência de diferenças significantes na variabilidade dos grupos, pelo teste de *Bartlett*. Uma vez confirmada a homocedasticidade, foi feito o teste *Kolmogorov-Smirnov* para avaliação da distribuição Gaussiana. Confirmada homocedasticidade e a normalidade dos dados, foram utilizados testes concebidos para dados paramétricos. Para os dados paramétricos com análises de três ou quatro grupos (ex: grupos S+S, S+LPS e LPS+Zn), foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de comparações múltiplas de *Tukey*. A ANOVA de duas vias foi empregada para análise de dados de várias observações, levando-se em conta os dias e tratamentos. Quando a ANOVA de duas vias detectou diferenças, foi usado para análise o pós-teste de comparações múltiplas de *Bonferroni*. O nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado suficiente para revelar diferenças significantes em todos os dados analisados. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão.

6 RESULTADOS

6.1 EXPERIMENTO 1

Avaliação da temperatura e peso corporal, bem como do consumo de água e ração de ratas virgens tratadas com LPS e zinco.

6.1.1 Resultados

As figuras – 8 e 9 ilustram as médias e os respectivos erros - padrão, e as diferenças existentes entre os grupos, e a figura – 10 ilustra a temperatura, ganho ou perda de peso corporal, bem como o consumo de água e de ração de ratas virgens tratadas com 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p., e 2mg/kg de zinco por via s.c. Foram observadas por 96 horas.

Temperatura corporal: A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferença com relação ao tratamento ([F2/180=51,06], $P<0.0001$) e entre os dias observados ([F9/180=90,15], $P<0.0001$). Havendo interação entre os fatores ([F18/180=156,15], $P<0.0001$). O teste de *Bonferroni* mostrou que às 2 e 4 horas, a temperatura do grupo LPS+S foi menor em relação aos demais grupos. Às 4 horas a temperatura do grupo LPS+Zn foi menor em relação ao grupo S+S. Às 48 horas a temperatura do grupo LPS+Zn foi menor e do grupo LPS+S foi maior em relação aos demais grupos, e às 72 horas a temperatura do grupo LPS+S foi maior em relação aos demais grupos. E às 96 horas a temperatura de todos os grupos se igualaram.

Ganho de peso: A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferenças com relação ao tratamento ([F2/72=1,310], $P=0.2761$) e dias de observação ([F3/96=21,36], $P<0.0001$) havendo interação entre os fatores ([F6/72=8,917], $P<0.0001$). O teste de *Bonferroni* mostrou que às 48 horas as ratas dos grupos LPS+S e LPS+Zn não tiveram ganho significativo de peso comparadas ao grupo

S+S. Às 96 horas as ratas do grupo LPS+Zn tiveram ganho significativo de peso comparadas aos demais grupos.

Consumo de água: A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferenças com relação ao tratamento ([F2/72=6,203], $P=0,0033$) e dias de observação ([F3/72=68,83], $P<0.0001$) havendo interação entre os fatores ([F6/72=19,08], $P<0,0001$). O teste de *Bonferroni* mostrou que as 48 horas os grupos LPS+S e LPS+Zn, e as 72 horas o grupo LPS+S, tiveram o consumo de água maior comparados aos demais grupos. Por outro lado, às 72 horas o grupo LPS+Zn tiveram o consumo de água menor comparados aos demais grupos.

Consumo de ração: A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferenças com relação ao tratamento ([2/72=9,790], $P<0.0001$) e dias de observação ([F3/72=283,2], $P<0.0001$) havendo interação entre os fatores ([F6/72=52,96], $P<0.0001$). O teste de *Bonferroni* mostrou que às 24 horas e 48 horas, o consumo de ração dos grupos LPS+S e LPS+Zn foi significativamente menor comparados ao grupo S+S, às 72 horas e 96 horas o consumo de ração dos grupos LPS+S e LPS+Zn foi significativamente maior comparados ao grupo S+S.

Figura 8 - Comparação entre os grupos em relação à temperatura de ratas virgens tratadas com LPS e zinco. Pós teste *Bonferroni* de comparações múltiplas

Grupos/horas	0hs	2hs	4hs	6hs	8hs	10hs	24hs	48hs	72hs	96hs
S+S x LPS+S	ns	↓ *	↓ *	ns	ns	ns	ns	↑ *	ns	ns
S+S x LPS+Zn	ns	ns	↓ *	ns	ns	ns	ns	↓ *	ns	ns
LPS+S x LPS+Zn	ns	↓ *	↓ *	ns	ns	ns	ns	↓ *	↓ *	ns

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

Nota: ns = não significativa, * ↑ = aumento de temperatura, * ↓ = queda de temperatura.

Figura 9- Comparação entre os grupos em relação ao ganho ou perda de peso, consumo de água e de ração de ratas virgens tratadas com LPS e zinco. Pós teste *Bonferroni* de comparações múltiplas

	24hs			48hs			72hs			96hs		
	Peso	Água	Ração	Peso	Água	Ração	Peso	Água	Ração	Peso	Água	Ração
S+S x LPS+S	ns	Ns	↓ *	Ns	↑ *	↓ *	ns	ns	↑ *	ns	ns	ns
S+S x LPS+Zn	ns	Ns	↓ *	↓ *	↑ *	ns	ns	↓ *	↑ *	ns	↓ *	ns
LPS+S x LPS+Zn	ns	Ns	Ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	↑ *	↓ *	ns

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

Nota: ns = não significativa, * ↑ = aumento no consumo de água/ração ou ganho de peso corporal,

* ↓ = diminuição no consumo água/ração ou diminuição no ganho de peso corporal

Figura 10 - Médias com os respectivos desvios – padrão da temperatura, ganho ou perda peso de corporal, bem como o consumo de água e ração de ratas virgens tratadas com LPS e zinco

Parâmetros	Horas	S+S	LPS+S	LPS+Zn
Temperatura	0	36,79±0,02	36,8±0,03	36,71±0,03
	2	36,72±0,02	36,1±0,03	36,6±0,04
	4	36,79±0,03	35,56±0,03	36,63±0,03
	6	36,77±0,04	36,66±0,03	36,64±0,02
	8	36,77±0,02	36,69±0,02	36,64±0,02
	10	36,77±0,03	36,64±0,02	36,67±0,03
	24	36,77±0,03	36,69±0,03	36,81±0,03
	48	36,73±0,03	37,96±0,05	36,14±0,04
	72	36,74±0,04	36,87±0,05	36,71±0,02
	96	36,79±0,04	36,73±0,02	36,71±0,03
Peso	24	3,4±0,28	3,8±1,55	3±0,55
	48	1,36±0,13	-1,06±0,28	-3,43±0,78
	72	1,43±0,23	2,6±1,47	3,71±0,57
	96	1,39±0,15	0,17±0,19	5,57±0,65
Água	24	34,46±1,31	27,21±0,28	27,11±1,27
	48	38,4±3,15	55,86±1,5	64,77±3,7
	72	38,13±2,22	45,7±1,13	28,7±1,85
	96	35,24±3	37,87±1,38	32,03±1,71
Ração	24	56,16±1,14	16,72±2,21	17,67±2,4
	48	48,01±3,65	29,87±2,87	32,84±3,56
	72	60,71±5,81	130,3±4,35	117,3±3,76
	96	66,3±6,23	93,77±3,17	105±2,55

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

Figura 11 – Temperatura, ganho ou perda de peso corporal, bem como o consumo de água e ração de ratas virgens que receberam no estro 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p e 2 mg/kg de zinco por via s.c., observadas 2 horas após o tratamento e por mais 96 horas.
*P<0.05. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni*

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

6.2 EXPERIMENTO 2

Avaliação da temperatura e peso corporal, bem como do consumo de água e ração de ratas virgens induzidas a hiperprolactinemia com domperidona, tratadas com LPS e zinco.

6.2.1 Resultados

As figuras - 12 e 13 ilustram as médias e os respectivos erros - padrão, e as diferenças existentes entre os grupos, e a figura - 14 ilustra a temperatura e peso corporal, bem como o consumo de água e ração de ratas virgens induzidas a hiperprolactinemia com domperidona e tratadas com 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p. e 2mg/kg de zinco por via s.c., observadas por 96 horas.

Temperatura: A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferença com relação ao tratamento ([F5/300=628,2], $P<0.0001$) e entre os dias observados ([F9/300=22,78], $P<0.0001$). Havendo interação entre os fatores ([F45/300=51,87], $P<0.0001$). O teste de *Bonferroni* mostrou que houveram diferenças significantes entre os grupos conforme ilustrado na tabela 3.

Ganho de Peso: A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferenças com relação ao tratamento ([F5/120=8,300], $P<0.0001$) e dias de observação ([F3/120=7,899], $P<0.0001$) havendo interação entre os fatores ([F15/120=5,448], $P<0.0001$). O teste de *Bonferroni* mostrou que houveram diferenças significantes entre os grupos conforme ilustrado na tabela 4.

Consumo de água: A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferenças com relação ao tratamento ([F5/120=50.02], $P<0.0001$) e dias de observação ([F3/120=44,53], $P<0.0001$) havendo interação entre os fatores ([F15/120=27,19], $P<0.0001$). O teste de *Bonferroni* mostrou que houveram diferenças significantes entre os grupos conforme ilustrado na tabela 4.

Consumo de ração: A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferenças com relação ao tratamento ([F5/120=201,2], $P<0.0001$) e dias de observação ([F3/120=202,2], $P<0.0001$) havendo interação entre os fatores ([F15/120=51,52],

$P < 0.0001$). O teste de *Bonferroni* mostrou que houveram diferenças significantes entre os grupos conforme ilustrado na tabela 4.

Figura 12 - Comparação entre os grupos em relação a temperatura de ração de ratas virgens induzidas ou não a hiperprolactinemia e tratadas com LPS e zinco. Pós teste *Bonferroni* de comparações múltiplas

Grupos	0h	2h	4h	6h	8h	10h	24h	48h	72h	96h
S+S X DOM+S+S	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*
S+S X DOM+LPS+S	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*
S+S X DOM+LPS+Zn	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*
DOM+S+S X LPS+S	↑*	ns	*	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*
DOM+S+S X DOM+LPS+S	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	↑*	ns	ns
DOM+S+S X LPS+Zn	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	ns	↑*	↑*
DOM+S+S X DOM+LPS+Zn	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns
LPS+S X DOM+LPS+S	↓*	ns	↑*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*
LPS+S X DOM+LPS+Zn	↓*	ns	↑*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*
DOM+LPS+S X LPS+Zn	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	↑*	ns	↑*	↑*
DOM+LPS+S X DOM+LPS+Zn	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	Ns
LPS+Zn X DOM+LPS+Zn	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	ns	↓*	↓*

Nota: ns = não significante, * ↑ = aumento no consumo de água/ração ou ganho de peso corporal, * ↓ = diminuição no consumo água/ração ou diminuição no ganho de peso corporal

Figura 13 - Comparação entre os grupos em relação ao ganho ou perda de peso, consumo de água e de ração de ratas virgens induzidas ou não a hiperprolactinemia e tratadas com LPS e zinco. Pós teste *Bonferroni* de comparações múltiplas

Grupos	24hs			48hs			72hs			96hs		
	Peso	Água	Ração	Peso	Água	Ração	Peso	Água	Ração	Peso	Água	Ração
S+S X DOM+S+S	ns	↑*	↓*	↓*	ns	↓*	ns	ns	↓*	↑*	ns	↓*
S+S X DOM+LPS+S	ns	↑*	↓*	ns	↑*	↓*	↑*	ns	↓*	ns	ns	↓*
S+S X DOM+LPS+Zn	ns	↓*	↓*	ns	ns	↓*	ns	↑*	↓*	ns	↑*	↓*
DOM+S+S X LPS+S	ns	↓*	ns	↓*	ns	ns	ns	ns	↑*	↓*	ns	↑*
DOM+S+S X DOM+LPS+S	ns	ns	ns	ns	↑*	ns	ns	↓*	ns	↓*	ns	Ns
DOM+S+S X LPS+Zn	ns	↓*	ns	↓*	ns	ns	ns	↓*	↑*	ns	ns	↑*
DOM+S+S X DOM+LPS+Zn	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	↑*	ns	↓*	↑*	Ns
LPS+S X DOM+LPS+S	ns	↑*	ns	ns	↑*	ns	ns	↓*	↓*	ns	ns	↓*
LPS+S X DOM+LPS+Zn	ns	↑*	ns	ns	ns	ns	ns	↑*	↓*	ns	↑*	↓*
DOM+LPS+S X LPS+Zn	ns	↓*	ns	↓*	ns	ns	ns	ns	↑*	↑*	ns	↑*
DOM+LPS+S X DOM+LPS+Zn	ns	ns	ns	ns	↓*	ns	ns	↑*	ns	ns	↑*	Ns
LPS+Zn X DOM+LPS+Zn	ns	↑*	ns	↑*	↓*	ns	ns	↑*	↓*	↓*	↑*	↓*

Nota: ns = não significante, * ↑ = aumento no consumo de água/ração ou ganho de peso corporal, * ↓ = diminuição no consumo água/ração ou diminuição no ganho de peso corporal

Figura 14 - Médias com os respectivos desvios – padrão da temperatura, ganho ou perda de peso corporal, bem como do consumo de água e ração de ratas virgens induzidas ou não a hiperprolactinemia e tratadas com LPS e zinco

Parâmetros	Horas	S+S	DOM+S+S	LPS+S	DOM+LPS+S	LPS+Zn	DOM+LPS+Zn
Temperatura	0	36,79±0,02	36,2±0,054	36,8±0,03	36,08±0,058	36,71±0,03	36,18±0,073
	2	36,72±0,02	36,2±0,054	36,1±0,03	36,08±0,058	36,6±0,04	36,18±0,073
	4	36,79±0,03	36,24±0,024	35,56±0,03	36,22±0,037	36,63±0,03	36,26±0,037
	6	36,77±0,04	36,16±0,05	36,66±0,03	36,12±0,048	36,64±0,02	36,22±0,037
	8	36,77±0,02	36,12±0,048	36,69±0,02	36,1±0,031	36,64±0,02	36,08±0,037
	10	36,77±0,03	36,12±0,037	36,64±0,02	36,2±0,037	36,67±0,03	36,14±0,04
	24	36,77±0,03	36,14±0,024	36,69±0,03	36,22±0,037	36,81±0,03	36,18±0,058
	48	36,73±0,03	36,08±0,03	37,96±0,05	36,26±0,05	36,14±0,04	36,1±0,049
	72	36,74±0,04	36±0,054	36,87±0,05	36±0,03	36,71±0,02	36,06±0,08
	96	36,79±0,04	36,04±0,04	36,73±0,02	36,08±0,037	36,71±0,03	36,06±0,04
Peso	24	3,4±0,28	2,6±0,87	3,8±1,55	2,4±1,86	3±0,55	1,8±0,66
	48	1,36±0,13	5,4±1,15	-1,06±0,28	1,6±1,43	-3,43±0,78	1,6±1,69
	72	1,43±0,23	4,8±1,02	2,6±1,47	5,4±1,43	3,71±0,57	1,4±0,24
	96	1,39±0,15	6,8±0,51	0,17±0,19	0,92±0,33	5,57±0,65	1,4±0,28
Água	24	34,46±1,31	102,28±14,86	27,21±0,28	101,1±37,306	27,11±1,27	101,06±11,805
	48	38,4±3,15	55,92±18,03	55,86±1,5	77,92±16,68	64,77±3,7	43,04±9,28
	72	38,13±2,22	49,34±17,72	45,7±1,13	23,4±7,32	28,7±1,85	70±8,025
	96	35,24±3	44,36±5,195	37,87±1,38	28,96±6,997	32,03±1,71	73,62±3,99
Ração	24	56,16±1,14	12,72±1,83	16,72±2,21	15±5,91	17,67±2,4	15,24±2,34
	48	48,01±3,65	19,2±2,19	29,87±2,87	18,26±1,709	32,84±3,56	18,26±0,82
	72	60,71±5,81	19,38±1,502	130,3±4,35	19,16±1,26	117,3±3,76	21,66±0,67
	96	66,3±6,23	28,28±2,02	93,77±3,17	23,02±1,45	105±2,55	30,808±2,6

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

6.3 EXPERIMENTO 3

Avaliação da temperatura e peso corporal, bem como do consumo de água e ração de ratas gestantes tratadas no GD 9,5 com LPS e zinco.

6.3.1 Resultados

As tabelas - 16 e 17 ilustram as médias e os respectivos erros padrões, e as diferenças existentes entre os grupos, e a figura - 18 ilustra a temperatura e peso corporal, bem como do consumo de água e ração de ratas gestantes tratadas no GD 9,5 com 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p e 2mg/kg de zinco por via s.c, observadas por 96 horas.

Temperatura: A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferença com relação ao tratamento ([F2/306=60,73], $P<0.0001$) e entre os dias observados ([F16/306=3,85], $P<0.0001$). Havendo interação entre os fatores ([F32/306=8,87], $P<0.0001$). O teste de *Bonferroni* mostrou que o tratamento com Zinco nos animais do grupo LPS+Zn deslocou a curva da temperatura em relação aos animais tratados com LPS+S para o período de 24-96 horas. Assim, verifica-se que nas ratas gestante a administração de LPS promoveu aumento da temperatura com relação aos grupos S+S e LPS+Zn das 2 às 10 horas enquanto que naqueles tratados com LPS+Zn verifica-se este aumento a partir das 24 horas, quando a temperatura das ratas do grupo LPS+S já se mostrava igualada ao daquelas do grupo S+S. Nota-se ainda que o Zn promoveu também aumento da temperatura das ratas em relação ao grupo S+S, LPS+S das 2 às 10 horas.

Ganho de Peso: A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferenças com relação ao tratamento ([F2/72=1,47] $P=0.3997$) e não indicou existência em relação aos dias de observação ([F3/72=2,524], $P=0.0644$) não havendo interação entre os fatores ([F6/72=1,05] $P=0.03997$). O teste de *Bonferroni* não mostrou diferenças significantes entre os grupos.

Consumo de água: A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferenças com relação ao tratamento ([F2/64=27,06], $P<0.0001$) e dias de observação ([F3/64=113,1], $P<0.0001$) havendo interação entre os fatores ([F6/64=6,066],

$P < 0.0001$). O teste de *Bonferroni* mostrou que em relação ao grupo S+S o consumo de água do grupo LPS+S foi menor as 96 horas. Em relação ao grupo LPS+S, o grupo LPS+Zn consumiu mais água as 24, 48 e 96 horas.

Consumo de Ração: A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferenças com relação ao tratamento ($[F_{2/72}=3,32, P=0.0414]$) e dias de observação ($[F_{3/72}=3,17, P=0.0294]$) não havendo interação entre os fatores ($[F_{6/72}=0,04, P=0.8194]$). O teste de *Bonferroni* não mostrou diferenças significantes entre os grupos.

Figura 16 - Comparação entre os grupos em relação à temperatura de ratas gestantes tratadas com LPS e zinco. Pós teste *Bonferroni* de comparações múltiplas

Grupos/Horas	0	2hs	4hs	6hs	8hs	10hs	24hs	48hs	72hs	96hs
S+S x LPS+S	Ns	ns	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	ns	ns	ns	ns
S+S x LPS+Zn	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	↑ *	↑ *	ns
LPS+S x LPS+Zn	Ns	ns	↓ *	↓ *	↓ *	ns	↑ *	↑ *	↑ *	ns

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

Nota: ns = não significante, * ↑ = aumento de temperatura, * ↓ = queda de temperatura

Figura 17- Comparação entre os grupos em relação ao ganho ou perda de peso, consumo de água bem como do consumo de ração de ratas gestantes e tratadas com LPS e zinco. Pós teste *Bonferroni* de comparações múltiplas

	24hs			48hs			72hs			96hs		
	Peso	Água	Ração	Peso	Água	Ração	Peso	Água	Ração	Peso	Água	Ração
S+S x LPS+S	ns	Ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns
S+S x LPS+Zn	ns	↑ *	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns
LPS+S x LPS+Zn	ns	↑ *	Ns	ns	↑ *	ns	ns	ns	Ns	ns	↑ *	ns

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

Nota: ns = não significante, * ↑ = aumento no consumo de água/ração ou ganho de peso corporal, * ↓ = diminuição no consumo água/ração ou diminuição no ganho de peso corporal

Figura 18 - Médias com os respectivos desvios – padrão da temperatura de ratas gestantes tratadas com LPS e zinco

Parâmetros	Horas	DOM+S+S	DOM+LPS+S	LPS+Zn
Temperatura	0	36,73±0,03	36,45±0,12	36,42±0,104
	2	36,7±0,01	36,91±0,56	36,37±0,104
	4	36,56±0,202	38,05±0,52	36,77±0,089
	6	36,56±0,202	37,72±0,52	36,4±0,113
	8	36,53±0,17	38,02±0,65	36,5±0,125
	10	36,433±0,23	37,42±0,404	36,828±0,269
	24	36,43±0,23	36,357±0,108	37,32±0,099
	48	36,43±0,26	36,58±0,122	38,42±0,158
	72	36,83±0,03	36,51±0,129	38,54±0,086
	96	36,266±0,033	36,45±0,129	37±0,1976
Peso	24	1,46±0,569	1,33±0,13	2,6±0,224
	48	1,73±0,48	1,6±0,3	1,428±0,347
	72	1,2±1,00	2,33±0,24	2,14±0,39
	96	2,8±1,12	2±0,23	3,285±0,107
Água	24	56,66±3,33	60±5,77	67,14±4,862
	48	31,66±1,667	26,66±8,81	45±5,87
	72	43,33±1,667	43,33±3,33	43,57±2,82
	96	45±2,887	36,66±3,33	47,85±5,44
Ração	24	17,93±4,212	14±1,908	19,42±4,32
	48	20,133±0,995	13,46±2,313	20,685±3,36
	72	21,533±0,63	21,66±6,42	35±9,448
	96	13,8±1,22	14,6±4,42	20,08±4,95

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

Figura 19 - Temperatura e peso corporal, bem como o consumo de água e ração de ratas gestantes que receberam GD 9,5 100 $\mu\text{g/kg}$ de LPS ou solução salina por via i.p., e 2mg/kg de zinco por via s.c., observadas 2 horas após o tratamento e por mais 96 horas. * $P < 0.05$. Anova de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni*

NASCIMENTO, A. N., 2015).

6.4 EXPERIMENTO 4

Avaliação da temperatura e peso corporal, bem como do consumo de água e ração de ratas lactantes tratadas no 3.^o dia de lactação com LPS e zinco.

6.4.1 Resultados

As figuras - 20 e 21 ilustram as médias e os respectivos erros padrões, e as diferenças existentes entre os grupos, e a figura – 22 ilustra a temperatura e peso corporal, bem como o consumo de água e ração de ratas tratadas no 3.^o dia de lactação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p., e 2mg/kg de zinco por via s.c., observadas por 96 horas.

Temperatura: A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferença com relação ao tratamento ([F3/240 = 923,08], $P < 0.0001$) e entre os dias observados ([F8/240=77,59], $P < 0.0001$). Havendo interação entre os fatores ([F27/240=185,25], $P < 0.0001$). O teste *Bonferroni* mostrou que às 2 e 4 horas, a temperatura das ratas LPS+Zn foi maior comparadas aos demais grupos. As 4 horas as temperaturas dos grupos LPS+S e LPS+Zn foram maiores comparada as ratas do grupo S+S, as 6, 10, 24 e 48 horas a temperatura dos grupos LPS+S e LPS+Zn foram significativamente maiores em relação aos demais grupos, porém a do grupo LPS+S às 2, 4, 24 e 72 horas foi menor e às 48 e 96 horas foi significativamente maior comparada ao grupo LPS+Zn.

Peso corporal: A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferenças com relação ao tratamento ([F3/96=14,26], $P < 0.0001$) e dias de observação ([F3/96=11,92], $P < 0.0001$) havendo interação entre os fatores ([F3/96=10,92], $P < 0.0001$). O teste de *Bonferroni* mostrou que as 24 e 48 horas os grupos LPS+S e LPS+Zn não tiveram ganho significativo de peso em relação ao grupo S+S.

Consumo de água: A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferenças com relação ao tratamento ([F3/96=46,58], $P < 0.0001$) e dias de observação ([F3/96=171,76], $P < 0.0001$) havendo interação entre os fatores ([F3/96=38,12], $P < 0.0001$). O teste de *Bonferroni* mostrou que 48 horas o consumo de água do

grupo LPS+S e LPS+Zn foi maior comparada aos demais grupos, e as 72 horas o consumo de água do grupo LPS+S foi maior em relação ao grupo S+S.

Consumo de ração: A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferenças com relação ao tratamento ($[F_{3/96}=14,27]$, $P<0.0001$) e dias de observação ($[F_{3/96}=226,30]$, $P<0.0001$) havendo interação entre os fatores ($[F_{3/96}=59,80]$, $P<0.0001$). O teste de *Bonferroni* mostrou que as 24 e 48 horas, o consumo de ração dos grupos LPS+S e LPS+Zn foi menor comparados aos demais grupos, as 72 e 96 horas o consumo de ração dos grupos LPS+S e LPS+Zn foi maior comparados aos demais grupos.

Figura 20 - Comparação entre os grupos em relação à temperatura de ratas lactantes tratadas com LPS e zinco. Pós teste *Bonferroni* de comparações múltiplas

Grupos/Temperatura	0hs	2hs	4hs	6hs	8hs	10hs	24hs	48hs	72hs	96hs
S+S x LPS+S	ns	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *
S+S x LPS+Zn	ns	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	Ns
LPS+S x LPS+Zn	ns	↑ *	↑ *	ns	ns	ns	↑ *	↑ *	↑ *	Ns

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

Nota: ns = não significante, * ↑ = aumento de temperatura, * ↓ = queda de temperatura.

Figura 21 - Comparação entre os grupos em relação ao ganho ou perda de peso, consumos de água e de ração de ratas lactantes tratadas com LPS e zinco. Pós teste *Bonferroni* de comparações múltiplas

	24hs			48hs			72hs			96hs		
	Peso	Água	Ração	Peso	Água	Ração	Peso	Água	Ração	Peso	Água	Ração
S+S x LPS+S	↓ *	ns	↓ *	↓ *	↑ *	ns	ns	↑ *	↑ *	ns	ns	↑ *
S+S x LPS+Zn	↓ *	ns	↓ *	↓ *	↑ *	↓ *	ns	ns	↑ *	↓ *	ns	↑ *
LPS+S x LPS+Zn	ns	ns	ns	↑ *	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

Nota: ns = não significante, * ↑ = aumento no consumo de água/ração ou ganho de peso corporal, * ↓ = diminuição no consumo água/ração ou diminuição no ganho de peso corporal

Figura 22 - Médias com os respectivos desvios – padrão da temperatura e peso corporal, bem como do consumo de água e ração de ratas lactantes tratadas com LPS e zinco

Parâmetros	Horas	S+S	LPS+S	LPS+Zn
Temperatura	0	36,17±0,03	36,17±0,03	36,16±0,03
	2	36,17±0,03	36,31±0,02	36,5±0,08
	4	36,17±0,03	36,46±0,04	36,6±0,08
	6	36,19±0,02	36,91±0,04	36,87±0,06
	8	36,2±0,03	37,01±0,04	37,1±0,02
	10	36,14±0,02	37,14±0,03	37,1±0,03
	24	36,2±0,02	37,39±0,02	37,63±0,05
	48	36,14±0,02	37,6±0,02	37,2±0,03
	72	36,13±0,02	36,39±0,02	36,54±0,03
	96	36,17±0,04	36,31±0,03	36,19±0,02
Peso	24	21,71±1,77	3,71±0,36	4,43±0,92
	48	18,5±1,46	-4,14±0,63	3,57±0,53
	72	19,43±1,13	19,43±2,4	22,29±4,17
	96	24,86±1,01	18,29±1,38	13,86±1,26
Água	24	81±3,93	74,57±2,25	76±4,08
	48	99,43±4,3	199,1±6,97	197,9±7,35
	72	95,43±1,77	117,9±4,63	114,6±5,72
	96	99,57±5,17	86,57±2,83	86,43±3,09
Ração	24	56,16±1,14	17,67±2,4	16,71±2,21
	48	48,04±3,65	32,84±3,56	29,81±2,87
	72	60,71±5,81	117,3±3,76	130,3±4,35
	96	66,3±6,23	105±2,55	93,77±3,17

Fonte: (NASCIMENTO, A.N., 2015).

Figura 23 - Temperatura de ratas lactantes que receberam no 3.º dia de lactação 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p., e 2 mg/kg de zinco por via s.c., observadas 2 horas após o tratamento e por mais 96 horas. * $P < 0.05$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni

Fonte: (NASCIMENTO, A.N., 2015).

6.5 EXPERIMENTO 5

Influência da administração de LPS e zinco em ratas virgens na atividade geral em campo aberto, tratadas no estro e observadas 2 horas após o tratamento.

6.5.1 Resultado

A figura - 24 ilustra as frequências de locomoção, levantar e tempo de parada de ratas virgens que receberam no estro 100 µg/kg de LPS por via i.p., ou solução salina e 2 mg/kg de zinco por via s.c., e foram observadas 2 horas após o tratamento com a endotoxina.

Locomoção: A ANOVA de uma via indicou que houve diferenças significantes na frequência de locomoção entre os grupos ($[F_{2/18}=31,71]$, $p<0.0001$). O teste de *Tukey* indicou que os animais do grupo LPS+S se locomoveram menos em relação aos demais grupos, e o grupo LPS+Zn se locomoveu mais em relação ao grupo LPS+S e menos em relação ao grupo S+S.

Levantar: A ANOVA de uma via indicou que houve diferenças significantes na frequência de levantar entre os grupos ($[F_{2/18}=5,765]$, $p=0.0116$). O teste de *Tukey* indicou que os animais dos grupos LPS+S se levantou mais em relação aos grupos S+S e LPS+Zn e o grupo LPS+Zn se levantou menos em relação ao grupo Zn e LPS+Zn.

Tempo de parada: A ANOVA de uma via indicou que houve a existência de diferenças na duração do tempo de parada entre os grupos ($[F_{2/18}=1,727]$, $p=0.2060$). O teste de *Tukey* não indicou diferenças entre os grupos.

Figura 24 - Frequências de locomoção, levantar e tempo de parada de ratas virgens que receberam no estro 100 µg /kg de LPS por via i.p., e 2 mg/kg de zinco por via s.c., e foram observadas 2 horas após o tratamento com a endotoxina. *P<0.05. ANOVA de uma via seguida pelo teste de *Tukey*

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

6.6 EXPERIMENTO 6

Influência da administração de LPS e zinco em ratas gestantes na atividade geral em campo aberto, tratadas no GD 9,5 e observadas 2 horas após o tratamento.

6.6.1 Resultado

A figura - 25 ilustra as frequências de locomoção, levantar, tempo de parada e número de bolos fecais de ratas que receberam no GD 9,5 100 µg/kg de LPS por via i.p., e 2 mg/kg de zinco por via s.c., e foram observadas 2 horas após o tratamento com a endotoxina.

Locomoção: A ANOVA de uma via indicou que houve diferenças significantes na frequência de locomoção entre os grupos ($[F_{2/18}=6,346]$, $p=0.0082$). O teste de *Tukey* indicou que os animais dos grupos LPS+S se locomoveram mais em relação aos S+S.

Levantar: A ANOVA de uma via indicou que houve diferenças significantes na frequência de levantar entre os grupos ($[F_{2/18}=2,888]$, $p=0.0817$). O teste de *Tukey* não indicou diferenças significantes entre os grupos.

Tempo de parada: A ANOVA de uma via indicou que houve a existência de diferenças na duração do tempo de parada entre os grupos ($[F_{2/18}=2,541]$, $p=0.1067$). O teste de *Tukey* não indicou diferenças significantes entre os grupos.

Figura 25 - Frequências de locomoção, levantar e tempo de parada de ratas que receberam no GD 9,5 100 µg/kg de LPS por via i.p., e 2mg/kg de zinco por via s.c., e foram observadas 2 horas após o tratamento com a endotoxina. *P<0.05. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey

6.7 EXPERIMENTO 7

Influência da administração de LPS e zinco em ratas lactantes na atividade geral em campo aberto, tratadas no 3.^o dia de lactação e observadas no 5.^o dia de lactação.

6.7.1 Resultado

A Figura - 26 ilustra a frequência de locomoção, levantar e tempo de parada de ratas lactantes tratadas no 3.^o dia de lactação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p., e 2mg/kg de zinco por via s.c., observadas no 5.^o dia de lactação.

Locomoção: A ANOVA de uma via indicou que não houve diferenças significantes na frequência de locomoção entre os grupos ($[F_{2/8}=3,352]$, $P=0.0579$). O teste de *Tukey* não indicou diferenças entre os grupos.

Levantar: A ANOVA de uma via indicou que houve diferenças significantes na frequência de levantar entre os grupos ($[F_{2/18}=2,817]$, $P=0.0862$). O teste de *Tukey* não indicou diferenças entre os grupos.

Tempo de parada: A ANOVA de uma via indicou a existência de diferenças na duração do tempo de parada entre os grupos ($[F_{2/18}=11,19]$, $P=0.0007$). O teste de *Tukey* indicou que os animais tratados com zinco (LPS+Zn) ficaram maior tempo imóveis que aqueles dos grupos S+S e LPS+S.

Figura 26 - Frequências de locomoção, levantar e tempo de ratas receberam no 3.^o dia de lactação 100 µg/kg de LPS ou solução Salina por via i.p e 2 mg/kg de Zinco por via s.c, observadas no 5.^o dia de lactação. *P<0.05. Anova de uma via seguida pelo teste de Tukey

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

6.8 EXPERIMENTO 8

- Influência da administração de LPS e zinco no CM de ratas lactantes tratadas no 3.^o dia de lactação e observadas no 5.^o dia de lactação.

6.8.1 Resultados

A figura - 27 ilustra o CM de ratas lactantes tratadas no 3.^o dia de lactação com 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p., e 2 mg/kg de zinco por via s.c., e observadas no 5.^o dia de lactação.

Latência para contato com o 1.^o filhote: A ANOVA de uma via indicou a existência de diferenças na latência para busca do primeiro filhote entre os grupos ([F2/18=28,64], $p<0.0001$). O teste de *Tukey* indicou que os animais dos grupos LPS+S e LPS+Zn buscaram mais rapidamente o primeiro filhote comparados ao grupo S+S.

Latência para contato com todos os filhotes. A ANOVA de uma via indicou a existência de diferenças na latência para busca do primeiro filhote entre os grupos ([F2/18=3,729], $P=0.0442$). O teste de *Tukey* não indicou diferenças significantes em relação aos grupos.

Latência para carregar o primeiro filhote: A ANOVA de uma via indicou a existência de diferenças na latência para carregar o primeiro filhote entre os grupos ([F2/18]=13,22], $P=0.0003$). O teste de *Tukey* indicou que os animais dos grupos LPS+S e LPS+Zn buscaram mais rapidamente o primeiro filhote comparados ao grupo S+S.

Latência entre carregar o primeiro e o último filhote: A ANOVA de uma via indicou a existência de diferenças na latência carregar o primeiro e o oitavo filhote entre os grupos ([F2/18]=3730], $p<0.0001$). O teste de *Tukey* indicou que as fêmeas do grupo LPS+Zn demoraram mais entre carregar o primeiro e o último filhote que aquelas dos grupos S+S e LPS+Zn, e as fêmeas dos grupos LPS+S demoraram mais entre carregar o primeiro e o último filhote comparados ao grupo S+S.

Figura 27 - Latências para contato com o 1.^o filhote e o 8.^o filhote, para carregar o primeiro e entre carregar o primeiro e o último filhote, de ratas lactantes que receberam no 3.^o dia de lactação 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p., e 2 mg/kg de zinco por via s.c., observadas no 5.^o dia de lactação. *P<0.05. Anova de uma via seguida pelo teste de Tukey

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

6.9 EXPERIMENTO 9

Vocalização Ultrassônica no PND3 ao PND6 da prole de filhotes de mães tratadas com LPS e zinco no 3.^o dia de lactação.

6.9.1 Resultados

A figura 28 - ilustra o total de duração das vocalizações bem como o número de vocalizações de filhotes de ratas fêmeas lactantes tratadas com 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p., e 2 mg/kg de zinco por via s.c., e observados por 72 horas.

Total de duração das vocalizações: A Anova de 2 vias indicou a existência de diferenças com relação ao tratamento ([F2/64=75,51], $P<0.0001$) e entre os dias observados ([F3/64=33,53] $P<0.0001$). Havendo interação entre os fatores ([F6/64=56,50], $P<0.0001$). O teste *Bonferroni* mostrou que a duração da vocalização dos animais do grupo LPS+S foi maior as 2 horas, do grupo LPS+Zn foi menor as 48 horas comparados aos demais grupos.

Número de vocalizações: A Anova de 2 vias indicou a existência de diferenças com relação ao tratamento ([F2/64=9,615], $P=0.0002$) e dias de observação ([F3/64=29,82], $P<0.0001$) havendo interação entre os fatores ([F6/64=41,85], $P<0.0001$). O teste de *Bonferroni* mostrou que o grupo LPS+S vocalizou mais as 24, 48 e 72 horas em relação ao demais grupos. O grupo LPS+Zn vocalizou mais as 2, 24 e 72 horas e vocalizou menos as 48 horas em relação aos demais grupos.

Figura 28 - Número e o total de duração de vocalizações ultrassônicas de filhotes de ratas lactantes que receberam no 3.º dia de lactação 100 µg/kg de LPS ou solução salina por via i.p., e 2 mg/kg de zinco por via s.c., observados de 2 a 72 horas após o tratamento. *P<0.05. Anova de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni*

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

6.10 EXPERIMENTO 10

Avaliação da atividade geral em campo aberto no PND21 de filhotes machos de ratas tratadas no 3.^o dia de lactação LPS e zinco. Foram observados 2 horas após receberem um desafio com a endotoxina.

6.10.1 Resultado

A figura - 29 ilustra as frequências de locomoção, levantar e tempo de parada de filhotes machos de ratas que receberam no 3.^o dia de lactação 100 µg/kg de LPS por via i.p., e 2 mg/kg de zinco por via s.c. No PND21 os filhotes machos dessas fêmeas foram desafiados com 50 µg/kg de LPS por via i.p e foram observados 2 horas após o tratamento com a endotoxina.

Locomoção: A ANOVA de uma via indicou que houve diferenças significantes na frequência de locomoção entre os grupos ($[F_{3/24}=29,99]$, $p<0.0001$). O teste de *Tukey* indicou que os animais dos grupos S+S, LPS+S, e LPS+Zn se locomoveram menos do que aqueles do grupo Branco, e os animais do grupo LPS+S se locomoveram menos em relação ao grupo S+S.

Levantar: A ANOVA de uma via indicou que houve diferenças significantes na frequência de levantar entre os grupos ($[F_{3/24}=12,48]$, $p<0.0001$). O teste de *Tukey* indicou que os animais dos grupos S+S, LPS+S, LPS+Zn ficaram menos tempo imóveis que aqueles do grupo Branco.

Tempo de parada: A ANOVA de uma via indicou que não houve a existência de diferenças na duração do tempo de parada entre os grupos ($[F_{3/24}=0,6857]$, $p=0.5695$). O teste de *Tukey* não indicou diferenças entre os grupos.

Figura 29 - Frequências de locomoção, levantar e tempo de parada no PND21 de filhotes machos de ratas que receberam no 3.^o dia de lactação 100 µg /kg de LPS por via i.p., e 2 mg/kg de zinco por via s.c. Foram observados 2 horas após receberem um desafio com 50 µg/kg de LPS por via i.p. *P<0.05. ANOVA de uma via seguida pelo teste de *Tukey*

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

6.11 EXPERIMENTO 11

Burst e fagocitose de neutrófilos no PND21 da prole das ratas lactantes tratadas no 3.º dia de lactação com LPS ou solução salina e zinco e desafiadas com 50 µg/kg de LPS 2 horas antes das observações

6.11.1 Resultados

As figuras – 30, 31 e 32 ilustram o *burst* estimulado e obtido in vitro na presença de *Stafilococcus Áureus*, e PMA, a porcentagem, e a intensidade de presença de neutrófilos realizando a fagocitose de *S. aureus*, no PND21 da prole de filhotes de ratas tratadas com 100 µg/kg de LPS i.p ou solução salina a 0,9% no PND3.

DCTF: A ANOVA de uma via indicou a existência de diferenças no DCTF ([F3/16=55,54], $p<0.0001$). O teste de *Tukey* mostrou que houve diferenças significantes entre os grupos ilustradas na figura 31.

DCTF+Bactéria. A ANOVA de uma via indicou a existência de diferenças no *Burst* induzido pelo *S. aureus* ([F (3/16) = 51,71], $p<0.0001$). O teste de *Tukey* mostrou que houve diferenças significantes entre os grupos ilustradas na figura 31

% de Fagocitose: A ANOVA de uma via indicou a existência de diferenças na latência para carregar o primeiro filhote entre os grupos ([F3/16= 3,37], $P=0.0003$). O teste de *Tukey* mostrou que houve diferenças significantes entre os grupos ilustradas na figura 31.

Intensidade de fagocitose: A ANOVA de uma via indicou a existência de diferenças intensidade de fagocitose entre os grupos ([F3/16=7,158], $P=0.0029$). O teste de *Tukey* mostrou que houve diferenças significantes entre os grupos ilustradas na figura 31.

PMA: A ANOVA de uma via indicou a existência de diferenças no PMA entre os grupos ([F3/16=7,858], $P=0,0019$). O teste de *Tukey* mostrou que houve diferenças significantes entre os grupos ilustradas na figura 31.

Figura 30 - *Burst* e fagocitose de neutrófilos no PND21 da prole das ratas lactantes tratadas no LD3 com LPS ou solução salina e/ou zinco e desafiadas com 50 µg/kg de LPS duas horas antes das observações. São apresentadas as médias com os respectivos desvios – padrão

Grupos	DCTF	DCTF+Bactéria	% de Fagocitose	Intensidade de Fagocitose	PMA
Branco	5,90±0,611	3,42±0,6647	2,654±0,935	20,14±0,292	1,43±0,073
S+S	2,23±0,412	1,90±0,225	5,073±0,029	23,84±1,694	1,29±0,095
LPS+S	8,72±0,250	19,75±1,635	25,08±2,950	59,59±11,754	2,73±0,449
LPS+Zn	8,33±0,209	38,34±4,194	35,77±4,560	58,04±10,630	5,69±1,38

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

Figura 31 - *Burst* e fagocitose de neutrófilos no PND21 da prole das ratas lactantes tratadas no LD3 com LPS ou solução salina e/ou zinco e desafiadas com 50 µg/kg de LPS duas horas antes das observações. Pós teste *Tukey* de comparações múltiplas

Grupos	DCTF	DCTF+Bactéria	% de Fagocitose	Intensidade de Fagocitose	PMA
Branco X S+S	↑ *	ns	ns	ns	ns
Branco X LPS+S	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *
Branco X LPS+Zn	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	ns
S+S X LPS+S	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *
S+S X LPS+Zn	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	ns
LPS+S X LPS+Zn	ns	↑ *	ns	ns	↑ *

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

Nota: ns = não significante, ↑ * = aumento, ↓ * = diminuição.

Figura 32 - *Burst* e fagocitose de neutrófilos no PND21 da prole das ratas lactantes tratadas no LD3 com LPS ou solução salina e/ou zinco e desafiadas com 50 µg/kg de LPS duas horas antes das observações. * $P < 0.05$. ANOVA de uma via seguida pelo teste de *Tukey*

Fonte: (NASCIMENTO, A. N., 2015).

7 DISCUSSÃO

Estudo prévio sobre os efeitos do LPS na temperatura timpânica em fêmeas virgens evidenciou a existência de duas fases: uma de hipotermia 2 horas após a administração da endotoxina e outra de hipertermia com pico às 48 horas (NASCIMENTO et al., 2013). No presente trabalho, verificou-se que a administração do zinco em ratas virgens reverte a hipotermia observada na fase inicial da febre. No entanto, na segunda fase, ou seja, de hipertemia, observou-se redução da temperatura em relação aos grupos S+S e LPS+S.

A resposta termoregulatória ao LPS é muito mais complexa do que previamente mostrada. Dependendo da dose, temperatura ambiente e outros fatores, a injeção intravenosa de LPS causa diferentes respostas termoregulatórias (ROMANOVSKY; SIMONS; KULCHITSKY, 1998). Doses muito pequenas de LPS promovem efeito trifásico na temperatura em que se observam aumento da temperatura 1 hora após a injeção (fase I), hipotermia entre 2-2,5 horas (fase II) e a fase III com hipertermia observada 5-6 horas após a injeção (ROMANOVSKY, 2000). Romanovsky et al. (2005) comenta que em muitos experimentos conduzidos em temperatura ambiente apropriada para ratos ou envolvendo estresse agudo ou pela injeção de pirógenos, a fase I desaparece. Por outro lado, evidências indicam que na febre existem várias fases (ROMANOVSKY et al., 1998).

Embora seja reconhecida em clínica a ocorrência de hipotermia na inflamação, esta resposta é conhecida inicialmente como uma **falha** termorregulatória refletindo a inabilidade do sistema nervoso central em regular a temperatura corporal em estado de choque (CLEMMER et al., 1992). Liu et al. (2012) mostrou que, apesar do custo energético do animal, na inflamação sistêmica induzida por LPS ou por *E. coli*, a hipotermia é mais vantajosa que a febre uma vez reduz a disfunção orgânica e a taxa de mortalidade.

A hipotermia parece estar associada ao fator ativador de plaquetas (PAF), (IVANOV et al., 2003; IVANOV et al., 2005), pois antagonistas deste receptor atenuam a febre induzida pela administração intravenosa de LPS. Especula-se também que a PAF agiria nas células endoteliais expressando seus receptores para estimular a síntese de prostaglandinas (MARRACHE et al., 2002). Neste sentido, a PAF estaria envolvida não só na gênese da febre, mas também na resposta

hipotérmica ao LPS (HSUEH; GONZALEZ-CRUSSI; ARROYAVE, 1987; LIBERT et al., 1996;). Estudos mostram que o zinco exerce ação inibitória seletiva nos receptores da PAF ou em sítios contíguos (PAF1 e PAF2). Dessa forma é possível que a reversão da hipotermia induzida pelo LPS após tratamento com zinco seja resultado da ação inibitória do metal nos receptores da PAF.

Outro candidato envolvido com a hipotermia é um metabólito da PGD₂, o 15-deoxy-delta¹²⁻¹⁴ PGJ₂, cuja síntese varia com a progressão da inflamação e os níveis cerebrais desta enzima estão elevados na febre induzida pelo LPS (MOUIHATE; BOISSÉ; PITTMAN, 2004). Além disto, duas vias derivadas do metabolismo do ácido aracdônico, as vias da lipoxigenase e apoxigenase, têm atividade hipotermiante ou preventiva na febre (KOZAK; FRAIFELD, 2004).

Interessantemente a administração do zinco não só reverteu a hipertemia induzida pelo LPS, mas também reduziu a temperatura das ratas em relação aos animais tratados somente com o LPS. O mecanismo de hipertemia na febre estão ligados fundamentalmente a uma cascata de eventos que se inicia após a exposição a um patógeno e a produção de células imuno-competentes e a ativação de vários fatores de transcrição nas regiões hipotalâmicas que controlam a febre. O resultado final desta cascata é a formação da prostaglandina E₂ que se liga a seus receptores reduz a perda de calor e aumenta a sua retenção, resultando em aumento da temperatura corporal (SESSLER, 1997).

O zinco é um metal essencial para o crescimento, desenvolvimento e diferenciação em micro-organismos, plantas e animais (MCCALL; HUANG; FIERKE, 2000). As funções bioquímicas do zinco podem ser refletidas pelo seu envolvimento na atividade de mais de 300 enzimas (CHRISTIANSON, 1991; COLEMAN, 1992). Em muitos casos o íon zinco é um cofator para as funções destas metaloenzimas (MCCALL; HUANG; FIERKE, 2000). Dentre as principais funções do zinco, destacam-se a participação na síntese e degradação dos carboidratos, lipídeos e proteínas, na manutenção do crescimento e do desenvolvimento normais, no funcionamento adequado do sistema imunológico, na defesa antioxidante, na função neurosensorial e também, na transcrição e tradução de polinucleotídeos (SALGUEIRO et al., 2000).

O zinco afeta diretamente o sistema imune. Isso se deve a esse elemento estimular a atividade de enzimas envolvidas no processo de mitose, como a DNA polimerase e a RNA polimerase, timidina quinase, desoxiribonucleotídeo terminal

transferase e ornitina descarboxilase (SALGUEIRO et al. 2000b; DARDENNE, 2002; HAASE; RINK, 2014). É importante lembrar que as células do sistema imune têm altas taxas de proliferação. O zinco ainda, afeta o processo de fagocitose dos macrófagos e neutrófilos, interfere na lise celular mediada por células natural *killer* e ação citolítica das células T. A deficiência de zinco está relacionada com a atrofia do timo, assim como de outros órgãos linfoides e a linfocitopenia em animais e humanos. Evidências experimentais demonstram diminuição na razão CD4:CD8, durante a deficiência de zinco, além da diminuição de precursores de linfócitos-T citotóxicos. A modificação nas proporções de linfócitos pode contribuir para o desequilíbrio do sistema imunológico, afetando sua resposta e sua regulação (SALGUEIRO et al., 2000b; DARDENNE, 2002; HAASE; RINK, 2014).

As citocinas produzidas após a exposição ao LPS induzem metaloproteínas que sequestram o zinco induzindo hipozinquemia (BLATTEIS *et al.*, 1983). Neste sentido, inúmeros trabalhos relatam que a reposição de zinco é considerada como tratamento em processos febris, embora o zinco em excesso possa apresentar toxicidade (KURUGOL; BAYRAM; ATIK, 2007; RAHIM VAKILI et al., 2009; NAHAS; BALLA, 2011; SCIENCE et al., 2012; DAS; SINGH, 2014).

Neste trabalho, a reposição do zinco não só reduziu a fase de hipertemia induzida pelo LPS nas fêmeas virgens, mas também reduziu a temperatura corporal às 48 horas após a administração de LPS. A reversão do aumento da temperatura auricular seria esperada frente ao tratamento com zinco, uma vez que o zinco é empregado no tratamento da febre (KURUGOL; BAYRAM; ATIK, 2007; RAHIM VAKILI et al., 2009). No entanto, a ocorrência de hipotermia, nos animais tratados com LPS mais zinco, não era esperada. Dentre as várias hipóteses para explicar este resultado, temos que esse fenômeno seria consequência de toxicidade induzida pelo zinco ou que o zinco teria retardado a fase de hipotermia induzida pelo LPS. A respeito dos efeitos do zinco administrado isoladamente, observou-se que não foi revelada qualquer alteração na temperatura corporal de ratas virgens (dados não mostrados). Portanto a hipótese de que o zinco reduziria a temperatura corporal devido à toxicidade não parece ser plausível. Por outro lado, a hipótese do retardo na indução de hipotermia, somente seria passível de aceitação se tivéssemos observado a temperatura das ratas com maior frequência. Portanto, a hipotermia induzida por zinco às 48 horas após a administração do LPS permanece por ser investigada com mais detalhes.

O LPS é capaz de causar ainda modificações no comportamento dos animais promovendo quadros de anorexia, pirexia, anedonia, sonolência, redução da atividade locomotora/exploratória, redução do comportamento social e sexual, comportamento semelhante à depressão. Tais alterações comportamentais são características do chamado comportamento doentio, uma vez que se tratam de alterações adaptativas e/ou motivacionais características dos animais doentes (ALVES; PALERMO-NETO, 2007).

Neste sentido, foi observado o consumo de água e ração bem como o peso corporal das ratas virgens tratadas com LPS ou LPS+zinco durante 96 horas após a endotoxina.

O zinco parece ter promovido atenuação dos efeitos anorexígenos do LPS na fase de hipertermia, pois o ganho de peso do grupo LPS+Zn não diferiu do grupo S+S às 48 horas. Acrescente-se ainda, que às 96 horas o ganho de peso dos animais tratados com zinco foi significativamente maior que do grupo tratado somente com o LPS, evidenciando recuperação do peso destes animais. O consumo de ração foi ligeiramente menor às 72 horas. No entanto, apesar da atenuação da temperatura corporal tenha sido observada, o consumo de água dos animais foi significativamente maior nos animais tratados com zinco em relação àqueles tratados com LPS+Zn às 48 horas. Porém, verifica-se uma queda abrupta no consumo de água às 72 e 96 horas após o tratamento com zinco. Estes resultados provavelmente estão relacionados às alterações metabólicas ligadas à administração do LPS mesmo na presença do zinco.

Em estudo prévio comparando os efeitos na temperatura timpânica de ratas virgens e lactantes tratadas com LPS evidenciou-se que as respostas temporais e o perfil da febre foram diferentes na dependência do estado fisiológico das ratas. Nas fêmeas lactantes observou-se atenuação da temperatura quando comparada a daquelas virgens. Foi proposto que a presença de altos níveis de prolactina nas ratas lactantes estaria associada a esta atenuação uma vez que a prolactina tem efeitos supressivos na inflamação (SUGIURA et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2013; OCHOA-AMAYA et al., 2015). Para investigar essa hipótese, neste trabalho, ratas virgens foram tratadas com domperidona por 5 dias, um esquema de tratamento que promove hiperprolactinemia (NASELLO et al., 1997; OCHOA-AMAYA et al., 2010, 2011). Os resultados mostraram que a hiperprolactinemia reverteu tanto a hipotermia como a hipertemia induzida pelo LPS. O consumo de

ração dos animais tratados com LPS+Zn não foi diferente em relação aos demais grupos. No entanto, observou-se que o ganho de peso mostrou-se reduzido e o consumo de água de água mais alto que dos grupo LPS+S e S+S. Desta forma, embora o aumento da prolactina tenha levado a temperatura auricular à normalização, outros parâmetros como o peso corporal e consumo de água que fazem parte do comportamento doentio permaneceram presentes, embora atenuados.

Com relação a estas aparentes divergências, é importante lembrar que a exposição ao LPS e ativação do TLR4 causa várias outras respostas que são importantes na defesa contra o agressor. Estas respostas incluem a ativação do eixo HPA, aumento da sensibilidade dos aferentes sensoriais levando a hiperalgesia, anorexia e diversas manifestações comportamentais que reduzem a interação social (HART, 1988; DANTZER, 2001).

Embora os efeitos da administração do LPS parecem envolver as mesmas citocinas periféricas como a resposta febril, existem evidências de que as vias centrais que os modulam são diferentes. Por exemplo, a IL-1b central é necessária para os efeitos comportamentais de citocinas periféricas ocorram, mas não para os seus efeitos termogênicos ou anoréxicos. Por outro lado, a central de IL-6 pode provocar a ativação do hipotálamo e febre, mas não comportamento doentio (LENCZOWSKI et al., 1999).

A gestação é uma fase especial do ponto de vista imunológico. Nesse período, o organismo desenvolve um estado de tolerância para que o embrião seja reconhecido como próprio pelo sistema imunológico da mãe. Esse ajuste é importante para a implantação e manutenção do conceito até o momento do nascimento. Desta forma, alterações imunes durante o período gestacional são críticas na determinação da sobrevivência ou não do conceito (MOUIHATE et al., 2008).

Na gestação, quando uma mãe desenvolve febre, o seu feto também a desenvolve (HARRIS, 1977). A temperatura fetal é naturalmente maior que a materna e a hipertermia secundária à da mãe é maior ainda que da febre materna. Existem dados, embora controversos, que a febre materna no início da gestação leva à teratogênese na prole de humanos (CHAMBERS et al., 1998) possivelmente causada pelo conhecido efeito teratogênico do aumento da temperatura (EDWARDS, 2006). Além disto, a febre no parto promove hipóxia e isquemia fetal.

Neste sentido, foi observada em carneiros atenuação febril no parto em resposta a LPS (KASTING; VEALE; COOPER, 1978). A observação de atenuação da febre no parto e lactação foi confirmada em ratos (MARTIN et al., 1995), cobaias (ZEISBERGER; MERKER; BLAHSER, 1981) e humanos (AOYAMA; SEAWARD; LAPINSKY, 2014). Essa atenuação está associada com a redução das respostas imunes e a estressores psicológicos no sistema nervoso central (TOUFEXIS et al., 1998; PETRAGLIA; DOUGLAS et al., 2003; IMPERATORE; CHALLIS, 2010). Observou-se que no hipotálamo de ratas prenhes tratadas com LPS ocorre redução significativa na expressão da proteína da COX-2 sugerindo que a atenuação da febre estaria associada à redução da PGE2 (MOUIHATE et al., 2002).

Os presentes dados mostram que, nas ratas prenhes, a administração do LPS não promoveu a fase de hipotermia e a duração da hipertermia foi reduzida às primeiras 10 horas após a endotoxina. Outro dado interessante foi que o tratamento com zinco retardou a ocorrência da hipertermia. De fato, após a exposição ao zinco, verifica-se que a hipertermia iniciou às 24 horas e perdurou por até 96 horas após a administração do LPS.

O tratamento prenatal com LPS no 9,5 dia da gestação reduz os níveis de zinco e outros metais levando à hipozinquemia na mãe. O estudo das proles destas mães mostrou que os mesmos apresentavam alterações comportamentais compatíveis com aquelas descritas para o autismo, sugerindo que este poderia ser um modelo animal de autismo (KIRSTEN et al., 2010; KIRSTEN et al., 2011; KIRSTEN et al., 2012;). O tratamento com zinco uma hora após a administração da endotoxina preveniu estas alterações (KIRSTEN et al., 2015a). Além disto, o tratamento com zinco também preveniu a manifestação do comportamento doentio induzido pelo LPS em ratas submetidas ao estresse (KIRSTEN et al., 2015c).

O zinco é utilizado como tratamento da febre. A febre é uma das manifestações do comportamento doentio e pode produzir efeitos teratogênicos. Assim, neste estudo investigou-se se a administração do zinco interfere com o desenvolvimento temporal da hipo/hipertermia produzida pelo LPS. Para a injeção do LPS, foi escolhido o dia 9,5 da gestação a partir dos estudos de Kirsten et al (KIRSTEN et al., 2010; KIRSTEN et al., 2011) mostrando que a endotoxina prenatal administrada neste dia promove comportamento autista-*simile* na prole de ratas. Também, a escolha da dose e do esquema de administração do zinco foram

baseados nos achados desses mesmos autores mostrando redução dos efeitos do LPS prenatal na prole de ratas (KIRSTEN et al., 2015b).

O retardo na ocorrência de hipertermia nas ratas prenhes associado à ausência tanto de perda de peso e de redução no consumo de ração, sugere que o tratamento com o metal reduz o comportamento doentio induzido pelo LPS. Este dado reforça a possibilidade de que também nas ratas virgens, a administração do zinco tenha alterado o curso do tempo de expressão da febre. Além disso, o retardo na hipertermia poderia explicar os resultados obtidos por Kirsten et al. (2015), o qual observou a reversão dos efeitos do LPS prenatal após o tratamento com zinco. De fato, durante o desenvolvimento prenatal existem períodos críticos, em que devido à alta proliferação celular, o organismo é mais sensível a teratógenos ou alterações ambientais. Se isto for verdade, o tratamento com o zinco pode ter deslocado os efeitos do LPS em período posterior ao daquele ligado ao autismo resultando na ausência de comportamento tipo autista da prole das ratas. Por outro lado, não se pode afirmar que esse retardo na aliciação da hipertermia não tenha promovido outras alterações ainda não reveladas neste estudo.

Estudo prévio de nosso grupo mostrou que o aumento da temperatura auricular em ratas lactantes, após administração de LPS, foi atenuado quando comparado àquele observado em ratas virgens. Estes dados sugeriram que a temperatura varia com o estado fisiológico das ratas (NASCIMENTO et al., 2013). De modo similar, tanto o consumo de ração como o peso corporal foram reduzidos pelo LPS tanto em virgens como em lactantes. Ainda assim, as ratas lactantes consumiram mais ração e água que as virgens.

A administração de zinco em ratas lactantes tratadas com LPS promoveu aumento inicial da temperatura auricular nas primeiras 4 horas e adiantou o pico da hipertermia de 48 para 24 horas. Além disso, a administração de zinco em ratas lactantes tratadas com LPS, fez com que a temperatura se mantivesse alta até 72 horas após isso ter sido observado naquelas tratadas apenas com o LPS.

Embora o consumo de ração não tenha sido diferente entre os dois grupos, a perda de peso das fêmeas tratadas com zinco foi menor do que daquelas não tratadas. Nota-se também que os dois grupos apresentam perda de peso às 48 horas e a recuperam às 72 horas. A curva de consumo de ração apresenta o mesmo perfil, ou seja, ocorre menor consumo de ração às 24 e 48 horas e aumento do mesmo às 72. Assim, no que se refere à perda de peso induzida pelo LPS, o

zinco atenuou o efeito do lipopolissacarídeo. Tal como nos experimentos anteriores, nos quais os animais foram investigados em outras condições fisiológicas, o zinco revelou-se capaz de modular o resultado da ação do LPS. O efeito modulatório do zinco sobre a ação do LPS parece ter um caráter bifásico ou transitório.

O consumo de água foi também similar entre nos dois grupos tratados com LPS. De fato, observa-se um pico no consumo de água às 48 horas após o LPS embora o pico da febre dos animais tratados com zinco seja anterior (24 horas) que a dos não tratados com esse metal. No entanto, como os níveis de temperatura do grupo tratado com LPS+Zn permanecem altos também às 48 horas, é possível que este maior consumo de água seja consequência do aumento da temperatura.

Estes resultados indicam que o tratamento com o zinco promove aumento da temperatura de ratas lactantes, embora com relação às ratas virgens ela tenha sido atenuada corroborando com dados previamente observados (NASCIMENTO et al., 2013b). Verificou-se neste trabalho que a indução de hiperprolactinemia por administração repetida de domperidona reverte todas as fases da febre avaliada pela temperatura auricular sugerindo que a prolactina seja o principal fator que modula a temperatura em ratas lactantes.

Por outro lado, o zinco inibe seletivamente e reversivelmente a secreção de prolactina (JUDD; MACLEOD; LOGIN, 1984) sugerindo que este metal tenha papel nos mecanismos fisiológicos de controle neuroendócrino desse hormônio.

Neste sentido, ratas com dieta deficiente de zinco têm aumento nos níveis de prolactina e ocorre alteração na expressão dos genes regulatórios hipofisários (CATICHA et al., 1996; CHOWANADISAI; KELLEHER; LÖNNERDAL, 2004), levando à hiperprolactinemia, a qual tem efeitos negativos no desenvolvimento fetal (CHOWANADISAI; KELLEHER; LÖNNERDAL, 2004). Estudos futuros serão necessários para investigar outros fatores envolvidos com o estado fisiológico e os efeitos do LPS na temperatura auricular de ratas. Os resultados distintos observados em fêmeas lactantes em relação às virgens hiperprolactinêmicas, sugerem que a prolactina não seja o único fator a modular a resposta ao LPS durante a lactação.

O campo aberto introduzido por Hall (1934), foi inicialmente usado para avaliar emocionalidade. Hall define em seu trabalho, o termo emocionalidade como um estado emocional formado por um grupo de reações orgânicas e expressivas,

que denotem uma condição de excitação no animal. Walsh e Cummins (1976) reformularam o conceito passando a defini-lo como “uma entidade com componentes afetivos não específicos do comportamento”. Em seus experimentos, Hall mostrou que quando ratos eram expostos a um ambiente estranho, a defecação e o ato de urinar seriam índices de um estado emocional. Um roedor, submetido a um estímulo agressor, representado por uma arena aberta, tenderia a “congelar” defecar e urinar. Em 1936, esse autor mostrou existir correlação inversa entre aumento de emocionalidade, expresso pelo aumento da defecação, com redução na atividade motora, medida pela velocidade na atividade locomotora (medida pela distância atravessada pela unidade de tempo). Assim, os ratos que mais se locomoviam, defecavam menos. Portanto, o teste de campo aberto passou a ser considerado como um bom modelo animal de ansiedade por sua sensibilidade bidirecional a tratamentos farmacológicos, podendo avaliar o comportamento semelhante à ansiedade em várias espécies, incluindo animais transgênicos e camundongos Knockout (CAROLA et al., 2002). As condições iniciais de observações incluíam luz forte e um som de 80 decibéis, portanto altos níveis de estimulação. Hall et al. (1936) reduziram este grau de estímulo em seus experimentos e, também atribuíram a este teste condições experimentais que permitiram medir a atividade motora de ratos.

Neste trabalho a avaliação da atividade geral em campo aberto de fêmeas, virgens, gestantes e lactantes mostrou que as fêmeas que receberam o 100 µg/kg de LPS por via i.p., se locomovem menos. Segundo Hart (1988) diversas espécies animais acometidos por processos patológicos apresentam sinais comuns em resposta à doença tais como febre, letargia ou prostração, perda de apetite e diminuição do consumo de água, diminuição de locomoção, esta última relacionada principalmente à exploração ambiental. Hart denominou ao conjunto destas reações de comportamento doentio. Neste sentido, estes resultados poderiam ser atribuídos ao desenvolvimento do comportamento doentio promovido pela exposição ao LPS. Por outro lado, quando comparadas fêmeas que além de terem recebido 100 µg/kg de LPS por via i.p. receberam também 2 mg/kg de zinco por via s.c., com as fêmeas que receberam apenas 100 µg/kg de LPS por via i.p., observamos que as fêmeas virgens e gestantes se locomoveram mais, e as lactantes permaneceram mais tempo imóveis. Neste sentido, o zinco nas fêmeas virgens e gestantes pode ter atenuado o comportamento doentio causado pelo LPS. O zinco tem um papel

importante no processo inflamatório (SAGGAR et al., 1991), porém nas lactantes o zinco pode ter intensificado o comportamento doentio, já que o zinco também pode causar letargia (BARCELOUX, 1999). Com esses resultados é possível sugerir que o estado gestacional e lactacional modulem a atividade geral de forma diferencial.

O monitoramento do comportamento materno foi realizado. Para tal foram considerados aspectos proativos desse comportamento, tais como, as latências para o contato e carregar o primeiro e último filhote.

Neste sentido, o repertório comportamental dos mamíferos durante a maternidade difere daquele exibido por fêmeas em outros períodos de seu ciclo reprodutivo (FERREIRA et al., 2002). No final da gravidez e durante os primeiros dias da lactação, a fêmea passa por importantes mudanças hormonais e comportamentais que induzem e permitem a nutrição e cuidado da prole (NUMAN, 1994; FREY et al., 2002). O comportamento maternal inclui ações que as fêmeas executam para garantir o sucesso no desenvolvimento de seus filhotes (BRIDGES, 2015). Estas ações incluem construção de ninho, recolhimento dos filhotes quando estes se afastam do ninho, estimulação à micção através da lambida anogenital, agrupamento dos filhotes no ninho e posicionamento sobre eles para provê-los de nutrição e calor (STERN, 1990; ALBERT; WALSH, 1995).

Os resultados do experimento 8 mostram que fêmeas que foram expostas no terceiro dia de lactação ao LPS, tiveram contato e carregaram rapidamente o primeiro filhote. Por outro lado, essas fêmeas, tratadas com LPS, demoraram para carregar todos os filhotes em comparação com as fêmeas que receberam apenas o veículo da endotoxina. Já as fêmeas que no terceiro dia de lactação além de terem recebido LPS, receberam também zinco, levaram mais tempo para carregar todos os filhotes quando comparadas as fêmeas que receberam apenas LPS. Vimos no experimento 13 que essas mesmas fêmeas apresentaram febre e redução na atividade geral.

Na febre, algumas citocinas agem no centro regulador do hipotálamo elevando o limiar térmico desencadeando respostas ligadas à conservação de energia (VOLTARELLI, 1994). Desta forma, o animal teria sensação de que o ambiente estaria frio. Por outro lado, roedores neonatos não controlam a temperatura corporal, a qual é mantida pela própria mãe em seu cuidado maternal. Tanto a busca do filhote como o cuidado no ninho dos mesmos estão envolvidos com a termorregulação dos filhotes. A busca do filhote é um comportamento crítico

na sobrevivência da prole. Em ambientes frios, a prioridade é manter a temperatura da prole. Este fato é inerente ao comportamento maternal (ALBERT; WALSH, 1995); incluindo o recolher dos filhotes. Além disso, sabe-se que a dopamina está envolvida tanto com a fase inicial como com a fase de manutenção do comportamento maternal (HANSEN et al., 1991; STERN, 1991; STERN; TAYLOR, 1991; SILVA et al., 2001, 2003). Possivelmente, este efeito se relacione com o estado motivacional e fisiológico materno. Esta observação corrobora com o fato da dopamina influenciar motivações via sistema mesolímbico, principalmente no núcleo acumbens (ROBBINS; EVERITT, 1996).

Já o fato de terem demorado mais para carregar todos os filhotes, corrobora com os resultados observado na atividade geral em campo aberto no experimento 7, onde fêmeas lactantes que receberam zinco e/ou LPS, permaneceram mais tempo imóveis. Sugerindo que a administração de LPS e o tratamento com zinco interferiram no comportamento maternal dessas fêmeas.

As alterações no comportamento maternal também podem ter sido causadas, além do acima comentado, por alterações na interação mãe-filhote, pois o estímulo sensorial representado pelo filhote é crítico para que o comportamento maternal ocorra (HUOT et al., 2002). Baseando nessa hipótese, os demais experimentos foram então realizados com a prole das fêmeas lactantes que receberam LPS e/ou zinco no terceiro dia de lactação. Assim, investigou-se se a administração de LPS e zinco em ratas lactantes promoveria alterações na vocalização de seus filhotes. Desta forma, analisou-se a vocalização ultrassônica dos mesmos. Adicionalmente, no vigésimo dia pós-natal esses filhotes receberam um desafio com 50 µg/Kg de LPS duas horas antes da observação de sua atividade geral em campo aberto, e do *burst* e fagocitose.

O quinto dia foi escolhido para avaliação, baseando-se nas observações dos experimentos 4, 7 e 8 nos quais as mães apresentaram febre, diminuição na atividade geral e menor latência para contato e carregar o primeiro filhote. O vigésimo primeiro dia foi escolhido para a observação das respostas ao desafio pelo LPS por corresponder ao dia do desmame desses filhotes, momento este em que o animal apresenta uma mudança na contingência ambiental.

Os resultados do experimento 9, mostraram que a administração de LPS ou zinco em ratas lactantes no terceiro dia de lactação, promoveu alterações no padrão de vocalização de seus filhotes.

Já nos experimentos 10 e 11, ou seja, nos testes em que os filhotes foram desafiados com LPS, verificou-se aumento no *burst* e fagocitose de neutrófilos, e diminuição na atividade geral observada em campo.

Filhotes de ratos isolados de sua mãe e irmãos emitem vocalizações ultrassônicas de 20-60 kHz que duram 0.1-3.5s (HOFER; SHAIR, 1978; MICZEK et al., 1995; HOFER, 1996). Estes sinais desempenham um papel importante na interação comunicativa mãe-prole, porque eles provocam uma resposta rápida da mãe que se manifesta por meio dos cuidados com a prole. A vocalização dos filhotes se desenvolve gradualmente alguns dias após o nascimento, sendo mantida em níveis elevados até abertura dos olhos no dia 14 pós-natal (INSEL; HILL; MAYOR, 1986). Subsequentemente, a vocalização ultrassônica desaparece por volta do dia 18 (ALLIN; BANKS, 1971). Essas vocalizações servem para evocar a busca e recuperação do filhote por sua mãe (ALLIN; BANKS, 1972; SMOTHERMAN et al., 1974) e estimulam a liberação de prolactina na mãe (TERKEL; MOORE; BEER, 1976). Os filhotes nesta idade são cegos, surdos, não têm pêlo, são poiquilotérmicos e dependem da mãe para os processos de excreção (BROUETTE-LAHLOU; VERNET-MAURY; VIGOUROUX, 1992), não sendo capazes de sobreviver se deixados sozinhos fora do ninho. As vocalizações ultrassônicas têm, portanto, função vital de comunicação entre a mãe e sua prole. Além da simples separação, a vocalização é reforçada pelo estresse, como por exemplo, a exposição a baixas temperaturas (ALLIN; BANKS, 1971; OKON; WALCZAK, 1972), a estimulação tátil (NOIROT, 1972; OSWALT; MEIER, 1975), ou alguns estímulos olfativos (OSWALT; MEIER, 1975). Estímulos provenientes da mãe e/ou ninhada têm um efeito tranquilizador (HOFER; SHAIR, 1980). Estes dados levantaram a hipótese de que nesta situação, as vocalizações de filhotes refletiriam um estado de angústia (INSEL; HILL; MAYOR, 1986; MICZEK et al., 1995). No entanto, a interpretação da vocalização ultrassônica do filhote em direção a mãe é ainda bastante discutida na literatura. Ela é considerada como a expressão de um estado de ansiedade porque é revertida pela administração de drogas ansiolíticas (GARDNER, 1985; BRANCHI; SANTUCCI; ALLEVA, 2001). Existem outras conotações sobre o significado das vocalizações ultrassônicas de filhotes de ratos apontam para efeitos na manutenção da homeostasia cardiopulmonar (BLUMBERG; SOKOLOFF, 2001)

No período de lactação os filhotes estão em maturação funcional, sendo que o cuidado materno é importantíssimo, e uma das formas de cuidado oferecido pela mãe é o aleitamento. O leite materno além da composição adequada de nutrientes possui outros componentes que atuam na defesa do organismo do lactente, como imunoglobulinas, fatores anti-inflamatórios e imunoestimuladores (LAMOUNIER; VIEIRA; GOUVÊA, 2001). Seus mecanismos incluem atividade específica contra agentes infecciosos, crescimento celular da mucosa intestinal aumentando a resistência às infecções, entre outros (RIBEIRO; KUZUHARA, 2007).

Observamos neste trabalho que os filhotes de mães que receberam no terceiro dia de lactação LPS apresentaram alterações em seus padrões de vocalização. Os filhotes de mães que receberam somente LPS no terceiro dia de lactação, quando comparados aos filhotes de mães que receberam apenas o veículo da endotoxina, tiveram aumento no número de vocalizações às 24 e 72 horas e diminuição às 48 horas. Já no tempo total de duração das vocalizações, tiveram diminuição às 48 horas. Os filhotes das mães que receberam no terceiro dia de lactação LPS e zinco, quando comparados aos filhotes de mães que receberam apenas o veículo da endotoxina, tiveram aumento no número de vocalizações às 2, 24 e 72 horas e diminuição às 48 horas. Já no tempo total de duração das vocalizações teve aumento às 2 horas e diminuição às 48 horas.

As concentrações de citocinas têm um papel fundamental na imunogenicidade do leite materno (AUGUST et al., 2006). Desta forma, poderia se pensar que as citocinas liberadas pelo LPS podem ter sido transferidas para os filhotes pelo leite materno. A partir daí as citocinas podem ter interferido no equilíbrio dinâmico interno dos filhotes, causando mudanças no comportamento, de forma similar ao que acontece com um indivíduo exposto ao LPS (ASHDOWN et al., 2006). A liberação de citocinas pelo LPS no leite pode ter alterado o padrão de vocalização destes filhotes.

Neste mesmo trabalho, quando comparados os filhotes das fêmeas que receberam no terceiro dia de lactação o LPS e zinco, com os filhotes de fêmeas que receberam no mesmo período apenas o LPS, observamos que os mesmos tiveram aumento no número total de vocalizações às 2 horas e diminuição às 48 horas, e no tempo total de duração das vocalizações tiveram diminuição as 2 e 48 horas.

Durante o período de lactação, a lactante tem um aumento da perda de zinco em comparação aos demais períodos de sua vida. Isso decorre da secreção desse

elemento no leite por ela produzido (MOSER-VEILLON, 1995). Por se saber pouco sobre a dinâmica de interação do zinco na lactante, alguns autores questionam se a terapia com zinco suplementar poderia aumentar o zinco ofertado à glândula mamária, melhorando assim os níveis de zinco no leite (KREBS et al., 1985a; KARRA et al., 1988; KARRA; KIRKSEY, 1988; SALMENPERA et al., 1994a.). Foram relatados aumento significativo de zinco no soro e leite de mães americanas suplementadas com 25 mg/dia desse mineral até seis meses de lactação (KARRA; KIRKSEY, 1988; KARRA et al., 1988). Os resultados obtidos por Salmenpera et al. (1994b) e Sazawal et al. (1996), também demonstraram aumento significativo de zinco no leite de mães suplementadas. Porém a ingestão em excesso de zinco não é benéfica, pois sendo um metal o zinco pode provocar intoxicações, causando sérias doenças e até a morte (SHANKAR; PRASAD, 1998). Quando metabolizado pelo organismo em altas concentrações, o zinco continua normalmente seu transporte, saturando as proteínas, impedido a distribuição dos outros minerais, como o ferro e o cromo e provocando o estresse oxidativo das células e a morte neuronal (SAGGAR et al., 1991; SHANKAR; PRASAD, 1998). Dessa forma podemos sugerir neste trabalho que a administração 2 mg/kg de zinco por via s.c. em ratas lactantes no terceiro dia de lactação acentuou o comportamento doentio as 48 horas após a administração do LPS, tanto nas mães, que tiveram diminuição em sua atividade geral observada em campo aberto, como em seus filhotes, que tiveram a vocalização ultrassônica diminuída.

O comportamento doentio maternal durante a lactação também pode ser acompanhado pelo estresse materno. A exposição ao LPS no terceiro dia de lactação pode ter afetado o eixo HPA, explicados pelos altos níveis de corticosterona no leite. Brummelte et al. (2010) relataram que filhotes expostos a altos níveis de corticosterona materna gestacional tinham níveis de corticosterona maior no leite dentro estômago ou no cérebro em LD7. O estresse agudo aumentou os níveis de corticosterona no soro e leite da mãe. O consumo de corticosterona no leite materno em recém-nascidos resultaria na ativação da própria corticosterona dos filhotes. Esta mudança do padrão da vocalização dos filhotes pode também ter contribuído para a redução na latência para contato e carregar o primeiro filhote observadas no comportamento maternal.

Outro achado importante no presente trabalho foi o aumento da atividade do sistema imune frente ao desafio com LPS em filhotes expostos na lactação à mesma

endotoxina via materna acompanhado por diminuição na atividade geral em campo aberto.

A diminuição na atividade geral em campo aberto pode ser atribuída ao comportamento doentio causado pela administração do LPS nesses filhotes, pois uma das características deste comportamento é a diminuição da exploração ambiental (HART, 1988).

A ativação precoce do sistema imune quer seja por LPS ou infecção bacteriana altera a programação do sistema imune inato (BOISSE et al., 2004; WALKER et al., 2004; BILBO et al., 2005; ELLIS; MOUIHATE; PITTMAN, 2005; SPENCER; HEIDA; PITTMAN, 2005). Estes efeitos são atribuídos à facilitação na liberação de glicorticóides, promovida pela ativação precoce do eixo HPA (MOUIHATE et al., 2010).

Ao comparamos os filhotes de mães que receberam LPS e zinco no terceiro dia de lactação com os filhotes de mães que receberam apenas LPS e foram desafiados com LPS no vigésimo primeiro dia de lactação, ou seja, o dia do desmame, observamos que esses filhotes tiveram sua atividade imunológica aumentada.

A resposta imune mediada por células conta intensa participação dos linfócitos T. Essas células especiais, juntamente com proteínas especializadas, destroem microrganismos específicos ou células anormais (SHANKAR; PRASAD, 1998; NIRASAWA et al., 1999; RINK; GABRIEL, 2000). Neste processo, alguns linfócitos T, assim como os linfócitos B, retêm uma “memória” do microrganismo invasor, de forma que esses microrganismos serão destruídos mais rapidamente no caso uma futura infecção. O zinco é necessário para a ativação da timulina, um hormônio que estimula o desenvolvimento de células brancas com funções específicas, tais como “auxiliares”, “supressores” e “matadores” (NIRASAWA et al., 1999).

Resumidamente, os resultados aqui apresentados mostram que a exposição no terceiro dia da lactação ao LPS e o tratamento com zinco promove menor latência para contato e carregar o primeiro filhote e diminui a atividade geral em campo aberto no quinto dia da lactação. Na prole dessas fêmeas esse tratamento promove alteração no padrão de vocalização. Ainda na prole, na idade pré-pubere, o desafio com LPS provocou alteração no *burst* e na fagocitose de neutrófilos, ou seja,

aumentou a resposta ao LPS, e produziu comportamento doentio, pois houve diminuição na atividade geral observada em campo aberto.

A explicação de muitos destes achados leva à formulação de novas hipóteses, as quais devem ser testadas em detalhes para que se possa constituir um entendimento mais profundo dos fenômenos observados neste trabalho.

8 CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados mostram que, em ratas virgens, gestantes e lactantes, a exposição ao LPS e o tratamento com zinco modificou de forma específica a temperatura e peso corporal, consumo de água e ração e a atividade geral observadas em campo aberto. Esses dados sugerem que a administração de LPS e o tratamento com zinco têm seus efeitos modulados conforme o estágio fisiológico em que a fêmea se encontra.

É possível que a alteração no comportamento maternal tenha sido causada pela febre materna, bem como pelas alterações do padrão de vocalização ultrassônica em filhotes decorrente da exposição ao LPS e ao tratamento com zinco. Além disso, a exposição materna à endotoxina e ao zinco levou à sensibilização do sistema imunológico na prole. Isso se revelou quando os filhotes foram desafiados com LPS.

Assim, os resultados indicam que a inflamação, bem como o tratamento com zinco em fêmeas lactantes, interfere com a interação mãe/filhote, resultando em efeitos de curto e longo prazo sobre o comportamento dos filhotes. A partir deste trabalho, a possibilidade da exposição de mães à endotoxina bacteriana e da modulação de seus efeitos pelo zinco programar as respostas inflamatórias dos filhos torna-se factível.

REFERÊNCIAS

- ALBERT, D. J.; WALSH, M. L. Aggression in the lactating female rat: the normal decline is not dependent on the physical development of the pups. **Physiology and Behavior**, v. 58, n. 3, p. 477-481, 1995.
- ALLIN, J. T.; BANKS, E. M. Effects of temperature on ultrasound production by infant albino rats. **Developmental Psychobiology**, v. 4, n. 2, p. 149-156, 1971.
- ALLIN, J. T.; BANKS, E. M. Functional aspects of ultrasound production by infant albino rats (*Rattus norvegicus*). **Animal Behaviour**, v. 20, n. 1, p. 175-185, 1972.
- ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmunomodulation: the cross-talk between nervous and immune systems. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n. 4, p. 363-369, 2007.
- ANISMAN, H.; ZALCMAN, S.; ZACHARKO, R. M. The impact of stressors on immune and central neurotransmitter activity: bidirectional communication, **Reviews in the Neurosciences**, v. 4, p. 147-180, 1993.
- AOYAMA, K.; SEAWARD, P. G.; LAPINSKY, S. E. Fetal outcome in the critically ill pregnant woman. **Critical care**, v. 18, n. 3, p. 307, 2014.
- ASHDOWN, H.; DUMONT, Y.; NG, M.; POOLE, S.; BOKSA, P.; LUHESHI, G. N. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 47-55, 2006.
- AUGUST, A.; MUELLER, C.; WEAVER, V.; POLANCO, T. A.; WALSH, E. R.; CANTORNA, M. T. Nutrients, nuclear receptors, inflammation, immunity lipids, PPAR, and allergic asthma. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 3, p. 695-699, 2006.
- AVITSUR, R.; WEIDENFIEL, D.; YERMEYA, R. Cytokines inhibit sexual behavior in female rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 13, p. 33, 1999.
- AWOR, P.; WAMANI, H.; TYLLESKAR, T.; PETERSON, S. Drug seller adherence to clinical protocols with integrated management of malaria, pneumonia and diarrhoea at drug shops in Uganda. **Malaria Journal**. V. 14, p 277, 2015.
- BARCELOUX, D. G. Zinc. **Clinical Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 279-292, 1999.
- BEN-JONATHAN, N.; HUGO, E. Prolactin (PRL) in adipose tissue: regulation and functions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 846, p. 1-35, 2015.
- BERNARDI, M. M.; NETO, J. P. Effects of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open field behavior of rats. **Psychopharmacology**, v. 65, n. 3, p. 247-250, 1979.

BILBO, S. D.; BIEDENKAPP, J. C.; DER-AVAKIAN, A.; WATKINS, L. R.; RUDY, J. W.; MAIER, S. F. Neonatal infection-induced memory impairment after lipopolysaccharide in adulthood is prevented via caspase-1 inhibition. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 35, p. 8000-8009, 2005.

BLALOCK, J. E. The syntax of immune-endocrine communication. **Immunology Today**, v. 15, p. 504-544, 1994.

BLATTEIS, C. M.; BEALER, S. L.; HUNTER, W. S.; LLANOS, Q. J.; AHOKAS, R. A.; MASHBURN J.R., T. A. Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle in guinea pigs. **Brain Research Bulletin**, v. 11, n. 5, p. 519-26, 1983.

BLUMBERG, M. S.; SOKOLOFF, G. Do infant rats cry? **Psychological Review**, v. 108, n. 1, p. 83-95, 2001.

BOISSE, L.; MOUIHATE, A.; ELLIS, S.; PITTMAN, Q. J. Long-term alterations in neuroimmune responses after neonatal exposure to lipopolysaccharide. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 21, p. 4928-4934, 2004.

BRANCHI, I.; SANTUCCI, D.; ALLEVA, E. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. **Behavioural, Brain and Research**, v. 125, n. 1-2, p. 49-56, 2001.

BRIDGES, R. S. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. **Front Neuroendocrinology**, v. 36, p. 178-196, 2015.

BROADHURST, P. L. Experiments in psychogenetics. **Psychogenetics and Psychopharmacology**, v. 1, p. 3 -102, 1960.

BROUETTE-LAHLOU, I.; VERNET-MAURY, E.; VIGOUROUX, M. Role of pups' ultrasonic calls in a particular maternal behavior in Wistar rat: pups' anogenital licking. **Behavioural Brain Research**, v. 50, n. 1-2, p. 147-154, 1992.

BRUMMELTE, S.; SCHMIDT, K. L.; TAVES, M. D.; SOMA, K. K.; GALEA, L. A. Elevated corticosterone levels in stomach milk, serum, and brain of male and female offspring after maternal corticosterone treatment in the rat. **Developmental Neurobiology**, v. 70, n. 10, p. 714-725, 2010

CAROLA, V.; D'OLIMPIO, F.; BRUNAMONTI, E.; MANGIA, F.; RENZI, P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural Brain Research**, v. 134, n. 1-2, p. 49-57, 2002.

CATICHA, O.; NORATO, D. Y.; TAMBASCIA, M. A.; SANTANA, A.; STEPHANOU, A.; SARLIS, N. J. Total body zinc depletion and its relationship to the development of hyperprolactinemia in chronic renal insufficiency. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 19, n. 7, p. 441-448, 1996.

CHAMBERS, C. D.; JOHNSON, K. A.; DICK, L. M.; FELIX, R. J.; JONES, K. L. Maternal fever and birth outcome: a prospective study. **Teratology**, v. 58, n. 6, p. 251–7, 1998.

CHOWANADISAI, W.; KELLEHER, S. L.; LÖNNERDAL, B. Maternal zinc deficiency raises plasma prolactin levels in lactating rats. **The Journal of nutrition**, v. 134, p. 1314–1319, 2004.

CHRISTIANSON, D. W. Structural biology of zinc. **Advances in Protein Chemistry**, v. 42, p. 281–355, 1991.

CLEMMER, T. P.; FISHER, C. J., JR.; BONE, R. C.; SLOTMAN, G. J.; METZ, C. A.; THOMAS, F. Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome. The Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. **Critical Care Medicine**, v. 20, n. 10, p. 1395–401, 1992.

COLEMAN, J. E. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 61, p. 897–946, 1992.

CRUZ-CASSALLAS, P. E.; NASELLO, A. G.; HUCKE, E. E. T. S.; FELICIO, L. F. Dual modulation of male sexual behavior in rats by central prolactin: relationship with in vivo striatal dopaminergic activity. **Psychoneuroendocrinology**, v. 24, p. 681–93, 1999.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 933, p. 222–234, 2001.

DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, p. 153–160, 2007.

DARDENNE, M. Zinc and immune function. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. S20–3, 2002. Supplement, 3.

DAS, R. R.; SINGH, M. Oral zinc for the common cold. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 14, p. 1440–1, 2014.

DOMELLÖF, M. Nutritional care of premature infants: microminerals. **World Review of Nutrition and Dietetics Home**, v. 110, p. 121–39, 2014.

DOUGLAS, A. J.; BRUNTON, P. J.; BOSCH, O. J.; RUSSELL, J. A.; NEUMANN, I. D. Neuroendocrine Responses to Stress in Mice: Hyporesponsiveness in Pregnancy and Parturition. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5268–5276, 2003.

DUNN, A. J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clinical Neuroscience Research**, v. 6, p. 52–68, 2006.

EDWARDS, M. J. Review: Hyperthermia and fever during pregnancy. **Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology**, v. 76, n. 7, p. 507–516, 2006.

ESKANDARI, F.; WEBSTER, J. I.; STERNBERG, E. M. Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. **Arthritis Research & Therapy**, v. 5, p. 251-65, 2003.

ELLIS, S.; MOUIHATE, A.; PITTMAN, Q. J. Early life immune challenge alters innate immune responses to lipopolysaccharide: implications for host defense as adults. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 11, p. 1519-1521, 2005.

FELICIO, L. F.; BRIDGES, R. S. Domperidone induces a probenecid-sensitive rise in immunoreactive prolactin in cerebroventricular perfusates in female rats. **Brain Research Bulletin**, v. 573, n. 1, p. 133-138, 1992.

FELICIO, L. F.; FLORIO, J. C.; SIDER, L. H.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; BRIDGES, R. S. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. **Brain Research Bulletin**, v. 40, p. 253-6, 1996

FERNANDEZ-PATRON, C.; LEUNG, D. Emergence of a metalloproteinase / phospholipase A2 axis of systemic inflammation. **Journal of Metalloproteinases In Medicine**, v. 2, p. 29-38, 2015.

FERREIRA, A.; PEREIRA, M.; AGRATI, D.; URIARTE, N.; FERNANDEZ-GUASTI, A. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. **Physiology and Behavior**, v. 77, n. 2-3, p. 197-204, 2002.

FREY, R. M.; OLIVEIRA, V. P.; FRANCI, M.S; LUCION, C.R; GIOVANARDI, M. Perfil hormonal de ratas lactantes: Porto Alegre. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., Porto Alegre, 2002. **Proceedings...** Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

GARDNER, C. R. Distress vocalization in rat pups. A simple screening method for anxiolytic drugs. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 14, n. 3, p. 181-187, 1985.

GIORDANO, A. L.; JOHNSON, A. E.; ROSENBLATT, J. S. Haloperidol-induced disruption of retrieval behavior and reversal with apomorphine in lactating rats. **Physiol and Behavior**, v. 48, p. 211-214, 1990.

GONZÁLEZ-MARISCAL, G.; CABA, M.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, M.; BAUTISTA, A.; HUDSON, R. Mothers and offspring: The rabbit as a model system in the study of mammalian maternal behavior and sibling interactions. **Hormones and Behavior**, v. 99, p. S0018-506X, 2015.

HAASE, H.; RINK, L. Zinc signals and immune function. **BioFactors**, v. 40, p. 27–40, 2014.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Comparative Psychoanalysis**, v. 18, p. 385 - 403, 1934.

HANSEN, S.; HARTHON, C.; WALLIN, E.; LOFBERG, L.; SVENSSON, K. Mesotelencephalic dopamine system and reproductive behavior in the female rat: effects of ventral tegmental 6-hydroxydopamine lesions on maternal and sexual responsiveness. **Behavioral Neuroscience**, v. 105, n. 4, p. 588-598, 1991.

HANSEN, S.; HARTHON, C.; WALLIN, E.; LOFBERG, L.; SWENSSON, K. The effects of 6-OHDA-induced dopamine depletions in ventral ou dorsal striatum on maternal and sexual behavior in the female rat. **Pharmacoly Biochemistry Behavior**, v. 39, p. 71-7, 1991.

HARRIS, W. H. Cardiovascular effects of fever in the ewe and fetal lamb. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 128, n. 3, p. 262–265, 1977.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 12, n. 2, p. 123–37, 1988.

HEMILÄ, H.; CHALKER, E. The effectiveness of high dose zinc acetate lozenges on various common cold symptoms: a meta-analysis. **BMC Family Practice**, v. 16, p.16-24, 2015

HERNANDEZ, L.; HOEBEL, B. G. Food reward and cocaine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens as mensured by microdialysis. **Life Science**, v. 42, p. 1705-12, 1988.

HOFER, M. A.; SHAIR, H. Ultrasonic vocalization during social interaction and isolation in 2-weeek-old rats. **Developmental Psychobiology**, v. 11, n. 5, p. 495-504, 1978.

HOFER, M. A.; SHAIR, H. Sensory processes in the control of isolation-induced ultrasonic vocalization by 2-week-old rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 94, n. 2, p. 271-279, 1980.

HOFER, M. A. Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. **Psychoneuroendocrinology**, v. 21, n. 2, p. 203-217, 1996.

HORNYKIEWICZ, O. Biochemical aspects of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 51, p. S2–S9, 1998.

HSUEH, W.; GONZALEZ-CRUSSI, F.; ARROYAVE, J. L. Platelet-activating factor: An endogenous mediator for bowel necrosis in endotoxemia. **FASEB Journal**, v. 1, n. 5, p. 403–405, 1987.

HUOT, R. L.; PLOTSKY, P. M.; LENOX, R. H.; MCNAMARA, R. K. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. **Brain Research**, v. 950, n. 1-2, p. 52-63, 2002.

INGRAN, D. K. Age–related decline in physical activity: generalization to nonhumans. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, n. 9, p. 1623-1629, 2000.

INSEL, T. R.; HILL, J. L.; MAYOR, R. B. Rat pup ultrasonic isolation calls: possible mediation by the benzodiazepine receptor complex. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 5, p. 1263-1267, 1986.

IVANOV, A. I.; PATEL, S.; KULCHITSKY, V. A.; ROMANOVSKY. Platelet-activating factor: a previously unrecognized mediator of fever. **The Journal of Physiology**, v. 553, pt. 1, p. 221–8, 2003.

IVANOV, A. I.; STEINER, A. A.; PATEL, S.; RUDAYA, A. Y.; ROMANOVSKY, A. A. Albumin is not an irreplaceable carrier for amphipathic mediators of thermoregulatory responses to LPS: compensatory role of alpha1-acid glycoprotein. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 4, p. R872–8, 2005.

JUDD, A. M.; MACLEOD, R. M.; LOGIN, I. S. Zinc acutely, selectively and reversibly inhibits pituitary prolactin secretion. **Brain Research**, v. 294, n. 1, p. 190–192, 1984.

KARRA, M. V.; KIRKSEY, A. Variation in zinc, calcium, and magnesium concentrations of human milk within a 24-hour period from 1 to 6 months of lactation. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 100-106, 1988.

KARRA, M. V.; KIRKSEY, A.; GALAL, O.; BASSILY, N. S.; HARRISON, G. G.; JEROME, N. W. Zinc, calcium, and magnesium concentrations in milk from American and Egyptian women throughout the first 6 months of lactation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 642-648, 1988.

KASTING, N.; VEALE, W.; COOPER, K. Suppression of fever at term of pregnancy. **Nature**, v. 5642, p. 245–246, 1978.

KENT, S.; BLUTHE, R. M.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Sickness behavior as a new target for drug development. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.13 p.24-28, 1992

KIRSTEN, T. B.; PALERMO-NETO, J.; BERNARDI, M. M. Maternal exposure to an endotoxin induces short and long- term decrease on male offspring social behavior. Rio de Janeiro. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR NEUROIMMUNOMODULATION, 7., Rio de Janeiro, 2008. **Proceedings...** Columbia: International Society for NeuroImmunoModulation, 2008.

KIRSTEN, T. B.; TARICANO, M.; MAIORCA, P. C.; PALERMO-NETO, J.; BERNARDI, M. M. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. **NeuroImmuno Modulation**, v. 17, n. 4, p. 240–251, 2010.

KIRSTEN, T. B.; CHAVES, G. P.; TARICANO, M.; MARTINS, D. O.; FLORIO, J. C.; BRITTO, L. R.; TORRAO, A. S.; PALERMO-NETO, J.; BERNARDI, M. M. Prenatal LPS exposure reduces olfactory perception in neonatal and adult rats. **Physiology and Behavior**, v. 104, n. 3, p. 417–422, 2011.

KIRSTEN, T. B.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; CHAIBLE, L. M.; SILVA, A. C.; MARTINS, D. O.; BRITTO, L. R.; DAGLI, M. L.; TORRAO, A. S.; PALERMO-NETO, J.; BERNARDI, M. M. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. **Journal of Neuroscience Research**, v. 90, p. 1903–1912, 2012.

KIRSTEN, T. B.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; BERNARDES, S.; SCAVONE, C.; SARKIS, J. E.; BERNARDI, M. M.; FELICIO, L. F. Lipopolysaccharide Exposure Induces Maternal Hypozincemia, and Prenatal Zinc Treatment Prevents Autistic-Like Behaviors and Disturbances in the Striatal Dopaminergic and mTOR Systems of Offspring. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. e0134565., 2015.

KOZAK, W.; FRAIFELD, V. Non-prostaglandin eicosanoids in fever and anapyrexia. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 3339–3355, 2004.

KREBS, N. F.; HAMBIDGE, K. M.; JACOBS, M. A.; MYLET, S. Zinc in human milk: diurnal and within-feed patterns. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 227-229, 1985a.

KREBS, N. F.; HAMBIDGE, K. M.; JACOBS, M. A.; RASBACH, J. O. The effects of a dietary zinc supplement during lactation on longitudinal changes in maternal zinc status and milk zinc concentrations. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 41, n. 3, p. 560-570, 1985b.

KURUGOL, Z.; BAYRAM, N.; ATIK, T. **Effect of zinc sulfate on common cold in children**: randomized, double blind study. *pediatrics international*, 2007. Disponível em: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed8&AN=2007586346> 19 jan. 2016.

LAMOUNIER, J. A.; VIEIRA, G. O.; GOUVÊA, L. C. **Composição do Leite Humano - Fatores Nutricionais** In: Rego J.D. Aleitamento Materno. 2001. p. 47-58.

LARSON, S. J.; DUNN, A. J. Behavioral effects of cytokines. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 15, p. 371-387, 2001

LENCZOWSKI, M. J.; BLUTHE, R. M.; ROTH, J.; REES, G. S.; RUSHFORTH, D. A.; VAN DAM, A. M.; TILDERS, F. J.; DANTZER, R.; ROTHWELL, N. J.; LUHESHI, G. N. Central administration of rat IL-6 induces HPA activation and fever but not sickness behavior in rats. **The American Journal of Physiology**, v. 276, n. 3, pt. 2, p. R652–R658, 1999.

LIBERT, C.; VAN MOLLE, W.; BROUCKAERT, P.; FIERIS, W. alpha1-Antitrypsin inhibits the lethal response to TNF in mice. **Journal of Immunology**, v. 157, n. 11, p. 5126–5129, 1996.

LIU, E.; LEWIS, K.; AL-SAFFAR, H.; KRALL, C. M.; SINGH, A.; KULCHITSKY, V. A.; CORRIGAN, J. J.; SIMONS, C. T.; PETERSEN, S. R.; MUSTEATA, F. M.; BAKSHI, C. S.; ROMANOVSKY, A. A.; SELLATI, T. J.; STEINER, A. A. Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide- and Escherichia coli-induced systemic inflammation. **AJP: regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 302, n. 12, p. R1372–R1383, 2012.

LONSTEIN, J. S. Effects of dopamin receptor antagonism with haloperidol on nurturing behavior in the biparental prairie vole. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 74, p. 11-19, 2002.

MACKOWIAK, P. A.; PLAISANCE, K. I. Benefits and risks of antipyretic therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 856, p. 214-23, 1998.

MANN, P. E. Finasteride delays the onset of maternal behavior in primigravid rats. **Physiology & Behavior**, v. 88, n. 4-5, p. 333-338, 2006.

MARRACHE, A. M. Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 11, p. 6474–6481, 2002.

MARTIN, S. M.; MALKINSON, T. J.; VEALE, W. L.; PITTMAN, Q. J. Fever in pregnant, parturient, and lactating rats. **American Journal of Physiology: regulatory integrative and comparative physiology**, v. 37, n. 4, p. R919–R923, 1995.

MATTSON, B. J.; MORRELL, J. I. Preference for cocaine- versus pup-associated cues differentially activates neurons expressing either Fos or cocaine- and amphetamine-regulated transcript in lactating, maternal rodents. **Neuroscience**, v. 135, n. 2, p. 315-28, 2005

MCCALL, K. A.; HUANG, C. C.; FIERKE, C. A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1437S–1446S, 2000. Supplement.

MERALI, Z.; LACOSTA, S.; ANISMAN, H. Effects of interleukin-1 β d mild stress on alterations of norepinephrine, dopamine and serotonin neurotransmission: a regional microdialysis study. **Behavioral and Brain Research**, v. 761, p. 225-235, 1997.

MICZEK, K. A.; WEERTS, E. M.; VIVIAN, J. A.; BARROS, H. M. Aggression, anxiety and vocalizations in animals: GABAA and 5-HT anxiolytics. **Psychopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 38-56, 1995.

MORAN, A. P. **Molecular structure, biosynthesis, and pathogenic roles of Lipopolysaccharides**. In: MOBLEY H. L. T.; MENDZ, G. L.; HAZELL, S. L. *Helicobacter pylori: physiology and genetics*. Washington, DC: ASM Press, 2001. chap. 8, p. 213-9.

MOSER-VEILLON, P. B. Zinc needs and homeostasis during lactation. **Analyst**, v. 120, n. 3, p. 895-897, 1995.

MOUIHATE, A.; CLERGET-FROIDEVAUX, M. S.; NAKAMURA, K.; NEGISHI, M.; WALLACE, J. L.; PITTMAN, Q. J. Suppression of fever at near term is associated with reduced COX-2 protein expression in rat hypothalamus. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 283, n. 3, p. R800–5, 2002.

MOUIHATE, A.; HARRE, E. M.; MARTIN, S.; PITTMAN, Q. J. Suppression of the febrile response in late gestation: Evidence, mechanisms and outcomes. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, p. 508–514, 2008.

MOUIHATE, A.; BOISSÉ, L.; PITTMAN, Q. J. A novel antipyretic action of 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in the rat brain. **The Journal of neuroscience: the official journal of the society for neuroscience**, v. 24, n. 6, p. 1312–1318, 2004.

MOUIHATE, A.; GALIC, M. A.; ELLIS, S. L.; SPENCER, S. J.; TSUTSUI, S.; PITTMAN, Q. J. Early life activation of toll-like receptor 4 reprograms neural anti-inflammatory pathways. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 23, p. 7975-7983, 2010.

NAHAS, R.; BALLA, A. Complementary and alternative medicine for prevention and treatment of the common cold. **Canadian Family Physician Médecin de Famille Canadien**, v. 57, n. 1, p. 31–6, 2011.

NASCIMENTO, A.; BERNARDI, M.; PECORARI, V.; MASSOCO, C.; FELICIO, L. Temporal analysis of lipopolysaccharide-induced sickness behavior in virgin and lactating female rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 20, n. 6, p. 305–12, 2013.

NASCIMENTO, A. N.; ALVES, G. J.; MASSOCO, C. S.; TEODOROV, E.; FELICIO, L. F.; BERNADI, M. M. Lipopolysaccharide-induced sickness behavior in lactating rats decreases ultrasonic vocalizations and exacerbates immune system activity in male offspring. **Neuroimmunomodulation**, v. 22, p. 213-21, 2015.

NASELLO, A. G.; VANZELER, M. L.; MADUREIRA, E. H.; FELICIO, L. F. Effects of acute and long-term domperidone treatment on prolactin and gonadal hormone levels and sexual behavior of male and female rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 58, n. 4, p. 1089–94, 1997.

NIRASAWA, S.; NAKAJIMA, Y.; ZHANG, Z. Z.; YOSHIDA, M.; HAYASHI, K. Intramolecular chaperone and inhibitor activities of a propeptide from a bacterial zinc aminopeptidase. **Biochemical Journal**, v. 341, pt. 1, p. 25-31, 1999.

NOIROT, E. Ultrasounds and maternal behavior in small rodents. **Developmental Psychobiology**, v. 5, n. 4, p. 371-387, 1972.

NUMAN, M. Maternal behavior. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. **The Physiology of Reproduction**. 1994. v. 2, p. 221-302.

NUMAN, M. A neural circuitry analysis of maternal behavior in the rat. **Acta Paediatrica Supplement**, v. 397, p. 19-28, 1994.

OCHOA-AMAYA, J. E.; MALUCELLI, B. E.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; NASELLO, A. G.; FELICIO, L. F.; CARVALHO-FREITAS, M. I. Acute and chronic stress and the inflammatory response in hyperprolactinemic rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 6, p. 386-395, 2010.

OCHOA-AMAYA, J. E.; MALUCELLI, B. E.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; NASELLO, A. G.; FELICIO, L. F.; CARVALHO-FREITAS, M. I. Dual effects of hyperprolactinemia on carrageenan-induced inflammatory paw edema in rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 18, n. 4, p. 245-253, 2011.

OCHOA-AMAYA, J. E.; HAMASATO, E. K.; TOBARUELA, C. N.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.; ANSELMO FRANCI, J. A.; PALERMO-NETO, J.; GREIFFO, F. R.; DE BRITTO, A. A.; VIEIRA, R. P.; LIGEIRO DE OLIVEIRA, A. P.; MASSOCO CDE, O.; FELICIO, L. F. Short-term hyperprolactinemia decreases allergic inflammatory response of the lungs. **Life Science**, v. 142, p. 66-75, 2015.

OKON, B.; WALCZAK, Z. Enormous ascites in a fetus with congenital atresia of the bowel and meconial peritonitis as a cause of labor dystocia. **Ginekologia Polska**, v. 43, n. 2, p. 235-237, 1972.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Elementos traços na nutrição e saúde humanas**. São Paulo: Roca, 1998

OSWALT, G. L.; MEIER, G. W. Olfactory, thermal, and tactual influences on infantile ultrasonic vocalization in rats. **Developmental Psychobiology**, v. 8, n. 2, p. 129-135, 1975.

PARKINSON, J. A.; WILLOUGHBY, P. J.; ROBINS, T. W. & EVERITT, B. J. Disconnection of the anterior cingulate cortex and nucleus accumbens core impairs Pavlovian approach behaviour: further evidence for limbic cortical-ventral striatopallidal systems. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, p. 42-63, 2000.

PETRAGLIA, F.; IMPERATORE, A.; CHALLIS, J. R. G. Neuroendocrine mechanisms in pregnancy and parturition. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 6, p. 783–816, 2010.

PIJNENBURG, A. J. J.; VAN ROSSUM, J. M. Stimulation of locomotor activity following injection of dopamine into nucleus accumbens. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 25, p. 1003-5, 1973.

RAHIM VAKILI, M. D.; MOHAMMAD VAHEDIAN, M. C. S.; GHOLAMHOSSIAN, M, D.; MAHMOUD MAHMOUDI, M. D. Effects of Zinc Supplementation in Occurrence and Duration of Common Cold in School Aged Children during Cold Season: a Double-Blind Placebo-Controlled Trial. **Iranian Journal of Pediatrics**, v. 19, n. 4, p. 376–380, 2009.

NUMAN, M. Maternal behavior. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. **The Physiology of Reproduction**. 1994. v. 2, p. 221-302.

RIBEIRO, L. C.; KUZUHARA, J. S. W. In SILVA, S.M.; CHEMIN, S.D.; MURA, J.D.P. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**, 2011, v.2, p. 520-521

RINK, L.; GABRIEL, P. Zinc and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, n. 4, p. 541-552, 2000.

RIVEST, S. Molecular mechanisms and neural pathways mediating the influence of interleukin-1 on the activity of neuroendocrine CRF motoneurons in the rat. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 13, p. 135-146, 1995.

RIVIER, C. Effects of peripheral and central cytokines on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 697, p. 97-105, 1993.

ROBBINS, T. W.; EVERITT, B. J. Neurobehavioral mechanisms of reward and motivation. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 6, p. 228-236, 1996.

ROMANOVSKY, A. A.; KULCHITSKY, V. A.; SIMONS, C. T.; SUGIMOTO, N. Methodology of fever research: why are polyphasic fevers often thought to be biphasic? **The American Journal of Physiology**, v. 275, n. 1, pt. 2, p. R332-8, 1998.

ROMANOVSKY, A. A. Thermoregulatory manifestations of systemic inflammation: lessons from vagotomy. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**, v. 85, n. 1-3, p. 39-48, 2000.

ROMANOVSKY, A. A.; SIMONS, C. T.; KULCHITSKY, V. A. "Biphasic" fevers often consist of more than two phases. **The American Journal of Physiology**, v. 275, n. 1 Pt 2, p. R323-31, 1998.

ROMANOVSKY, A. A.; ALMEIDA, M. C.; ARONOFF, D. M.; IVANOV, A. I.; KONSAN, J. P.; STEINER, A. A.; TUREK, V. F. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. **Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library**, v. 10, p. 2193-216, 2005.

ROSENBLATT, J. S.; MAYER, A. D.; SIEGEL, H. I. Maternal behavior among the nonprimate mammals. In: ADLER, N.; PFAFF, D.; GOY, R. W. **Handbook of Behavioral Neurobiology**: reproduction. New York: Plenum Press, 1985. v. 7, p. 229-98.

SAGGAR, V.; CHANDRA, S.; JAISWAL, J. N.; SINGH, M. Antimicrobial efficacy of iodoformized zinc oxide-eugenol sealer on micro-organisms of root canal. **Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v. 9, n. 1, p. 1-3, 1991.

SALGUEIRO, M. J.; ZUBILLAGA, M.; LYSIONEK, A.; CREMASCHI, G.; GOLDMAN, C. G.; CARO, R.; DE PAOLI, T.; HAGER, A.; WEILL, R.; BOCCIO, J. Zinc as an essential micronutrient: A review. **Nutrition Research**, v. 20, n. 5, p. 737-755, 2000a.

SALGUEIRO, M. J.; ZUBILLAGA, M. B.; LYSIONEK, A. E.; SARABIA, M. I.; CARO, R. A.; DE PAOLI, T.; HAGER, A.; ETTLIN, E.; WEILL, R.; BOCCIO, J. R. Zinc status and immune system relationship: a review. **Biological Trace Element Research**, v. 76, n. 3, p. 193–205, 2000b.

SALMENPERA, L.; PERHEENTUPA, J.; NANTO, V.; SIIMES, M. A. Low zinc intake during exclusive breast-feeding does not impair growth. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition** v. 18, n. 3, p. 361-370, 1994a.

SALMENPERA, L.; PERHEENTUPA, J.; PAKARINEN, P.; SIIMES, M. A. Zinc supplementation of infant formula. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, n. 5, p. 985-989, 1994b.

SAZAWAL, S.; BENTLEY, M.; BLACK, R. E.; DHINGRA, P.; GEORGE, S.; BHAN, M. K. Effect of zinc supplementation on observed activity in low socioeconomic Indian preschool children. **Pediatrics**, v. 98, n. 6 Pt 1, p. 1132-1137, 1996a.

SAZAWAL, S.; BLACK, R. E.; BHAN, M. K.; JALLA, S.; BHANDARI, N.; SINHA, A.; MAJUMDAR, S. Zinc supplementation reduces the incidence of persistent diarrhea and dysentery among low socioeconomic children in India. **Journal of Nutrition**, v. 126, n. 2, p. 443-450, 1996b.

SHANKAR, A. H.; PRASAD, A. S. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 2 Suppl, p. 447S-463S, 1998.

SCIENCE, M.; JOHNSTONE, J.; ROTH, D. E.; GUYATT, G.; LOEB, M. Zinc for the treatment of the common cold: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 184, n. 10, p. E551–61, 2012.

SESSLER, D. I. Mild perioperative hypothermia. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 24, p. 1730–1737, 1997.

SMOTHERMAN, W. P.; BELL, R. W.; STARZEC, J.; ELIAS, J.; ZACHMAN, T. A. Maternal responses to infant vocalizations and olfactory cues in rats and mice. **Behavioral Biology**, v. 12, n. 1, p. 55-66, 1974.

SILVA, M. R. P.; BERNARDI, M. M.; FELÍCIO, L. Effects of dopamine receptor antagonist on ongoing maternal behaviour in rats. **Pharmacology Biochemistry, Behavior**, v. 68, p. 461- 468, 2001.

SOMÉ, J.W.; ABBEDDOU, S.; YAKES JIMENEZ, E.; HESS, S.Y.; OUÉDRAOGO, Z.P.; GUISSOU, R.M.; VOSTI, S.A.; OUÉDRAOGO, J.B.; BROWN, K.H. Effect of zinc added to a daily small-quantity lipid-based nutrient supplement on diarrhoea, malaria, fever and respiratory infections in young children in rural Burkina Faso: a cluster-randomised trial. **BMJ Open**, v.5, p. e007828, 2015.

SPENCER, S. J.; HEIDA, J. G.; PITTMAN, Q. J. Early life immune challenge--effects on behavioural indices of adult rat fear and anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 164, n. 2, p. 231-238, 2005.

STERN, J. M. Multisensory regulation of maternal behavior and masculine sexual behavior: a revised view. **Neuroscience & Biobehavioral Review**, v. 14, n. 2, p. 183-200, 1990.

STERN, J. M.; TAYLOR, L. A. Haloperidol inhibits maternal retrieval and licking, but enhances nursing behavior and litter weight gains in lactating rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 3, n. 6, p. 591-596, 1991.

STERN, J. M. Nursing posture is elicited rapidly in maternally naive, haloperidol-treated female and male rats in response to ventral trunk stimulation from active pups. **Hormones and Behavior**, v. 25, p. 504-71, 1991.

STERN, J. M.; TAYLOR, L. A. Haloperidol inhibits maternal retrieval and licking, but facilitates nursing behavior and milk ejection in lactating rats. **Journal of Neuroendocrinol**, v. 3, p. 591- 596, 1991

STERN, J. M. Somatosensation and maternal care in Norway rats. In: ROSENBLATT, J. S.; SNOWDEN, C. T. (Ed.). **Parental Care**: evolution, mechanisms, and adaptive significance: advances in the study of behavior. San Diego: Academic Press, 1996 v. 25, 243-294.

STERN, J. M.; KEER, S. E. Maternal motivation of lactating rats disrupted by low dosages of haloperidol. **Behavioral and Brain Research**, v. 99, p. 231-239, 1999.

SUGIURA, S.; FUJIMIYA, M.; EBISE, H.; MIYAHIRA, Y.; KATO, I.; SUGIURA, Y.; KIMURA, T.; UEHARA, M.; SATO, H.; SUGIURA, H. Immunosuppressive Effect of Prolactin-Induced Protein. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 96, p. 100–107, 2012.

TAKAHASHI, N.; KASHINO, M.; HIRONAKA, N. Structure of rat ultrasonic vocalizations and its relevance to behavior. **PLoS One**, v. 5, p. 14115, 2010.

TERKEL, A. S.; MOORE, C. L.; BEER, C. G. The effects of testosterone and estrogen on the rate of long-calling vocalization in juvenile laughing gulls, *Larus atricilla*. **Hormones and Behavior**, v. 7, n. 1, p. 49-57, 1976.

TIMMERMAN, W.; WESTERHOF, F.; VAN DER WAL, T. I.; WESTERINK, B. H. Striatal dopamine-glutamate interactions reflected in substantia nigra reticulata firing. **Neuroreport**, v. 9, p. 3829-36, 1998.

TOUFEXIS, D. J.; THRIVIKRAMAN, K. V.; PLOTSKY, P. M.; MORILAK, D. A.; HUANG, N.; WALKER, C. D. Reduced noradrenergic tone to the hypothalamic paraventricular nucleus contributes to the stress hyporesponsiveness of lactation. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 10, n. 6, p. 417–27, 1998.

TRUMBO, P.; YATES, A. A.; SCHLICKER, S.; POOS, M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, p. 294-301, 2001

VOLTARELLI, J. C. **Fever and Inflammation**. Ribeirão Preto. In: Simpósio: SEMIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA CLÍNICAS, 27. Ribeirão Preto, 1994. **Proceedings...** São Paulo, Faculdade de Medicina

ZEISBERGER, E.; MERKER, G.; BLAHSER, S. Fever response in the guinea pig before and after parturition. **Brain Research**, v. 212, n. 379-393, 1981.

YIRMIYA, R.; WEIDENFELD, J.; BARAK, O.; AVITSUR, R.; POLLAK, Y. The role of brain cytokines in mediating the behavioral and neuroendocrine effects of intracerebral mycoplasma fermentans. **Brain Research**, v. 829, p. 28-38, 1999.

WALKER, C. D.; DESCHAMPS, S.; PROULX, K.; TU, M.; SALZMAN, C.; WOODSIDE, B.; LUPIEN, S.; GALLO-PAYET, N.; RICHARD, D. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 29, n. 5, p. 364-382, 2004.

WALKER, C. D.; DESCHAMPS, S.; POULX, K.T.U.; SALZMAN, C.; WOODSIDE, B., LUPEEN, S.; GALLO-PAYET, N.; RICHARD, D. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implication for humans. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 29. p. 364-82, 2009.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WANG, L. P. mRNA expression of prolactin receptor in sheep pituitary and its effect on maternal behavior. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 8650-7, 2015

WILLNER, P.; SCHEEL-KRUGER, J. The mesolimbic dopamine system: from: motivation to action. **Human Psychopharmacology: clinical and experimental**, v. 7, p. 148–149, 1992.