THIAGO BERTI KIRSTEN

**Avaliação comportamental e neuroquímica da prole masculina de
ratas exposta pré-natalmente ao lipopolissacarídeo**

São Paulo

2008

THIAGO BERTI KIRSTEN

**Avaliação comportamental e neuroquímica da prole masculina de
ratas exposta pré-natalmente ao lipopolissacarídeo**

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

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi

São Paulo

2008

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.1984
FMVZ

Kirsten, Thiago Berti

Avaliação comportamental e neuroquímica da prole masculina de ratas exposta pré-natalmente ao lipopolissacarídeo / Thiago Berti Kirsten. – São Paulo : T. B. Kirsten, 2008.
123 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2008.

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

Orientador: Profa Dra Maria Martha Bernardi.

1. LPS. 2. Pré-natal. 3. Desenvolvimento. 4. Comportamento animal.
5. Neuroquímica. 6. Neuroanatomia.. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da administração prenatal de LPS nos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico centrais da prole masculina de ratas", protocolado sob o nº925/2006, utilizando 30 (trinta) ratos, sob a responsabilidade da Dra. Maria Martha Bernardi, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 14/06/06".

(We certify that the Research "Effects of prenatal LPS exposure on male offspring dopaminergic and serotonergic central nervous system", protocol number 925/2006, utilizing 30 (thirty) rats, under the responsibility of Dra. Maria Martha Bernardi, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 06/14/2006).

São Paulo, 19 de junho de 2006

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: KIRSTEN, Thiago Berti

Título: Avaliação comportamental e neuroquímica da prole masculina de ratas exposta pré-natalmente ao lipopolissacarídeo

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com bolsa de mestrado concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo número 06/54587-9) de 09/2006 a 07/2008, e apoio financeiro do projeto temático FAPESP número 04/14128-0.

*"A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original."*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria Carolina e José, pela excelente criação que me permitiu chegar até aqui, e pelo apoio a todas as minhas decisões.

À Gabriela, minha grande companheira, que está sempre ao meu lado.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Martha Bernardi, que me apresentou e me introduziu ao mundo da pesquisa, pelos conhecimentos ensinados, pela confiança, paciência e exemplo de dedicação ao trabalho.

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto, que me acolheu em seu grupo de Neuroimunomodulação, permitindo conhecer essa interessantíssima área interdisciplinar de estudo e pesquisa.

Ao Prof. Dr. Jorge Camilo Flório, que me ajudou com os procedimentos de cromatografia líquida de alta eficiência, nas determinações dos níveis de neurotransmissores e metabólitos no cérebro dos animais.

Ao Prof. Dr. Paulo César Maiorka, neuropatologista, que ajudou na análise e diagnóstico das lâminas dos cortes histológicos dos cérebros dos animais.

Aos demais professores do VPT, especialmente Frederico Azevedo da Costa Pinto, Helenice Souza Spinosa, Luciano Freitas Felício e Luiz Carlos de Sá Rocha, pelas idéias e pelo auxílio quando necessário.

Aos funcionários do biotério do VPT: Cláudia, Herculano, Idalina, Luís, Nelson e Rosiris, pelos cuidados dispensados aos animais utilizados nos experimentos e pela amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do VPT: Priscila, Ricardo e Magali, pelos auxílios nos experimentos e pela amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia do VPT: Luciano e Cláudio, pela confecção das lâminas estudadas.

Às secretárias do VPT, da pós-graduação da FMVZ e da pós-graduação do VPT: Sílvia, Cláudia, Cláudia, Dayse, Joana e Cristina, pelo auxílio sempre que evocado.

Aos funcionários da informática, aos seguranças e aos demais funcionários do VPT, pela ótima convivência.

À todas os funcionários da biblioteca da FMVZ, pelo auxílio sempre que necessário.

À todos os colegas do VPT que contribuíram com alguma etapa deste trabalho, tanto com ensinamentos para a utilização de diversos aparelhos, quanto na ajuda direta nos experimentos: Camila Moreira, Daniel Cohn, Fernando Y. M. Hosomi, Kalan B. Violon, Marcia H. Sukikara, e Marina Taricano.

À todos os colegas da pós-graduação do VPT, em especial: Alison, Andréa, Beth, Caio, Camila Lima, Camila Moreira, Carlos Portela, Carol, Daniel Cohn, Daniel Stankevicius, Denise, Domenica, Eduardo, Elaine, Felipe, Fernando, Gláucie, Heidge, Isis, João Paulo, Kalan, Karin, Luciana Cunha, Luciana Lippi, Luciana Vismari, Marcia, Maria Isabel, Marina, Milena, Mônica, Renato, Ricardo Garé, Ricardo Lazzarini, Sílvia, Soraya, Viviane e Wanderley.

Aos demais familiares e amigos, especialmente Zezo, Patrícia, Leonardo e Gabizinha, pelo apoio sempre que necessário e pelos bons momentos compartilhados.

À FAPESP pelo apoio financeiro, de fundamental importância para o desenrolar deste projeto.

À todos os membros do grupo de Neuroimunomodulação, pelos ensinamentos a cerca desta área, pelas ótimas discussões sobre temas pertinentes ao meu estudo e pela excelente convivência.

E à todos aqueles que, apesar de não terem sido mencionados individualmente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

KIRSTEN, T. B. **Avaliação comportamental e neuroquímica da prole masculina de ratas exposta pré-natalmente ao lipopolissacarídeo.** [Behavioral and neurochemical evaluation of male offspring rats prenatally exposed to lipopolysaccharide]. 2008. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina bacteriana capaz de ativar o sistema imune com a síntese de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α , dentre outros), afetando o cérebro animal e causando o comportamento doentio. Durante a gestação, infecções e inflamações maternas podem levar a danos na prole, incluindo desordens neuropsiquiátricas como depressão, esquizofrenia e autismo. O presente trabalho avaliou os efeitos comportamentais e neuroquímicos da exposição ao LPS em ratas gestantes e nas suas proles. Para tanto, ratas Wistar receberam o LPS (100 μ g / kg, i.p.) no 9,5º dia de gestação (GD). A atividade geral destas ratas foi observada 1 hora após o tratamento; a ingestão de alimentos às 24, 48 e 72 horas e a temperatura corpórea tomada 1, 24 e 48 horas após o tratamento. Durante a gestação e ao nascimento da prole, avaliou-se o ganho de peso materno, a duração da gestação, o número e peso dos filhotes nascidos. Os filhotes machos destas ratas tratadas com LPS foram estudados quanto aos padrões físicos e reflexológicos, a atividade geral observada em campo aberto, o comportamento de brincar, os níveis de neurotransmissores e metabólitos no estriado, hipotálamo e córtex frontal, a morfologia cerebral, a interação social na idade adulta, a catatonia induzida por haloperidol e a estereotipia induzida por apomorfina. Os resultados mostraram que a administração do LPS no GD 9,5 nas fêmeas prenhes causou: 1) comportamento doentio, com redução da atividade geral, da ingestão de alimentos, do ganho de peso durante a gestação, e da viabilidade da prole; 2) não interferiu na duração da gestação, no peso total e individual da prole, além de não causar febre materna. Na prole destas ratas observou-se na infância, em relação aos animais do grupo controle: 1) ausência de alterações no desenvolvimento dos padrões físicos e reflexológicos; 2) redução na auto-limpeza, sem alterações nos demais parâmetros da atividade geral; 3) redução do comportamento de brincar. Na idade adulta verificou-se: 1) redução na interação social e nos níveis de dopamina estriatal e seus metabólitos; 2) não foram observadas alterações na catatonia induzida por

haloperidol, no comportamento estereotipado induzido por apomorfina, na morfologia cerebral, nos níveis de neurotransmissores e metabólitos hipotalâmicos e do córtex frontal, bem como de noradrenalina e serotonina estriatais. Estes dados mostraram que a infecção materna pode interferir no ambiente intra-uterino, comprometendo a viabilidade da ninhada, prejudicando o comportamento social da prole por toda a vida, interferindo também com a atividade do sistema dopaminérgico estriatal. Em vista desses resultados, sugeriu-se que essas alterações não comprometeram o sistema motor da prole, mas sim a emocionalidade e a motivação.

Palavras-chave: LPS. Pré-natal. Desenvolvimento. Comportamento animal. Neuroquímica. Neuroanatomia.

ABSTRACT

KIRSTEN, TB. **Behavioral and neurochemical evaluation of male offspring rats prenatally exposed to lipopolysaccharide.** [Avaliação comportamental e neuroquímica da prole masculina de ratas exposta pré-natalmente ao lipopolissacarídeo]. 2008. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Pre- or perinatal events that influence the immune system contribute to the development of behavioral or neuropsychiatric disorders, including schizophrenia and autism. This study investigated the relationships between lipopolysaccharide (LPS) -induced maternal sickness behavior during pregnancy and offspring development, behavior, neurochemistry, and neuroanatomy. Pregnant Wistar rats received LPS (100 µg / kg, i.p.) at the gestation day 9.5. Dam's sickness behavior was analyzed and at birth, the offspring number and weight were taken. The physical and behavioral development, general activity, play behavior, striatal, hypothalamus and frontal cortex monoamine levels, cerebral morphology, adult's social interaction, catalepsy and stereotypy were evaluated in male pups. Results showed that in relation to the control groups LPS treated dams presented a decreased open-field behavior, in food intake and weight gain, but no maternal fever was observed. In offspring: 1) the pups number and self-grooming were reduced and no alterations on physical patterns, behavioral development and exploratory activity were found; 2) striatal dopamine and metabolites levels were smaller in these animal, without differences in noradrenaline and serotonin levels and turnover; 3) play behavior and adult's social interaction parameters were reduced; no alterations on cerebral morphology, catalepsy and stereotypy were observed. It was suggested that these animals presented emotional and motivational deficits, but no motor alterations.

Key words: LPS. Prenatal. Development. Behavior. Neurochemistry. Neuroanatomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	LPS da parede celular de bactérias gram-negativas (adaptado de BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).....	25
Figura 2 -	Mecanismo de ação do LPS em um macrófago.....	26
Figura 3 -	Lavado vaginal positivo de ratas contendo espermatozóides, observado ao microscópio óptico em aumento de (A) 20 x e (B) 40 x.....	39
Figura 4 -	Arena de campo aberto utilizada para a observação da atividade geral individual das ratas gestantes por uma sessão de 5 minutos.....	41
Figura 5 -	Rato no PND 10, quando é possível observar (A) olho ainda fechado, (B) pêlos já nascidos e (C) orelha já desdobrada.....	44
Figura 6 -	Plataforma com inclinação de 45° para a observação da geotaxia negativa do filhote.....	44
Figura 7 -	Arena de campo aberto utilizada para a observação da atividade geral individual dos filhotes no PND 21 por uma sessão de 5 minutos. A arena foi subdividida virtualmente pelo sistema computadorizado EthoVision®.....	46
Figura 8 -	Sistema de observação computadorizada EthoVision®. A: arena de campo aberto. B: sistema computadorizado para análise e interpretação dos dados. C: câmera para captação das imagens. O mesmo programa rastreia e analisa o comportamento animal.....	47
Figura 9 -	Representação das subdivisões virtuais feitas na arena de campo aberto pelo programa EthoVision®: Periférica e Central.....	48
Figura 10 -	Ilustração dos pareamentos dos animais realizadas no PND 30 e PND 31: agrupado controle (AC) com isolado tratado (IT), e agrupado tratado (AT) com isolado controle (IC).....	50
Figura 11 -	Ilustração do <i>pinning</i> , ou comportamento de brincar propriamente dito, realizado entre dois filhotes jovens.....	51
Figura 12 -	Cromatograma obtido após a injeção de uma solução padrão de DA, DOPAC, HVA, 5HIAA, 5HT e NOR no HPLC, segundo as condições cromatográficas descritas no texto.....	54

Figura 13 -	Aparelho utilizado para avaliação da catatonia experimental, composta por (A) um bastão posicionado a 11 cm da bancada. (B) O rato manteve a mesma posição a qual foi colocado, demonstrando estar catatônico.....	58
Figura 14 -	Gaiola utilizada para a observação da estereotipia experimental, avaliada através de escores.....	59
Figura 15 -	Delineamento dos experimentos realizados, desde a determinação do dia zero de gestação da rata através do lavado vaginal, passando pelo tratamento com LPS ou salina no GD 9,5, avaliação do comportamento doentio e o nascimento da prole. A prole é padronizada e tem seus parâmetros de desenvolvimento físico e reflexológico avaliados, seguindo pelo desmame e separação dos grupos, passagem pelo campo aberto, observação do comportamento de brincar, avaliação neuroquímica, neuroanatômica, da interação social e da catatonia e estereotipia experimentais.....	61
Figura 16 -	Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na atividade geral de ratas gestantes, avaliada em campo aberto. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, comparado com o grupo controle (Teste t de Student). Os valores são representados como média $\pm$ S.E. $n=8$ para ambos os grupos.....	66
Figura 17 -	Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no (A) consumo alimentar após 24, 48 e 72 horas do tratamento; e na (B) temperatura corpórea após 1, 24 e 48 horas do tratamento das ratas gestantes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$, comparado com o grupo controle (Teste t de Student). Os valores são representados como média $\pm$ S.E. $n=8$ para ambos os grupos.....	68
Figura 18 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos parâmetros físicos e reflexológicos da prole masculina de ratas. DO: desdobramento de orelhas; PP: reflexo de preensão palmar; AP: aparecimento dos pêlos; GN: geotaxia negativa; ED: erupção dos dentes; AC: abertura do canal auditivo; AO: abertura dos olhos; AA: andar adulto. * $p < 0,05$ (teste t de Student) e # $p < 0,05$ (teste U de Mann-Whitney) comparado com o grupo controle. Os valores são representados como média $\pm$ S.E. $n=9$ para animais do grupo controle e $n=11$ para animais do grupo experimental.....	74
Figura 19 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na atividade geral observada em campo aberto da prole masculina de ratas. * $p < 0,05$ (teste t de Student) e # $p < 0,05$ (teste U de Mann-Whitney) comparado com o grupo controle. Os valores são representados como média $\pm$ S.E. $n=9$ para animais do grupo controle e $n=11$ para animais do grupo experimental.....	77

Figura 20 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no comportamento de brincar da prole masculina de ratas. Os valores são representados como média ± S.E. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes (ANOVA de três vias, $p<0,05$). n=10 para ambos os grupos.....	82
Figura 21 -	Efeitos da exposição pré-natal a (A) solução salina e (B) LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no cerebelo da prole masculina de ratas. (HE – escala em barra).....	88
Figura 22 -	Efeitos da exposição pré-natal a (A) solução salina e (B) LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no córtex frontal da prole masculina de ratas. (HE – escala em barra).....	89
Figura 23 -	Efeitos da exposição pré-natal a (A) solução salina e (B) LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no plexo coróide da prole masculina de ratas. (HE – escala em barra).....	90
Figura 24 -	Efeitos da exposição pré-natal a (A) solução salina e (B) LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos vasos sanguíneos cerebrais da prole masculina de ratas. (HE – escala em barra).....	91
Figura 25 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na interação social na idade adulta da prole masculina isolada de ratas. Pa: passar sobre/sob o outro; Mo: montar no parceiro; Fa: farejar o parceiro; Pe: perseguir o parceiro; Lo: locomoção. * $p<0,05$, comparado com o grupo controle (Teste <i>t</i> de Student). Os valores são representados como média ± S.E. n=7 para ambos os grupo.....	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Escores comportamentais propostos por Setler, Sarau e McKenzie (1976), para a avaliação da estereotipia induzida (por apomorfina) na prole masculina tratada ou não pré-natalmente com LPS.....	60
------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na atividade geral de ratas gestantes, avaliada em campo aberto. Os valores são representados como média ± S.E. n=8 para ambos os grupos.....	65
Tabela 2 -	Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no consumo alimentar 24, 48 e 72 horas após o tratamento e na temperatura corpórea após 1, 24 e 48 horas do tratamento das ratas gestantes. Os valores são representados como média ± S.E. n=8 para ambos os grupos.....	67
Tabela 3 -	Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) em ratas gestantes no ganho de peso durante a gestação, na duração da gestação e no número e peso total de filhotes. Os valores são representados como média ± S.E. n=9 para animais do grupo controle e n=11 para animais do grupo experimental.....	70
Tabela 4 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos pesos corporais individuais (g) da prole masculina de ratas, tomadas no PND 2, PND 21 e PND 60. Os valores são representados como média ± S.E. n=9 para animais do grupo controle e n=11 para animais do grupo experimental.....	72
Tabela 5 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos parâmetros físicos e reflexológicos da prole masculina de ratas (valores referentes aos dias de aparecimento ou desaparecimento dos parâmetros). Os valores são representados como média ± S.E. n=9 para animais do grupo controle e n=11 para animais do grupo experimental.....	73
Tabela 6 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na atividade geral observada em campo aberto da prole masculina de ratas. Os valores são representados como média ± S.E. n=9 para animais do grupo controle e n=11 para animais do grupo experimental.....	76
Tabela 7 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no comportamento de brincar da prole masculina de ratas no PND 30. Os valores são representados como média ± S.E. n=10 para ambos os grupos.....	80
Tabela 8 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no comportamento de brincar da prole masculina de ratas no PND 31. Os valores são representados como média ± S.E. n=10 para ambos os grupos.....	81

Tabela 9 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no estriado da prole masculina de ratas. Os valores são representados como média ± S.E. n=7 para animais do grupo controle e n=9 para animais do grupo experimental.....	84
Tabela 10 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no hipotálamo da prole masculina de ratas. Os valores são representados como média ± S.E. n=7 para animais do grupo controle e n=9 para animais do grupo experimental.....	85
Tabela 11 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no córtex frontal da prole masculina de ratas. Os valores são representados como média ± S.E. n=7 para animais do grupo controle e n=9 para animais do grupo experimental.....	86
Tabela 12 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na interação social na idade adulta da prole masculina isolada de ratas. Os valores são representados como média ± S.E. n=7 para ambos os grupo.....	93
Tabela 13 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na catatonia induzida por 2,5 mg/kg de haloperidol na prole masculina de ratas observada na idade adulta. Os valores são representados como frequência de ocorrência de catatonia e correspondente porcentagem. n=11 para ambos os grupos.....	96
Tabela 14 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na estereotipia induzida por 0,6 mg/kg de apomorfina da prole masculina de ratas observada na idade adulta. Os valores são representados como média ± S.E. n=8 para ambos os grupos.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{125}I -LPS	lipopolissacarídeo radioativo
5-HT	hidrocloridrato de serotonina
5HIAA	ácido 5-hidroxitindolacético
AC	agrupados controles
AT	agrupados tratados
ClHO_4	ácido perclórico
DA	hidrocloridrato de dopamina
DHBA	ácido 3,4-dihidroxibenzilamina
DOPAC	ácido 3,4-dihidroxifenilacético
EDTA	ácido dissódico etilenodiaminotetracético
FMVZ – USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
GABA	ácido gama-aminobutírico
GD	dia de gestação
H_3PO_4	ácido ortofosfórico
HE	hematoxilina-eosina
HPA	hipotálamo-pituitária-adrenal
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HSA	ácido heptanossulfônico
HVA	ácido homovanílico
IC	isolados controles
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6

IT	isolados tratados
LBP	<i>lipopolysaccharide binding protein</i>
LPS	lipopolissacarídeo
Na ₂ S ₂ O ₅	metabissulfito de sódio
NaCl	cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	fosfato de sódio dibásico
NOR	noradrenalina
PND	dia de vida pós natal
SNC	sistema nervoso central
TLR4	receptores <i>toll-like</i> 4
TNF- α	fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
1.1 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS).....	24
1.2 MECANISMO DE AÇÃO DO LPS.....	26
1.3 CITOCINAS.....	28
1.4 COMPORTAMENTO DOENTIO.....	29
1.5 ESTUDOS PRÉ-NATAIS.....	30
1.6 DESORDENS NEUROPSIQUIÁTRICAS ASSOCIADAS A INFECÇÕES MATERNAS.....	31
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 ANIMAIS.....	38
3.2 ACASALAMENTO	38
3.3 DROGAS E SOLUÇÕES	39
3.4 TRATAMENTO	39
3.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOENTIO DAS RATAS TRATADAS OU NÃO COM LPS DURANTE A GESTAÇÃO.....	40
3.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DAS RATAS TRATADAS OU NÃO COM LPS DURANTE A GESTAÇÃO.....	41
3.7 PADRONIZAÇÃO DA NINHADA.....	42
3.8 AVALIAÇÃO DOS PADRÕES FÍSICOS E REFLEXOLÓGICOS DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS.....	42
3.9 DESMAME E SEPARAÇÃO EM GRUPOS.....	45
3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS.....	45
3.10.1 Sistema de observação computadorizada – ethovision®.....	46
3.11 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE BRINCAR DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS.....	49
3.12 DOSAGEM DE NEUROTRANSMISSORES DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS.....	52
3.12.1 Coleta dos tecidos e preparo das amostras.....	52
3.12.2 Aparelho.....	53
3.12.3 Preparo das soluções.....	53

3.12.4 Calibração.....	55
3.12.5 Cálculo das concentrações dos neurotransmissores e seus metabólitos.....	55
3.13 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CÉREBRO DA PROLE MASCULINA NA IDADE ADULTA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS.....	56
3.14 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO SOCIAL DA PROLE MASCULINA NA IDADE ADULTA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS.....	57
3.15 AVALIAÇÃO DA CATATONIA INDUZIDA POR HALOPERIDOL NA PROLE MASCULINA NA IDADE ADULTA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS.....	57
3.16 AVALIAÇÃO DA ESTEREOTIPIA INDUZIDA POR APOMORFINA NA PROLE MASCULINA NA IDADE ADULTA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS.....	59
3.17 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	60
3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
4 RESULTADOS	64
4.1 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOENTIO DAS RATAS TRATADAS OU NÃO COM LPS DURANTE A GESTAÇÃO.....	64
4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DAS RATAS TRATADAS OU NÃO COM LPS DURANTE A GESTAÇÃO.....	69
4.3 AVALIAÇÃO DOS PADRÕES FÍSICOS E REFLEXOLÓGICOS DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS.....	71
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS.....	75
4.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE BRINCAR DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS.....	78
4.6 DOSAGEM DE NEUROTRANSMISSORES DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS.....	83
4.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CÉREBRO DA PROLE MASCULINA NA IDADE ADULTA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS.....	87
4.8 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO SOCIAL DA PROLE MASCULINA NA IDADE ADULTA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS.....	92
4.9 AVALIAÇÃO DA CATATONIA INDUZIDA POR HALOPERIDOL NA PROLE MASCULINA NA IDADE ADULTA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS.....	95

4.10 AVALIAÇÃO DA ESTEREOTIPIA INDUZIDA POR APOMORFINA NA PROLE MASCULINA NA IDADE ADULTA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ- NATALMENTE AO LPS.....	97
5 DISCUSSÃO.....	100
6 CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS.....	113

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

O lipopolissacarídeo (LPS) é um constituinte pertencente às paredes celulares de bactérias gram-negativas. Consiste num lipídio complexo, denominado lipídio A, ao qual está ligado um polissacarídeo constituído de um núcleo (ou *core*) e de uma série terminal de unidades repetidas (Figura 1). O lipídio A consiste em unidades dissacarídicas de glicosamina fosforilada às quais estão ligados a vários ácidos graxos de cadeia longa (podendo variar de acordo com a espécie bacteriana). O núcleo do polissacarídeo é semelhante em todas as espécies gram-negativas que possuem LPS, todavia, cada espécie contém uma unidade de repetição particular. Em geral, as unidades de repetição consistem em trissacarídeos lineares ou em tetra ou pentassacarídeos ramificados (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

As moléculas de LPS de carga negativa são ligadas de forma não covalente por cátions divalentes, tornando a membrana estabilizada e proporcionando uma barreira contra moléculas hidrofóbicas (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000). As substâncias são termoestáveis, com peso molecular entre 3000 e vários milhões (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1998).

O LPS é extremamente tóxico para animais, apresentando efeito em concentrações menores que 1 nM (ADEREM; ULEVITCH, 2000) é também denominado endotoxina das bactérias gram-negativas, estando ligado à superfície celular, liberado apenas quando as células são lisadas. Quando o LPS é clivado em lipídio A e em polissacarídeo, toda a toxicidade (interação imune) está associada ao lipídio A. A especificidade antigênica é conferida pelas unidades terminais de repetição, que circundam a célula, formando uma camada de polissacarídeos hidrofílicos (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

O LPS liga-se à membrana externa por pontes hidrofóbicas. É sintetizado na membrana citoplasmática e transportado para sua posição exterior final. A presença do LPS é necessária para a função de muitas proteínas da membrana externa (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

Dentro da área médica e veterinária o LPS é muito utilizado nas mais diferentes linhas de pesquisa, inclusive testados em animais laboratoriais como roedores. Comercialmente, para

estudos toxicológicos, neuroimunológicos, dentre outros, uma das principais fontes do LPS é a partir da bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, através de um processo de extração fenólica (MIMS et al., 1999).

Figura 1 - LPS da parede celular de bactérias gram-negativas (adaptado de BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000)

Os seres humanos são constantemente expostos à pequenas doses de LPS em infecções, sendo que problemas intestinais e ingestão de álcool comumente aumentam a permeabilidade ao LPS do trato gastrointestinal para o sangue (XU et al., 2006).

1.2 MECANISMO DE AÇÃO DO LPS

Uma vez que o LPS entra em contato com o organismo animal, seja a partir de uma bactéria gram-negativa como a *Escherichia coli*, ou pela administração direta do LPS, inicia-se uma série de respostas no organismo infectado. Esta endotoxina pode atuar em células como os monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas e células endoteliais, e, principalmente em macrófagos (SALUK-JUSZCZAK; WACHOWICZ, 2005).

Para Fenton e Golenbock (1998), Aderem e Ulevitch (2000) e Miyake (2003) o mecanismo de ação se inicia com o LPS ligando-se a proteínas ligantes do hospedeiro, os LBPs (ou *lipopolysaccharide binding protein*), produzidas no fígado do animal. A partir deste passo, é formado um complexo chamado de LPS-LBP. O complexo entra em contato com o receptor CD14 dos macrófagos, iniciando a ativação celular. A figura 2 ilustra o mecanismo de ação do LPS no macrófago.

Figura 2 - Mecanismo de ação do LPS em um macrófago

Neste momento passam a atuar os receptores TLR4 (receptores *toll-like* 4), que, com auxílio de outras estruturas, como as proteínas MD-2, iniciam a geração do sinal transmembranar. Dentro do macrófago ocorre uma série de reações em cascata, incluindo a atuação de MyD88, IRAK, TRAF6, TAK-1, quinase I κ B, AP-1, dentre outras (ainda não elucidadas), até a ativação do fator NF- κ B, que viaja do citoplasma para o núcleo da célula, estimulando a expressão de genes responsáveis pela síntese de citocinas pró-inflamatórias (ADEREM; ULEVITCH, 2000; HARJU et al., 2005; ROMERO et al., 2007).

Entre as citocinas pró-inflamatórias ativadas e liberadas a partir do contato com o LPS, destaca-se o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), além de algumas outras (HAVA et al., 2006).

Devido à liberação de citocinas, o LPS é usado já há muitos anos como ativador de resposta imune, principalmente da resposta imune inata (inespecífica) com a participação dos macrófagos. Mais a longo prazo atuam também na resposta imune adquirida (ou adaptativa), referente a respostas de linfócitos que reconhecem antígenos microbianos específicos (com atuação dos TLR4, na ativação de membros da família B7, que ativam células T *naïve*) (ADEREM; ULEVITCH, 2000; LEVITON; DAMMANN; DURUM, 2005).

Uma vez liberadas, as citocinas vão atuar no sistema nervoso central (SNC) do animal, onde interferem com sua homeostasia. As vias pelas quais as citocinas atingem o SNC são:

1) Através do nervo vago (que é a principal via aferente da cavidade abdominal para o cérebro). As citocinas liberadas podem entrar em contato com terminações de ramificações vagais, as quais possuem receptores para citocinas. A ativação desses receptores inicia a transmissão de um impulso nervoso através do nervo vago aferente até sua ligação no encéfalo (no núcleo vagal). Isso provoca alterações de neurotransmissores, dentre outros efeitos. Para provar a importância desta via, Dantzer et al. (1998) realizaram um experimento com vagotomia em roedores, e posterior injeção i.p. de IL-1. Os resultados mostraram a ausência de comportamento doentio nestes animais, indicando que o nervo vago é fundamental para a atuação das citocinas no cérebro.

2) Outra via envolve os órgãos circunventriculares. As citocinas liberadas chegam até a circulação sanguínea e assim até o encéfalo do animal. As citocinas, apesar de serem proteínas pequenas, não conseguem passar através da barreira hematoencefálica. Para adentrar o cérebro, elas acessam os órgãos circunventriculares, regiões que apresentam ausência da barreira hematoencefálica. É possível verificar a importância desta via com a dosagem de certas citocinas pró-inflamatórias em regiões como a área postrema, eminência mediana e

órgão vascular da lâmina terminal, nos quais são observados valores elevados de citocinas em relação a outras áreas do cérebro (DUNN, 2006).

3) Atuam ainda a partir do contato com células endoteliais do organismo. Essas células possuem receptores para citocinas que, uma vez ativados, iniciam uma resposta no organismo levando a produção de eicosanóides (mediadores inflamatórios de origem lipídica), como as prostaglandinas. Esses eicosanóides têm propriedades físico-químicas que os possibilitam, via corrente sanguínea, acessar o cérebro, através da barreira hematoencefálica, podendo induzir processos patofisiológicos. Para mostrar a relevância desta via, trabalhos utilizam alguns inibidores de eicosanóides, como inibidores da enzima COX-2, a qual ativaria a produção de prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e outros mediadores lipídicos. Assim, esses inibidores impedem a produção dos mediadores, suprimindo o comportamento doente (CALDER, 2004; SALUK-JUSZCZAK; WACHOWICZ, 2005; DUNN, 2006; XU et al., 2006).

4) Outras vias também podem contribuir para a atuação das citocinas no cérebro. Estas poderiam cruzar a barreira hematoencefálica usando sistemas de captura específicos, porém, o próprio Dunn (2006) considera a capacidade desses sistemas relativamente baixa.

Acredita-se que seja mais provável que esses distintos mecanismos atuem simultaneamente, de forma integrada, quando da liberação de citocinas (DUNN, 2006).

Finalmente, aventa-se que a micróglia em contato com as citocinas liberadas pelo LPS potencializariam seus efeitos, estimulando a produção de novas citocinas no próprio cérebro. Neste sentido a micróglia é considerada um análogo dos macrófagos e “órgão imune” do cérebro, com função de combater infecções e inflamações. Seriam então células residentes do SNC que liberariam endogenamente citocinas (LENT, 2001; MEYER et al., 2005; HAVA et al., 2006; XU et al., 2006).

1.3 CITOCINAS

Normalmente, as citocinas atuam no organismo a fim de combater diversos patógenos. No sistema imune elas reconhecem partículas invasoras, bem como participam de respostas adaptativas ou reações homeostáticas (AVITSUR; YIRMIYA, 1999; ADEREM; ULEVITCH, 2000).

No SNC as citocinas influenciam neurotransmissores centrais como dopamina, serotonina, noradrenalina, GABA (ácido gama-aminobutírico), acetilcolina, neuropeptídeos, dentre outros. Atuam na diferenciação e crescimento neuronal, na migração dos neurônios para seus alvos e na modificação da plasticidade sináptica (DANTZER, 2005; DUNN, 2006; HAVA et al., 2006). Elas podem também ativar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) com a liberação do fator liberador de corticotrofina do hipotálamo, que secreta o hormônio adrenocorticotrófico da glândula pituitária, resultando em aumento de glicocorticóides na corrente sanguínea periférica. Podem inibir o eixo hipotálamo-pituitária-gonadal, por reduzir a secreção de hormônios sexuais (hormônio gonadotrófico, hormônio luterizante, hormônio folículo estimulante e esteróides ovarianos), interferindo na modulação do comportamento reprodutivo (AVITSUR; POLLAK; YIRMIYA, 1997; MEYER et al., 2005).

As citocinas agem no organismo animal produzindo uma série de sintomas que se enquadram e podem ser definidos como comportamento doentio, comentado a seguir (AVITSUR; YIRMIYA, 1999).

1.4 COMPORTAMENTO DOENTIO

O comportamento doentio é ativado quando o organismo sofre um ferimento ou um processo infeccioso, inclusive através do contato com o LPS. Pode interferir em diversas esferas (psicológicas, neuroendócrinas e comportamentais), ocorrendo nos mais diversos animais. Corresponde a uma sintomatologia bastante variada, que inclui uma ou várias das seguintes respostas: febre, diminuição da atividade exploratória, do comportamento social, da ingestão de alimentos, do comportamento sexual, induz anedonia, prejudica funções de aprendizado e memória, anorexia, sonolência, dentre outros (AVITSUR; POLLAK; YIRMIYA, 1997; LARSON; DUNN, 2001).

Não é uma resposta negativa do organismo, mas sim uma estratégia comportamental adaptativa, visando o combate ao microrganismo invasor e a cura rápida. O organismo animal, dentre outras adaptações, procura poupar energia (para utilizá-la no metabolismo contra a infecção), além de evitar o contato com outros da espécie, que poderiam se infectar. Uma vez que se apresenta debilitado à redução na busca de alimentos, diminui a chance do mesmo ser predado. Com isso, o comportamento doentio claramente demonstra que o sistema

imune modula a atividade do sistema nervoso (HART, 1988; KENT et al., 1992; PAVLOV; TRACEY, 2004; PERRY, 2004; DANTZER; KELLEY, 2007).

Muitos fatores imunes são liberados e participam no sentido de remover o patógeno invasor, agindo localmente além de orquestrar uma complexa difusão de alterações através de todo o organismo (AVITSUR; YIRMIYA, 1999).

O problema ocorre quando existe liberação excessiva de mediadores pró-inflamatórios, que desencadeiam respostas exacerbadas, tornando-se prejudiciais, levando a inflamação sistêmica, associada com o desenvolvimento de sérias complicações patológicas, podendo até mesmo levar a morte do indivíduo (PAVLOV; TRACEY, 2004).

O comportamento doentio não só é desencadeado a partir do contato com LPS, mas também por diversos outros organismos como *Porphyromonas gingivalis* (uma bactéria gram-negativa), *Mycoplasma fermentans* (uma bactéria gram-positiva), vírus Influenza, vírus Borna, vírus Herpes, etc (COLLINS et al., 1994; YIRMIYA et al., 1999; ENGEL et al., 2000; PLETNIKOV et al., 2002; SHI et al., 2003).

1.5 ESTUDOS PRÉ-NATAIS

Já está bastante estabelecido que processos inflamatórios e infecções bacterianas ou virais em gestantes levam à interferências no ambiente fetal, resultando em diversos danos a prole.

Essas infecções e inflamações durante a gestação, inclusive com o LPS, podem causar: inibição da implantação do blastócito em estágios iniciais da gestação, partos prematuros, necrose placentária, aborto espontâneo (reabsorção embrionária), natimortos, restrição de crescimento intra-uterino, danos nos órgãos fetais como no sistema hematopoiético, adrenais, coração, cérebro, pulmões, pele e possivelmente outros, retardo no desenvolvimento do esqueleto, retardo mental, desordens neuropsiquiátricas tais como depressão, esquizofrenia e autismo, dentre outros (COLLINS et al., 1994; DANTZER, 2005; HARJU et al., 2005; BROWN, 2006; GOLAN et al., 2006; HAVA et al., 2006; WANG et al., 2006; XU et al., 2006; FORTIER; LUHESHI; BOKSA, 2007; ROMERO et al., 2007).

O LPS *per se* não é capaz de chegar até o feto. Para mostrar isso, Ashdown et al. (2006) administraram LPS radioativo (^{125}I -LPS) em ratas prenhes, detectando tais elementos no sangue, fígado, rins e placenta desses animais em um período de 1-8h, porém no cérebro

nada significativo foi encontrado. Além disso, o LPS também não chegou ao feto. Por outro lado, observou-se a indução de citocinas em um período de 2-8h no plasma materno. Este fato somado à presença de LPS na placenta, sugere que o LPS age diretamente nas células placentárias para induzir a expressão de mediadores inflamatórios. Algumas citocinas foram encontradas com valores elevados no plasma fetal, mostrando que alterações na prole não são produzidas diretamente pela endotoxina, pois o LPS não sofre passagem transplacentária, mas indiretamente, provavelmente em função das citocinas.

As citocinas mais uma vez parecem ser as principais coadjuvantes das interferências, neste caso, interferências à prole. Já foram encontrados níveis elevados de citocinas na placenta, no fluído amniótico, no sangue fetal, e no cérebro fetal, bem como a ocorrência de inflamação de membranas fetais, após infecções e inflamações maternas. Já se sabe inclusive da existência de TLRs na placenta e em membranas fetais (AVITSUR; POLLAK; YIRMIYA, 1997; URAKUBO et al., 2001; GAYLE et al., 2004; HARJU et al., 2005; XU et al., 2006; SMITH et al., 2007).

Estudos com administração de vários tipos de citocinas demonstram problemas gestacionais similares àqueles da administração do LPS (ROMERO et al., 2007). Os trabalhos envolvendo a gestação e citocinas são algumas vezes contraditórios. Aparentemente, para alguns autores, as citocinas podem atravessar a barreira placentária, porém em cultura, pouca quantidade de citocinas parece ser capaz de atravessar âmnio, córion e decíduas intactas. Ainda não se sabe exatamente como as citocinas chegam até o feto. O mais provável é que novas citocinas sejam produzidas pelo próprio feto, quer seja a partir de algumas citocinas que conseguiram chegar até o feto, quer seja por algum outro processo de sinalização (URAKUBO et al., 2001; LEVITON; DAMMANN; DURUM, 2005; MEYER et al., 2005). A partir daí as citocinas no ambiente fetal vão interferir na homeostasia do indivíduo, chegando até seus cérebros e afetando seu desenvolvimento *in útero*, de forma que esses indivíduos podem ser prejudicados inclusive a longo prazo, por toda a sua vida (ASHDOWN et al., 2006).

1.6 DESORDENS NEUROPSIQUIÁTRICAS ASSOCIADAS A INFECÇÕES MATERNAS

Como já citado, processos inflamatórios e infecções bacterianas ou virais em gestantes levam à interferências no ambiente fetal, podendo resultar em diversos danos à prole.

Atualmente, uma série de evidências sugere que além de fatores genéticos, o ambiente pode ter participação na incidência de doenças mentais. A infecção materna perinatal é considerada fator de risco para algumas doenças psiquiátricas do desenvolvimento, como a esquizofrenia e o autismo.

Nascimentos de crianças no inverno ou em meses frios são aceitos como fatores de risco para a esquizofrenia. Esse fenômeno ocorre em função da associação com a prevalência ao vírus influenza e conseqüente elevação de citocinas no organismo. Infecções maternas também levam ao autismo. A resposta imune materna e não a infecção que causam esses danos na prole (SMITH et al., 2007).

Da mesma forma, Meyer et al. (2005) propõem que distúrbios precoces no desenvolvimento do cérebro implicariam a incidência de doenças psiquiátricas como o autismo, esquizofrenia e retardo mental. Estudos epidemiológicos indicam que o risco aumenta com infecção materna pré-natal possivelmente em conseqüência de eventos relacionados às ações de citocinas liberadas no processo inflamatório. Estes autores comentam ainda que os períodos críticos em que a infecção materna poderia interferir com o desenvolvimento cerebral do feto seriam da metade ao terço final da gestação.

Shi et al. (2003) administraram o vírus influenza humano em camundongos fêmeas no 9,5º dia de gestação (GD) e analisaram posteriormente suas ninhadas. Os filhotes apresentaram redução na interação social e hiperansiedade. Inicialmente, propôs-se que seria uma ação direta do vírus no cérebro. No entanto, não foi encontrado qualquer vestígio de RNA viral no cérebro dos roedores. Propôs-se então que as citocinas seriam responsáveis pelas modificações comportamentais. Esse estudo, assim como diversos outros permitem a extrapolação para o ser humano e mostram que danos comportamentais permanentes podem ser causados não só por problemas genéticos, drogas ingeridas durante a gestação e etc., mas também por uma infecção viral ou bacteriana, como uma gripe mais forte, que tantas mulheres grávidas são expostas constantemente.

Recentemente, Fortier, Luheshi e Boksa (2007) observaram que o LPS é o agente mais efetivo na inibição da amplitude de resposta a um estímulo sonoro de sua prole na idade adulta. Este modelo comportamental revelaria as deficiências nas informações sensoriais que ocorrem na esquizofrenia.

Chez et al. (2007) mostraram em um pequeno número de pacientes autistas, que ocorria aumento dos níveis de TNF- α no soro e líquido cerebrospinal, sugerindo que mecanismos inflamatórios poderiam contribuir para a ocorrência de autismo.

O mal de Alzheimer também pode estar associado ao nível elevado de citocinas pró-inflamatórias no cérebro, em modelos animais desta doença, a partir da ativação da micróglia que aumenta a expressão de MHC classe II, as quais, por sua vez, aumentam os níveis de citocinas (PERRY, 2004).

Brown (2006) explica que além destas desordens neuropsiquiátricas, as infecções maternas podem representar um fator de risco para a doença de Parkinson.

Foi objetivo neste trabalho entender os efeitos da infecção ou inflamação materna, por meio da administração de uma endotoxina bacteriana, na sua prole, tanto na esfera comportamental, como neuroquímica e neuroanatômica. Neste sentido, sabe-se que mulheres constantemente adoecem na gravidez, e nem sempre é dada a devida importância para esse acontecimento, pois desordens neuropsiquiátricas normalmente são associadas apenas a predisposições genéticas, consumo de drogas de abuso ou medicamentos de forma errônea.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O trabalho estudou os efeitos comportamentais, neuroquímicos e neuroanatômicos da administração pré-natal de LPS em ratas gestantes e na sua prole masculina.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar os efeitos do tratamento com LPS em ratas prenhes por meio da observação do comportamento doentio (atividade geral, ingestão de alimentos e temperatura corpórea).
- Estudar os efeitos do tratamento com LPS em parâmetros reprodutivos nas ratas prenhes.
- Estudar os efeitos da administração pré-natal de LPS no desenvolvimento físico e reflexológico da prole masculina.
- Estudar os efeitos da administração pré-natal de LPS sobre a atividade geral da prole masculina.
- Estudar os efeitos da administração pré-natal de LPS sobre o comportamento de brincar da prole masculina.
- Estudar os efeitos da administração pré-natal de LPS sobre os níveis de neurotransmissores e de seus metabólitos no estriado, hipotálamo e córtex frontal da prole masculina.
- Estudar os efeitos da administração pré-natal de LPS sobre a morfologia do encéfalo da prole masculina.

- Estudar os efeitos da administração pré-natal de LPS sobre a interação social da prole masculina na idade adulta.
- Estudar os efeitos da administração pré-natal de LPS sobre a catatonia induzida na prole masculina.
- Estudar os efeitos da administração pré-natal de LPS sobre a estereotipia induzida na prole masculina.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Utilizaram-se ratas Wistar, virgens e adultas (90 dias de vida aproximadamente), pesando de 216 a 263 gramas, que foram acasaladas com machos experientes da mesma linhagem. Esses animais, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ – USP, permaneceram em gaiolas de polipropileno, medindo 38 x 32 x 16 cm, forradas com maravalha. Essas gaiolas moradia foram mantidas em sala com aeração, exaustão, umidade entre 45% e 65% e temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ controlados por meio de um aparelho de ar condicionado central, um ciclo claro/escuro de 12 horas (início da luz às 6:00 horas), controlado automaticamente, bem como acesso a água e ração *ad libitum*. Os animais foram utilizados de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório da FMVZ – USP (Protocolo nº 925/2006).

3.2 ACASALAMENTO

Para o acasalamento, as fêmeas foram introduzidas ao final do período de luz (17:00 – 18:00 horas), nas gaiolas dos machos, sempre 2 fêmeas por macho.

A 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 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 (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002) procurando por espermatozóides junto ao material biológico da fêmea. Se constatado a presença de espermatozóides (Figura 3), considerou-se como GD 0 daquela fêmea (LEITE et al., 2002). Esses animais foram então separados aleatoriamente como pertencentes ao grupo controle e experimental, acondicionadas individualmente em gaiolas moradia, e ali permaneceram durante toda a

gestação, tratamento, nascimento da prole, até o desmame de seus filhotes, que foi feito no 21º dia de vida pós natal (PND) desses animais.

Figura 3 - Lavado vaginal positivo de ratas contendo espermatozóides, observado ao microscópio óptico em aumento de (A) 20 x e (B) 40 x

3.3 DROGAS E SOLUÇÕES

LPS: lipopolissacarídeo obtido por extração fenólica a partir de *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8 (Sigma®).

Solução salina: solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) estéril a 0,9%.

Solução de LPS: solução na concentração de 50 µg / ml de LPS em solução aquosa de NaCl estéril a 0,9%.

3.4 TRATAMENTO

No GD 9,5 das ratas, foi administrada para o grupo experimental a solução de LPS, via intraperitoneal (i.p.), numa dose de 100 µg / kg. Para os animais do grupo controle

administrou-se 100 µg / kg i.p. de solução salina. Esta etapa do trabalho foi realizada sempre no período da tarde, mais precisamente das 15:00 às 17:00 horas.

Essa dose foi escolhida, pois foi mostrado que ela induz alterações comportamentais e endócrinas, além de aumentar os níveis de citocinas na placenta (WANG et al., 2006; SPENCER et al., 2007). O GD 9,5 foi usado, pois coincide, em ratos, com o período de organogênese cerebral, especificamente com a formação da placa neural (BERNARDI, 2006; DESESSO, 2006).

3.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOENTIO DAS RATAS TRATADAS OU NÃO COM LPS DURANTE A GESTAÇÃO

O comportamento doentio materno foi analisado em fêmeas gestantes tratadas com LPS ou solução controle no GD 9,5 (n=8 para ambos os grupos). Uma hora após o tratamento, a atividade geral das gestantes foi observada em uma arena campo aberto. O aparelho utilizado foi similar ao descrito por Broadhurst (1960), consistindo de uma arena redonda de madeira (90 cm de diâmetro, 28 cm altura da parede) pintada de cinza claro, subdividida em 25 partes (Figura 4). Esta arena ficava no interior de uma pequena sala isolada do observador, com luz difusa e sem qualquer ruído, contendo uma filmadora instalada no teto (a 100 cm da arena), de modo que o observador assistia os comportamentos das ratas por meio de um monitor (fora da sala). Contadores manuais e cronômetros foram empregados para estabelecer os escores destes comportamentos.

Para a observação, cada gestante foi individualmente e gentilmente colocada no centro do aparato, e os seguintes parâmetros foram mensurados por um período de 5 minutos:

Frequência de locomoção: número de unidades do chão adentradas com ambas as patas.

Frequência de levantar: número de vezes que o animal apresenta postura de permanecer apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, podendo ou não tocar com as patas anteriores as paredes do campo aberto.

Tempo de auto-limpeza: tempo em segundos do ato de lambar ou coçar os próprios pêlos: membros e / ou região genital).

Para minimizar a influência de possíveis mudanças circadianas nos comportamentos observados no campo aberto, os animais foram observados no mesmo período do dia em cada

sessão (14:00 – 16:00 horas). O aparelho era lavado com solução álcool / água 5 % antes da introdução do animal, a fim de eliminar possíveis efeitos a partir de traços de odor deixados por animais previamente colocados na arena.

O *consumo de alimento* também foi avaliado nestas ratas gestantes através da comparação dos pesos (g) da ração fornecida, 24, 48 e 72 horas após o tratamento com LPS ou solução salina no GD 9,5.

A *temperatura corpórea* também foi mensurada nestes animais 1, 24 e 48 horas após o tratamento com LPS ou solução controle no GD 9,5, através do uso de termômetro infravermelho (Techline® TS-201), colocado na orelha do animal.

Figura 4 - Arena de campo aberto utilizada para a observação da atividade geral individual das ratas gestantes por uma sessão de 5 minutos

3.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DAS RATAS TRATADAS OU NÃO COM LPS DURANTE A GESTAÇÃO

Foram cruzadas outras 49 ratas divididas em 22 do grupo controle e 27 do grupo experimental.

Para a avaliação dos parâmetros reprodutivos, foram observadas 9 ratas gestantes e suas respectivas ninhadas do grupo controle e 11 do grupo experimental. Os parâmetros foram avaliados entre as 8:00-10:00 horas:

Ganho de peso durante a gestação: a rata prenhe foi pesada (g) após o nascimento de sua prole (no PND 2), permitindo comparar o ganho de peso ocorrido durante a gestação, desde o tratamento, no GD 9,5, quando essas ratas já haviam sido pesadas.

Duração da gestação: todas as gestações foram acompanhadas a partir do seu início, no GD 0, até o dia em que os filhotes nasceram.

Número de filhotes nascidos: refere-se à quantidade de filhotes nascidos da rata prenhe, no segundo dia de vida dessa ninhada (PND 2).

Peso total da prole: no PND 2 da prole, todos os animais foram pesados conjuntamente.

3.7 PADRONIZAÇÃO DA NINHADA

O parto ocorreu naturalmente. No PND 1 nenhuma manipulação foi realizada (filhotes e progenitora), já que é fato conhecido que este é um período crítico de estresse para a mãe, que pode acarretar em rejeição e morte dos filhotes pela mãe. No PND 2 (8:00 – 9:00 horas), cada ninhada foi ajustada para 4 machos e 4 fêmeas, totalizando 8 animais / ninhada. A diferença entre os gêneros foi verificada através da diferença visual da distância anogenital, maior nos machos (HOLSON et al., 2006). Não foram realizados procedimentos de cruzamento de filhotes nas ninhadas (*cross-fostering*).

3.8 AVALIAÇÃO DOS PADRÕES FÍSICOS E REFLEXOLÓGICOS DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS

Os parâmetros utilizados para a avaliação do desenvolvimento físico e reflexológico da prole foram observados a partir do PND 2 e foram os mesmos propostos e definidos por Zbinden (1981), Norton (1989) e Schwarz et al. (2003). Para tanto, um macho de cada ninhada (Figura 5) (9 para o grupo controle e 11 para o grupo experimental) foi escolhido

aleatoriamente e tatuado (subcutaneamente) com nanquim (acrilex®), para diferenciação. Apenas o animal marcado foi manipulado nestes procedimentos, realizados diariamente até a verificação de cada parâmetro, no mesmo período do dia (8:00 - 10:00 horas). Os parâmetros observados foram:

Desdobramento das orelhas: este parâmetro é considerado positivo no dia em que as orelhas que estavam “coladas” (juntas) ao corpo se destacam, geralmente entre o PND 3 e 5.

Reflexo de preensão palmar: é o único parâmetro que desaparece ao longo do tempo, o animal nasce com ele; foi observado e anotado o dia em que ocorreu o término do reflexo de preensão palmar (ou reflexo de agarrar) a um objeto (barra lateral de clipe, no caso). Observado geralmente em torno do PND 6.

Aparecimento dos pêlos: este parâmetro é considerado positivo no dia em que os pêlos aparecem no corpo do animal, provavelmente entre o PND 5 e 8. Difere-se da penugem, que possui menor comprimento e espessura, aparecendo logo no PND 1 ou 2.

Geotaxia negativa: a verificação deste parâmetro é realizada colocando o filhote sobre uma plataforma com inclinação de 45° (Figura 6) e posicionando o mesmo com a cabeça voltada para a base. Considera-se como resposta positiva quando o tempo de latência para o animal dar meia volta (180°), ficando na posição oposta, for inferior ou igual a 30 segundos. Observado entre o PND 5 ao 12.

Erupção dos dentes: este parâmetro é considerado positivo quando se abre um pouco a boca do filhote e são observados os dentes incisivos, destacando-se da gengiva, sendo o período provável entre o PND 8 e 14.

Abertura do canal auditivo: é considerado positivo quando se visualiza um orifício no ouvido externo, que corresponde ao ducto auditivo, geralmente ocorrendo a partir do PND 11.

Abertura dos olhos: este parâmetro é considerado positivo no dia em que se observa uma fissura longitudinal nas pálpebras, ou seja, quando pelo menos um dos olhos se abre. Geralmente ocorre no PND 14.

Andar adulto: este parâmetro é considerado positivo a partir do momento que o animal passa a andar com as quatro patas, sem encostar o ventre na superfície. Ocorre geralmente entre o PND 13 e 15.

Peso corporal no PND 2, no PND 21 e no PND 60: pesagem (g) individual no segundo, vigésimo primeiro e sexagésimo dia de vida (pós-natal).

Figura 5 - Rato no PND 10, quando é possível observar (A) olho ainda fechado, (B) pêlos já nascidos e (C) orelha já desdobrada

Figura 6 - Plataforma com inclinação de 45° para a observação da geotaxia negativa do filhote

3.9 DESMAME E SEPARAÇÃO EM GRUPOS

No PND 21, as proles foram separadas de suas respectivas progenitoras, sendo então todas as fêmeas destinadas para outros experimentos conduzidos no laboratório. Os machos foram divididos, e os animais tatuados passaram imediatamente por uma sessão de campo aberto (descrito no item 3.10). Dois outros machos da ninhada foram mantidos numa gaiola até o PND 30, considerados como “agrupados”. O quarto e último macho foi mantido a partir desse dia até o PND 30 também numa gaiola, sozinho, como “isolado”. Um dos agrupados e o isolado foram utilizados para a avaliação do comportamento de brincar (descrito no item 4.11). Os machos agrupados que não foram utilizados no experimento do comportamento de brincar foram empregados para avaliações neuroquímicas e o outro animal agrupado (avaliado quanto ao comportamento de brincar), para a avaliação neuroanatômica. Outros machos, de outras ninhadas (11 de cada grupo), foram utilizados para os experimentos de interação social na idade adulta, catatonia e estereotipia experimentais. Sempre foi utilizado um animal por ninhada para cada experimento.

3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS

Um filhote de cada ninhada (9 para o grupo controle e 11 para o grupo experimental) foi observado no campo aberto, construído segundo Broadhurst (1960) e modificado por Faggin e Palermo-Neto (1985), para observação da atividade geral dos mesmos, no PND 21, sempre no período das 8:00 às 10:00 horas.

Este campo aberto era constituído de uma arena circular com 40 centímetros de diâmetro por 25,5 centímetros de altura, pintado em cinza escuro fosco (Figura 7) e subdividido virtualmente pelo sistema computadorizado EthoVision® (descrito no item 4.10.1). O animal foi colocado individualmente no centro da arena e observado por um período de 5 minutos, com o ambiente sempre previamente limpo com solução álcool / água 5 %, eliminando possíveis odores deixados por outros animais.

Os animais dos diferentes grupos foram observados intercalado-os entre si para evitar possíveis interferências do ritmo circadiano sobre os resultados.

Os parâmetros observados foram: Distância percorrida, Velocidade média, Número de entradas, Tempo na zona, Frequência de levantar, Frequência de auto-limpeza e Tempo de auto-limpeza descritos no item 4.10.1.

Figura 7 - Arena de campo aberto utilizada para a observação da atividade geral individual dos filhotes no PND 21 por uma sessão de 5 minutos. A arena foi subdividida virtualmente pelo sistema computadorizado EthoVision®

3.10.1 Sistema de observação computadorizada – EthoVision®

O EthoVision® é um sistema de rastreamento em vídeo, de análise de movimento e reconhecimento comportamental (NOLDUS, 1997).

O sistema de observação indireta é constituído por uma pequena sala isolada do observador, com iluminação difusa e sem qualquer ruído, contendo uma filmadora instalada no teto da sala de observação a 100 cm da arena, conectada a um monitor Sony® – Triniton e a um microcomputador, localizados fora da sala (Figura 8). As imagens captadas durante a realização do campo aberto foram interpretadas pelo *software* EthoVision® – Video Tracking, Motion & Behavior Recognition System – versão 1.90 (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA).

Figura 8 - Sistema de observação computadorizada EthoVision®. A: arena de campo aberto. B: sistema computadorizado para análise e interpretação dos dados. C: câmera para captação das imagens. O mesmo programa rastreia e analisa o comportamento animal.

As imagens recebidas pela câmera filmadora foram digitalizadas na placa de captura, e o programa gerou coordenadas espaciais (x e y) do centro de gravidade do animal em intervalos de tempo determinados, segundo uma taxa de amostragem de 6,67 amostras por segundo (ou seja, registra a localização do animal a cada 0,15 segundo). Essas coordenadas foram geradas pelo método de subtração das imagens do animal branco na arena escura (o campo aberto, no caso).

O programa permite ainda sobrepor a imagem da arena (captada pela câmera) com uma representação gráfica de zonas construídas virtualmente no computador – subdividindo a arena em duas áreas concêntricas – periférica e central (Figura 9). Portanto, cada parâmetro analisado possui valores referentes à arena como um todo, valores apenas na zona central e valores apenas na zona periférica.

Figura 9 - Representação das subdivisões virtuais feitas na arena de campo aberto pelo programa EthoVison®: Periférica e Central

Entre os parâmetros calculados automaticamente pelo sistema estão:

Distância percorrida (cm) é a distância que o animal percorreu, em centímetros, pela arena de campo aberto, calculado pela somatória das distâncias medida em linha reta, movidas pelo animal entre duas amostras consecutivas.

Velocidade média é a velocidade média que o animal imprime em centímetros por segundo na arena do campo aberto.

Número de entradas é o parâmetro que corresponde ao número de vezes que o animal adentrou em cada zona, na arena de campo aberto.

Tempo na zona (s) é o tempo que o animal passa em cada uma das zonas da arena de campo aberto. Ativado quando as coordenadas do centro de gravidade do animal coincidem com as coordenadas compreendidas pela zona de interesse.

Frequência de levantar corresponde ao número de vezes que o animal diminui sua área a partir de 15%, através do ato de levantar, captado de cima pela câmera.

Além dos parâmetros registrados automaticamente pelo programa, existe a possibilidade de registrar, simultaneamente ao rastreamento, outros eventos comportamentais de interesse. Isso é feito pelo próprio experimentador, com a observação do animal através do monitor, e teclando (com teclas pré-programadas) a ocorrência do(s) parâmetro(s). Foi possível assim registrar os respectivos números de ocorrências e tempos de duração na arena e em cada zona: o número de ocorrências foi registrado conforme o número de vezes que se pressionava a tecla, enquanto que a duração do comportamento correspondeu ao tempo em que se mantinha a tecla pressionada. Os parâmetros registrados semi-automaticamente são:

Frequência de auto-limpeza ou de *grooming*, entendido como o número de vezes que o animal gasta com processos de auto-limpeza na superfície de seu corpo, através do uso de sua língua, com os dentes, e com as patas anteriores.

Tempo de auto-limpeza (s) ou de *grooming*, entendido pelo tempo em segundos que o animal gasta com processos de auto-limpeza na superfície de seu corpo, através do uso de sua língua, com os dentes, e com as patas anteriores.

O sistema do EthoVision® processa os dados das passagens e calcula os valores numéricos das características de distribuição escolhidas para cada parâmetro (frequência ou tempo). Dessa forma é possível exportar esses valores para formatos comuns de outros computadores (*Microsoft Excel 7.0*).

A atividade geral observada com o auxílio do EthoVision® evita a presença de um observador, garantindo a não interferência deste no comportamento do animal estudado. Isso ocorre, pois o observador em questão permanece fora da sala onde se encontra o animal em teste.

3.11 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE BRINCAR DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS

Após o desmame, no PND 21, animais de 10 ninhadas do grupo controle e 10 do grupo experimental foram mantidos em 2 condições de alojamento: um isolado (sozinho na gaiola, mas na mesma sala das gaiolas dos outros animais) e outro em grupos de dois animais por gaiola (da mesma ninhada), perfazendo quatro grupos: um de isolados tratados (IT), outro de isolados controles (IC), outro de agrupados tratados (AT) e outro de agrupados controles (AC). Esses animais, isolados ou agrupados, permaneceram nestas condições até o PND 30.

No PND 30 foram realizados os pareamentos de um animal isolado com um animal agrupado, sempre sendo o agrupado inserido na gaiola do isolado, onde o experimento foi realizado, e, portanto, os isolados são também denominados como residentes, e os agrupados como intrusos.

O pareamento sempre cruzava animais tratados com controles, ou seja, os isolados tratados foram confrontados com agrupados controles, e os isolados controles confrontados com agrupados tratados. As observações foram feitas em duas sessões: Na primeira, como já citado, os pareamentos ocorreram no PND 30, tomando cuidado para os indivíduos possuírem

pesos os mais similares possíveis (diferença máxima de 10 g). Após o pareamento, os animais foram colocados nas condições prévias (isolados ou agrupados). A segunda sessão foi feita no dia seguinte, no PND 31, com a mesma dupla anteriormente pareada.

Os PND 30 e 31 foram escolhidos para a análise do comportamento de brincar, pois é nesta faixa de idade que os ratos apresentam os picos deste tipo de interação (PLETNIKOV et al., 1999). O isolamento foi realizado, pois este procedimento exacerba os episódios de interações sociais quando existe subsequente pareamento de animais (FILE; SETH, 2003).

A figura 10 ilustra um exemplo de como foram realizados os pareamentos entre animais de duas ninhadas, uma controle e outra tratada (pré-natalmente).

Figura 10 - Ilustração dos pareamentos dos animais realizadas no PND 30 e PND 31: agrupado controle (AC) com isolado tratado (IT), e agrupado tratado (AT) com isolado controle (IC)

Imediatamente antes do início do experimento, as gaiolas de um animal isolado e de uma dupla agrupada foram colocadas na sala de observação por 5 minutos para aclimação. Após este período, um intruso foi colocado na gaiola do residente. As sessões foram de 10 minutos na própria gaiola de polipropileno do residente. Os testes foram realizados durante a manhã, entre as 9:00 e 11:00 horas. O comportamento dos animais foi filmado e, ao final das sessões, analisado.

Os seguintes parâmetros foram medidos:

Pinning, ou comportamento de brincar propriamente dito, registrado quando um animal fica com seu dorso encostado no chão, mostrando seu ventre para o outro, e o outro animal fica sobre ele (Figura 11).

Farejar (s), entendido pelo tempo que um dos animais gasta farejando seu parceiro, ou seja, encostando o nariz no outro, para sentir seu cheiro.

Frequência de passar sobre ou sob o outro, quando um dos animais passa por cima ou por baixo do outro rato que está parado ou em movimento.

Frequência de montar, classificado quando um animal sobe no dorso do outro, sempre no sentido caudal-cranial, com auxílio de suas patas anteriores.

Perseguir (s), computado pelo tempo que um dos animais persegue o outro, ou seja, se movimenta em direção ao outro, quando o animal perseguido também está se movimentando.

Locomoção (s) é o tempo que cada animal passa se movimentando de maneira exploratória na gaiola, sem qualquer tipo de interação com o outro rato.

No caso do parâmetro *Pinning*, foi computado o comportamento para os dois animais (o isolado e o agrupado pareados) como um conjunto, já que esse é proveniente da interação entre ambos, impossível de se realizar sozinho. Já os outros parâmetros são computados separadamente, no isolado e no agrupado.

O comportamento de *pinning* é considerado como o comportamento de brincar propriamente dito. Os comportamentos de farejar, passar sobre ou sob o outro, de montar e perseguir são considerados como solicitações de brincar. Esse experimento foi realizado a partir de modelos (adaptados) utilizados por Pletnikov et al. (1999) e Schneider e Koch (2005).

Figura 11 - Ilustração do *pinning*, ou comportamento de brincar propriamente dito, realizado entre dois filhotes jovens

3.12 DOSAGEM DE NEUROTRANSMISSORES DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS

O estudo da neuroquímica foi realizado com o fim da determinação das concentrações de neurotransmissores e de seus metabólitos nos cérebros dos animais. Para tal, três estruturas do encéfalo foram colhidas – o estriado, o hipotálamo e o córtex frontal – e preparadas para posterior análise por sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O método foi previamente descrito em nossos laboratórios (FELICIO et al., 1996).

3.12.1 Coleta dos tecidos e preparo das amostras

Os animais destinados para este experimento (7 do grupo controle e 9 do grupo experimental) foram decapitados em guilhotina. O encéfalo foi retirado, lavado com solução salina gelada (4°C) e as três estruturas pré-escolhidas, o estriado, o hipotálamo e o córtex frontal, foram coletadas sobre placa de gelo seco, formando assim um micro-ambiente o mais frio possível. Essas regiões foram dissecadas com base nas coordenadas de Paxinos e Watson (1998).

Cada estrutura retirada foi então pesada em balança analítica, acondicionada em *eppendorfs* e estocada em freezer a -80°C para posterior homogeneização num período de 17 dias. Estes procedimentos de coleta duraram no máximo 3 minutos por animal.

As estruturas retiradas do encéfalo do animal foram homogeneizadas com o auxílio de uma caneta sonicadora de alta frequência na proporção de 15 vezes do seu peso com solução diluente gelada de ácido perclórico (ClHO_4) 0,1 M (Merk®) contendo 0,02 % de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), EDTA dissódico (ácido dissódico etilenodiaminotetracético) e uma concentração conhecida de DHBA (ácido 3,4-dihidroxibenzilamina), utilizado como padrão interno para as dosagens de monoaminas. O DHBA foi escolhido como padrão interno por ter as mesmas características físico-químicas que as monoaminas dosadas.

Os homogenatos foram deixados para pernoitar em refrigerador (0°C) com a finalidade de se obter uma boa precipitação das proteínas e ácidos nucléicos, e conseqüentemente melhor purificação das amostras. Após esta etapa, o material foi centrifugado a 10.000 RPMs,

por um período de 30 minutos (centrífuga Harrier 18/80 MSE da Sanyo® - refrigerada a 4°C). Logo em seguida o sobrenadante foi retirado e acondicionado em *eppendorfs*, estocado em freezer a -80°C para ser utilizado na quantificação bioquímica no HPLC após 29 dias.

3.12.2 Aparelho

Para as dosagens neuroquímicas, o sistema utilizado foi o de cromatografia líquida de alta eficiência HPLC (Shimatzu®, Kyoto, JP), composto por uma bomba, um amortecedor de impulsos, uma válvula injetora de 20 µl, um detector eletroquímico, um forno de coluna para manutenção da temperatura, um registrador de dois canais e um integrador (Modelo Chromatopac), todos da marca SHIMATZU®. A coluna utilizada foi a "C-18" (SUPELCO®, Sigma, St. Louis, MO, USA) medindo 150 x 4,6 mm acoplada a uma pré-coluna e filtro de linha.

A técnica utilizada foi a de cromatografia em fase reversa com pareamento iônico, a qual se fundamenta na cromatografia de partição ou absorção (GERENUTTI, 1996).

3.12.3 Preparo das soluções

A fase móvel, ou seja, o meio de arraste neste tipo de cromatografia era constituída de: 4,20 g/l de ácido cítrico, 7,16 g/l de fosfato de sódio dibásico (NaH_2PO_4), 556,0 mg/l de ácido heptanossulfônico (HSA), 40,0 mg/l de EDTA e 80,0 ml/l de metanol absoluto. O pH desta solução foi ajustado para 3,0 com auxílio do ácido ortofosfórico (H_3PO_4).

A fase móvel foi filtrada em um sistema a vácuo e deaerado por 30 minutos com um fluxo de hélio antes de ser instalada no HPLC.

Após sua instalação no sistema cromatográfico, permaneceu por uma noite (*overnight*) circulando em sistema fechado para estabilização do aparelho, com um fluxo constante de 1,2 ml/min. O detector eletroquímico foi mantido com potencial de + 0,83 V no eletrodo de trabalho. O forno foi mantido em temperatura constante de 45° C.

As soluções padrão foram preparadas utilizando-se 1 nM de cada um dos padrões: DHBA, hidrocloreto de dopamina (DA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), hidrocloreto de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA) e noradrenalina (NOR), todos da Sigma®. Estes foram diluídos em uma solução padrão composta de ácido clorídrico 0,1M e 0,02% Na₂S₂O₅, distribuídos em tubos *ependorf* (1,5 ml), e, em seguida, estocados em *freezer* -80°C por um período de até dois meses. No momento da análise, os padrões foram descongelados e diluídos 5.000, 10.000 e 20.000 vezes em ácido perclórico 0,1 M e filtrados em filtros descartáveis de 0,25 µm antes de serem injetados no HPLC.

Segundo a técnica cromatográfica, as substâncias foram reconhecidas a partir do seu tempo de retenção na coluna cromatográfica, comparando-as com os padrões. A figura 12 exemplifica uma amostra de padrão.

Figura 12 - Cromatograma obtido após a injeção de uma solução padrão de DA, DOPAC, HVA, 5HIAA, 5HT e NOR no HPLC, segundo as condições cromatográficas descritas no texto

O limite de detecção foi acima de 0,2 ng para DA, DOPAC, HVA, 5-HT, 5HIAA e NOR.

Os níveis dos neurotransmissores serotonina, dopamina e de seus respectivos metabólitos 5HIAA, DOPAC e HVA, foram utilizados na obtenção das taxas de utilização dos neurotransmissores, através da razão dos metabólitos com os neurotransmissores.

3.12.4 Calibração

A calibração foi procedida com a adição de padrão interno. O padrão interno utilizado foi o DHBA pelo motivo de que este produz um pico com boa resolução, sem interferência em nenhum componente da amostra, sendo estável, com alta pureza, atendendo às necessidades para um padrão interno.

O intuito da utilização desta substância é como marcador interno, a fim de compensar os efeitos de mínimas variações nos parâmetros de separação, no tamanho do pico, incluindo flutuações no tamanho da amostra. Foram construídas curvas de calibração para se verificar a existência de correlação linear entre a concentração e a altura do pico das aminas biogênicas.

Essas curvas foram construídas obtendo-se a razão entre a altura do pico do padrão interno no eixo das ordenadas e a concentração do neurotransmissor isolado no eixo das abscissas.

3.12.5 Cálculo das concentrações dos neurotransmissores e seus metabólitos

As concentrações dos neurotransmissores e seus respectivos metabólitos foram obtidas pela aplicação da fórmula abaixo descrita, tendo sido expressas em nanograma por miligrama de tecido:

$$\text{CNT} = \frac{\text{hA amostra} \times \text{hPI padrão} \times \text{CA padrão} \times \text{FT}}{\text{hPI amostra} \times \text{hA padrão} \times \text{peso do tecido}}$$

A = amina; h = altura do pico; CNT = concentração do neurotransmissor e PI = padrão interno (DHBA).

Para todas as dosagens foram estabelecidas curvas de calibração tendo sido calculados os coeficientes de correlação linear sendo considerados adequados valores superiores a 0,9. Para o estabelecimento da precisão intra-ensaio do método cromatográfico, foram calculados os coeficientes de variação das diferentes concentrações dos neurotransmissores analisados e foram considerados adequados valores inferiores a 15%.

A recuperação do método foi estudada acrescentando-se a triplicata de amostras de concentrações conhecidas dos diferentes padrões mensurados, sendo que foi aceito como adequados valores superiores a 80%.

3.13 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CÉREBRO DA PROLE MASCULINA NA IDADE ADULTA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS

Animais machos do grupo experimental e do grupo controle, (5 para ambos os grupos), foram perfundidos no PND 60 (9:00 – 11:00 horas) para posterior retirada de seus encéfalos, cortes histológicos e preparo de lâminas para análise ultra-estrutural.

A perfusão foi utilizada com a finalidade de se obter uma adequada preservação de tecido nervoso. Para tal procedimento, os ratos ficaram em jejum alimentar de 12 horas e hídrico de 4 horas. Primeiramente, foram submetidos à inalação de éter etílico para uma indução anestésica, e, em seguida, os animais receberam, i.p., uma dose de 0,1 ml / 100 g de anestésico de cloridrato de quetamina (Vetanarcol, da König®) e cloridrato de xilazina (Xilazin, da Syntec®), respectivamente, na proporção de 5:1. Após constatar-se ausência do reflexo de retirada da pata frente a um estímulo pressório, os mesmos foram imobilizados em decúbito dorsal. A seguir, realizou-se uma laparotomia medial, supra e infra-umbilical. Posteriormente, efetuou-se a incisão antero-médio-lateral do diafragma. A parede do tórax foi rebatida cranialmente através de uma incisão longitudinal bilateral, iniciando-se no rebordo costal e estendendo-se até a porção distal de ambas as clavículas, sendo as costelas seccionadas. Após a exposição dos órgãos da cavidade torácica, foi introduzida na porção medial do ventrículo esquerdo uma cânula fina, a qual estava conectado o sistema de perfusão (bomba peristáltica Masterflex C/L da Cole-Parmer®). Com a cânula devidamente colocada e pinçada (no terço ventral contra a agulha para evitar refluxo), iniciou-se a perfusão (intra-cardíaca), e, ao mesmo tempo, no átrio direito foi feita uma incisão para possibilitar a drenagem do sangue e solução perfusora. Os animais foram perfundidos primeiramente com solução salina 0,9% com EDTA 0,01M, tamponado a pH 7,4, por 10 minutos, garantindo assim a retirada do sangue sem sua coagulação (função do EDTA). Foram perfundidos por outros 10 minutos com solução aquosa de formaldeído a 10% para a fixação dos órgãos. Foi então retirado o encéfalo dos mesmos e acondicionados em frasco com formol por um período de 24-72 horas.

Desses encéfalos obtiveram-se cortes sagito-medial, que foram acondicionados em cassetes. Posteriormente, o material foi submetido às técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram feitos com cerca de 5 µm e corados pelo HE (hematoxilina-eosina).

As lâminas prontas foram analisadas em microscópio óptico.

3.14 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO SOCIAL DA PROLE MASCULINA NA IDADE ADULTA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS

No PND 54, 1 rato macho de cada ninhada, não utilizados em outros experimentos (7 animais para cada grupo) foram mantidos isolados ou agrupados, da mesma forma que no experimento do comportamento de brincar (descrito no item 3.11). Esses condicionamentos se mantiveram até o PND 60.

No PND 60, um rato isolado foi confrontado com um agrupado (peso não diferindo mais que 10 g), cruzando grupos experimentais e controles em gaiolas de polipropileno (iguais às gaiolas moradia) e observando-os durante 5 minutos, sendo o procedimento filmado. Os pareamentos foram realizados no período das 9:00 – 11:00 horas. Os animais foram aclimatados na sala do teste por 5 minutos antes do cruzamento. Os seguintes parâmetros foram avaliados: *Farejar (s)*, *Frequência de passar sobre ou sob o outro*, *Frequência de montar*, *Perseguir (s)* e *Locomoção (s)*, já definidos no item 3.11.

3.15 AVALIAÇÃO DA CATATONIA INDUZIDA POR HALOPERIDOL NA PROLE MASCULINA NA IDADE ADULTA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS

Outros ratos machos (11 para cada grupo de ninhadas diferentes) foram utilizados para o teste da catatonia experimental, avaliada no PND 60 (9:00 – 11:00 horas) aos 10, 20, 40, 60, 90, 120 e 180 minutos após a administração i.p. de haloperidol (2,5 mg / kg – Janssen Farmacêutica®).

Os ratos foram individualmente testados em cada sessão colocando-os em pé, com as patas anteriores apoiadas em um bastão posicionado na horizontal a 11 cm da bancada (Figura 13). Considerou-se positivo para catatonia o animal que permanecia 30 segundos na mesma posição. Caso o animal saísse da posição antes dos 30 segundos, ele era imediatamente reposicionado para mais 30 segundos de observação. Se ele permanecesse parado, considerava-se positivo, mas se não, uma terceira e última tentativa era feita naquela sessão. Se o animal permanecia os 30 segundos na posição, considerou-se positivo para catatonia, mas se após as três tentativas seguidas ele não permanecesse na posição colocada, era considerado negativo para catatonia naquela sessão. Cronômetros foram utilizados neste teste.

Figura 13 - Aparelho utilizado para avaliação da catatonia experimental, composta por (A) um bastão posicionado a 11 cm da bancada. (B) O rato manteve a mesma posição a qual foi colocado, demonstrando estar catatônico

3.16 AVALIAÇÃO DA ESTEREOTIPIA INDUZIDA POR APOMORFINA NA PROLE MASCULINA NA IDADE ADULTA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS

No PND 60 (9:00 – 11:00 horas), 8 ratos / grupo, sendo um de cada ninhada e não utilizados em outros testes, foram individualmente acondicionados em gaiolas de metal (30 x 15 x 19 cm) (Figura 14), com livre acesso a comida e água por 6 horas, para a adaptação do animal à gaiola. O comportamento estereotipado foi induzido pela administração subcutânea de 0,6 mg / kg de apomorfina (Sigma®). A estereotipia foi quantificada aos 15, 25, 35, 45, 60 e 70 minutos após a administração da apomorfina. O sistema de escore utilizado foi o mesmo proposto por Setler, Sarau e McKenzie (1976), como demonstrado no quadro 1. Os escores comportamentais variaram de 0 (adormecido ou parado) até 6 (lamber e roer continuamente a gaiola), sendo anotada por um observador que não sabia distinguir os grupos experimentais.

Figura 14 - Gaiola utilizada para a observação da estereotipia experimental, avaliada através de escores

Quadro 1 - Escores comportamentais propostos por Setler, Sarau e McKenzie (1976), para a avaliação da estereotipia induzida (por apomorfina) na prole masculina tratada ou não pré-natalmente com LPS

Escore	Comportamento
0	Adormecido ou parado.
1	Ativo.
2	Predominantemente ativo, mas com curtos períodos de farejar, levantar-se estereotipado.
3	Atividade estereotipada constante, tal com farejar, levantar-se ou balançar a cabeça, mas com atividade locomotora ainda presente.
4	Atividade estereotipada constante realizada em um só local.
5	Atividade estereotipada constante, mas com curtos períodos de lambar e / ou roer e morder.
6	Lambar e / ou roer as barras da gaiola.

3.17 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Seguindo a ordem cronológica dos eventos, primeiramente foi realizado o acasalamento das ratas fêmeas adultas, que tinham o GD 0 identificado por meio de lavado vaginal. Essas foram mantidas isoladas nas suas gaiolas moradia durante a gestação, passando pelo tratamento com solução de LPS ou salina no GD 9,5. A ocorrência do comportamento doentio e a avaliação dos parâmetros reprodutivos foram realizadas nestas gestantes. Após o nascimento de sua prole, no PND 2 dos respectivos, foi realizada a padronização.

Durante os primeiros dias de vida da ninhada, foi realizada a avaliação do desenvolvimento físico e reflexológico. No PND 21, ocorreu o desmame e separação dos filhotes em grupos. Um dos machos seguiu imediatamente para o campo aberto para avaliação da atividade exploratória. Outro macho ficou mantido sozinho (isolado), e os outros 2 mantidos juntos (agrupados), até o PND 30 e 31, quando são utilizados para a avaliação do comportamento de brincar. No PND 60, parte destes machos foram submetidos à eutanásia para avaliação de seus transmissores e metabólitos cerebrais, e outra parte para avaliação morfológica cerebral. No PND 60 outros animais (de outras ninhadas) foram utilizados para a avaliação da interação social na idade adulta, para a catatonia e estereotipia experimentais.

Toda seqüência dos experimentos realizados nos animais está esquematizada na figura a seguir (Figura 15):

Figura 15 - Delineamento dos experimentos realizados, desde a determinação do dia zero de gestação da rata através do lavado vaginal, passando pelo tratamento com LPS ou salina no GD 9,5, avaliação do comportamento doenteio e o nascimento da prole. A prole é padronizada e tem seus parâmetros de desenvolvimento físico e reflexológico avaliados, seguindo pelo desmame e separação dos grupos, passagem pelo campo aberto, observação do comportamento de brincar, avaliação neuroquímica, neuroanatômica, da interação social e da catatonia e estereotipia experimentais

3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado os *softwares* GraphPad InStat versão 3.01® e SigmaStat versão 3.2®. Primeiramente verificou-se a homocedasticidade dos dados pelo teste de Kolmogorov e Smirnov (para avaliação da distribuição Gaussiana). Os dados paramétricos foram analisados pelo teste *t* de Student. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste *U* de Mann-Whitney.

Nos testes de comportamento de brincar foi utilizado ANOVA de três vias, para análise dos dados dos grupos controles e experimentais com os diferentes condicionamentos e os diferentes dias de observação como fatores. A ANOVA foi seguida do teste de Holm-Sidak, usado para comparar dados homocedásticos que apresentam interação.

No teste de catatonia, o teste de Fisher foi empregado.

O nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado suficiente para mostrar diferenças significativas em todos os dados analisados.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOENTIO DAS RATAS TRATADAS OU NÃO COM LPS DURANTE A GESTAÇÃO

A tabela 1 mostra e a figura 16 ilustra que no campo aberto as ratas gestantes tratadas com LPS apresentaram diminuição na frequência de locomoção ($p=0,0035$), de levantar ($p=0,0077$) e no tempo de auto-limpeza ($p=0,0379$), em relação aos dados do grupo controle.

A tabela 2 mostra e a figura 17A ilustra que o consumo alimentar foi reduzido no grupo experimental após 24 ($p<0,0001$), 48 ($p=0,0003$) e 72 horas ($p=0,0116$) do tratamento com LPS em relação aos dados do grupo controle.

Como descrito na tabela 2 e na figura 17B, em relação aos dados do grupo controle, o tratamento com LPS não foi capaz de modificar a temperatura corpórea das ratas gestantes tanto após 1 hora ($p=0,9999$) como após 24 horas ($p=0,3741$) do tratamento; entretanto, após 48 horas, as fêmeas apresentaram aumento da temperatura corpórea em relação ao mensurado nos animais controle ($p=0,0158$).

Tabela 1 - Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na atividade geral de ratas gestantes, avaliada em campo aberto. Os valores são representados como média $\pm$ S.E. n=8 para ambos os grupos

Parâmetros	Grupos	
	Controle	Experimental
Frequência de locomoção	143,75 $\pm$ 7,58	98,12 $\pm$ 10,61 **
Frequência de levantar	21,00 $\pm$ 2,15	10,50 $\pm$ 2,61 **
Tempo de auto-limpeza	8,37 $\pm$ 2,83	2,25 $\pm$ 1,47 *

* p<0,05 comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student)

** p<0,01 comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student)

Figura 16 - Efeitos da exposição ao LPS (100 μ g/kg no GD 9,5) na atividade geral de ratas gestantes, avaliada em campo aberto. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, comparado com o grupo controle (Teste t de Student). Os valores são representados como média $\pm$ S.E. $n=8$ para ambos os grupos

Tabela 2 - Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no consumo alimentar 24, 48 e 72 horas após o tratamento e na temperatura corpórea após 1, 24 e 48 horas do tratamento das ratas gestantes. Os valores são representados como média ± S.E. n=8 para ambos os grupos

Parâmetros	Grupos	
	Controle	Experimental
Ingestão de alimentos (g) após		
24 horas	22,27 ± 1,33	6,55 ± 2,52 ****
48 horas	23,72 ± 1,03	14,00 ± 1,76 ***
72 horas	22,65 ± 1,61	17,12 ± 1,02 *
Temperatura corpórea (°C) após		
1 hora	36,41 ± 0,08	36,41 ± 0,08
24 horas	36,54 ± 0,07	36,74 ± 0,21
48 horas	36,49 ± 0,03	36,69 ± 0,07 *

* p<0,05 comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student)

*** p<0,001 comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student)

**** p<0,0001 comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student)

Figura 17 - Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no (A) consumo alimentar após 24, 48 e 72 horas do tratamento; e na (B) temperatura corpórea após 1, 24 e 48 horas do tratamento das ratas gestantes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$, comparado com o grupo controle (Teste t de Student). Os valores são representados como média $\pm$ S.E. $n=8$ para ambos os grupos

4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DAS RATAS TRATADAS OU NÃO COM LPS DURANTE A GESTAÇÃO

A tabela 3 mostra os resultados da avaliação dos parâmetros reprodutivos das ratas tratadas ou não com a solução de LPS. As ratas prenhes tratadas com LPS adquiriram menos peso durante o período de sua gestação ($p=0,0101$) e deram a luz a um número menor de filhotes ($p=0,0004$) em relação aquelas do grupo tratado com salina. Porém, o tratamento não modificou a duração da gestação ($p=0,5181$) e o peso total da prole ($p=0,2253$).

Tabela 3 - Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) em ratas gestantes no ganho de peso durante a gestação, na duração da gestação e no número e peso total de filhotes. Os valores são representados como média $\pm$ S.E. n=9 para animais do grupo controle e n=11 para animais do grupo experimental

Parâmetros	Grupos	
	Controle	Experimental
Ganho de peso materno durante a gestação (g) (GD 9,5 – GD 21)	16,63 $\pm$ 3,26	6,27 $\pm$ 1,88 *
Duração da gestação (dias)	22,22 $\pm$ 0,15	22,36 $\pm$ 0,15
Número de filhotes nascidos	10,78 $\pm$ 0,32	7,45 $\pm$ 0,64 ***
Peso total da prole (g)	70,60 $\pm$ 5,50	60,53 $\pm$ 5,69

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Teste t de Student)

*** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle (Teste t de Student)

4.3 AVALIAÇÃO DOS PADRÕES FÍSICOS E REFLEXOLÓGICOS DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS

Como descrito pela tabela 4, o peso corporal individual da prole masculina das ratas tratadas com LPS se mostrou inalterado em relação ao grupo controle nos três diferentes momentos de observação: no PND 2 ($p=0,9648$), no PND 21 ($p=0,7188$) e no PND 60 ($p=0,2219$).

Como visto na tabela 5 e na figura 18, nenhum dos parâmetros físicos e reflexológicos se mostrou alterado após o tratamento pré-natal com LPS em relação ao grupo controle: dia do desdobramento das orelhas ($p=0,4532$), dia da perda do reflexo de agarrar ($p=0,5877$), dia do nascimento dos pêlos ($p=0,3120$), dia da ocorrência da geotaxia negativa ($p=0,3382$), dia da erupção dos dentes ($p=0,8120$), dia da abertura do canal auditivo ($p=0,5322$), dia da abertura dos olhos ($p=0,9692$) e dia do andar adulto ($p=0,7868$).

Tabela 4 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos pesos corporais individuais (g) da prole masculina de ratas, tomadas no PND 2, PND 21 e PND 60. Os valores são representados como média $\pm$ S.E. n=9 para animais do grupo controle e n=11 para animais do grupo experimental

Peso corporal individual (g)	Grupos	
	Controle	Experimental
PND 2	7,45 $\pm$ 0,20	7,94 $\pm$ 0,29
PND 21	44,96 $\pm$ 0,91	44,37 $\pm$ 1,39
PND 60	277,11 $\pm$ 4,98	266,65 $\pm$ 6,95

* p<0,05 comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student)

Tabela 5 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos parâmetros físicos e reflexológicos da prole masculina de ratas (valores referentes aos dias de aparecimento ou desaparecimento dos parâmetros). Os valores são representados como média $\pm$ S.E. n=9 para animais do grupo controle e n=11 para animais do grupo experimental

Parâmetros	Grupos	
	Controle	Experimental
Desdobramento das orelhas	3,33 $\pm$ 0,17	3.09 $\pm$ 0.25
Reflexo de preensão palmar	5,11 $\pm$ 0,61	4,73 $\pm$ 0,38
Aparecimento dos pêlos	5,67 $\pm$ 0,17	6,00 $\pm$ 0,19
Geotaxia negativa	7,33 $\pm$ 0,29	7,82 $\pm$ 0,38
Erupção dos dentes	10,89 $\pm$ 0,31	11,00 $\pm$ 0,33
Abertura do canal auditivo	12,33 $\pm$ 0,24	12,09 $\pm$ 0,28
Abertura dos olhos	14,56 $\pm$ 0,18	14,54 $\pm$ 0,25
Andar adulto	15,00 $\pm$ 0,17	15,09 $\pm$ 0,34

* p<0,05 comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student)

p<0,05 comparado com o grupo controle (Teste *U* de Mann-Whitney)

Figura 18 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 $\mu\text{g/kg}$ no GD 9,5) nos parâmetros físicos e reflexológicos da prole masculina de ratas. DO: desdobramento de orelhas; PP: reflexo de preensão palmar; AP: aparecimento dos pêlos; GN: geotaxia negativa; ED: erupção dos dentes; AC: abertura do canal auditivo; AO: abertura dos olhos; AA: andar adulto. * $p < 0,05$ (teste t de Student) e # $p < 0,05$ (teste U de Mann-Whitney) comparado com o grupo controle. Os valores são representados como média $\pm$ S.E. $n=9$ para animais do grupo controle e $n=11$ para animais do grupo experimental

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS

A tabela 6 mostra e a figura 19 ilustra os resultados da atividade geral observada em campo aberto no PND 21 da prole masculina de ratas tratadas ou não com a solução de LPS.

Em relação ao grupo controle, os animais tratados pré-natalmente com LPS apresentaram: menor tempo gasto com a auto-limpeza na arena ($p=0,0367$); quando o parâmetro é avaliado apenas na zona central não se observaram diferenças ($p=0,5792$); quando observado apenas na zona periférica ocorreu menor tempo de auto-limpeza ($p=0,0214$).

A distância percorrida, a velocidade média, o número de entradas, o tempo gasto em cada uma das zonas, a frequência de levantar e a frequência de auto-limpeza não foram alteradas comparando-se os animais tratados pré-natalmente ou não com LPS. Este fato foi observado tanto na arena total, como na zona central e na zona periférica. Os valores estatísticos de p para cada um destes parâmetros encontram-se na tabela 6.

Tabela 6 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na atividade geral observada em campo aberto da prole masculina de ratas. Os valores são representados como média ± S.E. n=9 para animais do grupo controle e n=11 para animais do grupo experimental

Parâmetros	Zonas	Grupos		p
		Controle	Experimental	
Tempo de auto-limpeza (s)	Arena	27,32 ± 5,80	13,91 ± 2,56 *	0,0367
Tempo de auto-limpeza (s)	Central	1,37 ± 1,37	2,78 ± 1,68	0,5792
Tempo de auto-limpeza (s)	Periférica	26,87 ± 5,83	11,13 ± 3,05 *	0,0214
Distância percorrida (cm)	Arena	643,82 ± 96,96	506,34 ± 66,25	0,2438
Distância percorrida (cm)	Central	115,36 ± 39,72	116,67 ± 30,81	0,9792
Distância percorrida (cm)	Periférica	514,87 ± 77,54	389,67 ± 77,00	0,2715
Velocidade média	Arena	2.16 ± 0.36	1.69 ± 0,22	0,2646
Velocidade média	Central	3.84 ± 1.36	2,37 ± 0,59	0,3044
Velocidade média	Periférica	1,98 ± 0,31	1,50 ± 0,29	0,2706
Número de entradas	Central	6,78 ± 2,03	4,54 ± 2,17	0,4692
Número de entradas	Periférica	7,22 ± 1,97	4,36 ± 2,20	0,3562
Tempo na zona (s)	Central	54,77 ± 31,16	85,53 ± 33,57	0,5180
Tempo na zona (s)	Periférica	249,15 ± 31,64	214,47 ± 33,57	0,4693
Frequência de levantar	Arena	7,33 ± 2,63	5,36 ± 1,36	0,4926
Frequência de levantar	Central	0,55 ± 0,44	0,09 ± 0,09	0,6016
Frequência de levantar	Periférica	7,00 ± 2,87	5,27 ± 1,32	0,5681
Frequência de auto-limpeza	Arena	5,00 ± 1,34	3,45 ± 0,61	0,2789
Frequência de auto-limpeza	Central	0,44 ± 0,44	0,82 ± 0,48	0,5790
Frequência de auto-limpeza	Periférica	4,56 ± 1,39	2,64 ± 0,74	0,2151

* p<0,05 comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student)

p<0,05 comparado com o grupo controle (Teste *U* de Mann-Whitney)

Figura 19 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na atividade geral observada em campo aberto da prole masculina de ratas. * $p < 0,05$ (teste t de Student) e # $p < 0,05$ (teste U de Mann-Whitney) comparado com o grupo controle. Os valores são representados como média $\pm$ S.E. $n=9$ para animais do grupo controle e $n=11$ para animais do grupo experimental

4.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE BRINCAR DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS

As tabelas 7 e 8 mostram e a figura 20 ilustra os resultados do comportamento de brincar da prole das ratas tratadas ou não com a solução de LPS. Análises estatísticas realizadas com ANOVA de três vias.

Em relação com os dados do grupo controle, o *pinning* (Figura 20A) se apresentou reduzido no grupo experimental [$F(36/39) = 9,54, p = 0,004$]. Entretanto, não foram detectadas diferenças entre os dois dias de observação [$F(36/39) = 0,06, p = 0,814$] e entre o tratamento e os dias de observação [$F(36/39) = 0,09, p = 0,762$]. O teste de comparação múltipla mostrou que o grupo experimental possuiu valores menores no *pinning* que os animais do grupo controle ($p = 0,004$).

Foram observadas diferenças no parâmetro de farejar (Figura 20B) entre os tratamentos [$F(72/79) = 36,44, p < 0,001$], condicionamentos [$F(72/79) = 1080,10, p < 0,001$], tratamento e condicionamento [$F(72/79) = 11,88, p < 0,001$] e condicionamento e dias de observação [$F(72/79) = 7,44, p = 0,008$]. Entretanto, não foram detectadas diferenças entre os dois dias de observação [$F(72/79) = 1,00, p = 0,32$], os tratamentos e dias de observação [$F(72/79) = 0,05, p = 0,82$] e entre os três fatores: tratamento, condicionamento e dias de observação [$F(72/79) = 0,61, p = 0,439$]. O teste de comparação múltipla mostrou que os ratos do grupo experimental apresentaram valores menores no farejar que os do grupo controle ($p < 0,001$), sendo esse efeito presente nos animais isolados ($p < 0,001$), mas não nos agrupados ($p = 0,071$). Foi observado também que no fator condicionamento, os animais isolados apresentaram valores maiores neste parâmetro que os agrupados, tanto no PND 30 ($p < 0,001$) como no PND 31 ($p < 0,001$).

Foram observadas diferenças no parâmetro passar sobre ou sob o outro (Figura 20C), entre tratamentos [$F(72/79) = 10,91, p = 0,001$], condicionamento [$F(72/79) = 161,34, p < 0,001$] e tratamento e condicionamento [$F(72/79) = 9,19, p = 0,003$]. Não foram detectadas diferenças entre os dias de observação [$F(72/79) = 0,61, p = 0,436$], tratamento e dias de observação [$F(72/79) = 0,26, p = 0,611$], condicionamento e dias de observação [$F(72/79) = 0,61, p = 0,436$] e os três fatores juntos: tratamento, condicionamento e dias de observação [$F(72/79) = 0,001, p = 0,973$]. O teste de comparação múltipla mostrou que ratos que receberam pré-natalmente LPS apresentaram valores menores neste parâmetro que os do grupo controle ($p = 0,001$), sendo este efeito presente nos isolados ($p < 0,001$), mas não nos

animais agrupados ($p=0,848$). Foi observado também no fator acondicionamento que os animais isolados apresentaram valores maiores do passar sobre / sob que os agrupados, tanto no PND 30 ($p<0,001$) como no PND 31 ($p<0,001$).

Como ilustrado na figura 20D, foram detectadas diferenças no parâmetro montar, entre os tratamentos [$F(72/79)=5,26$, $p=0,025$], acondicionamento [$F(72/79)=48,14$, $p<0,001$] e tratamento e acondicionamento [$F(72/79)=5,52$, $p=0,021$]. Entretanto, não foram detectadas diferenças entre os dias de observação [$F(72/79)=0,67$, $p=0,414$], o tratamento e os dias de observação [$F(72/79)=0,58$, $p=0,447$], o acondicionamento e os dias de observação [$F(72/79)=0,98$, $p=0,325$] e os três fatores juntos: tratamento, acondicionamento e dias de observação [$F(72/79)=0,67$, $p=0,414$]. A aplicação do teste de comparação múltipla mostrou que o LPS pré-natal dado para ratos resultou em valores menores no montar que nos ratos controles ($p=0,025$), sendo esse efeito apresentado nos isolados ($p=0,002$) e não nos agrupados ($p=0,968$). Foi observado também no fator acondicionamento que animais isolados apresentaram valores maiores deste parâmetro que aqueles agrupados, tanto no PND 30 ($p<0,001$) como no PND 31 ($p<0,001$).

Foi observado a presença de diferenças no parâmetro perseguir (Figura 20E) entre o acondicionamento [$F(72/79)=151,98$, $p<0,001$]. Não foram detectadas diferenças entre os tratamentos [$F(72/79)=3,62$, $p=0,061$], os dias de observação [$F(72/79)=2,06$, $p=0,155$], os tratamentos e o acondicionamento [$F(72/79)=2,48$, $p=0,120$], os tratamentos e dias de observação [$F(72/79)=1,05$, $p=0,308$], os acondicionamentos e os dias de observação [$F(72/79)=2,74$, $p=0,102$] e entre os três fatores juntos: tratamento, acondicionamento e dias de observação [$F(72/79) = 0,41$, $p=0,522$]. O teste de comparação múltipla mostrou que no fator acondicionamento, animais isolados apresentaram valores elevados que aqueles do grupo controle ($p<0,001$).

Por fim, foram observadas diferenças no parâmetro locomoção (Figura 20F) entre o acondicionamento [$F(72/79)=678,91$, $p<0,001$]. Entretanto, não foram observadas diferenças entre os tratamentos [$F(72/79)=0,41$, $p=0,524$], os dias de observação [$F(72/79)=3,69$, $p=0,059$], os tratamentos e o acondicionamentos [$F(72/79)=0,026$, $p=0,872$], os tratamentos e os dias de observação [$F(72/79)=0,15$, $p=0,701$], o acondicionamento e os dias de observação [$F(72/79)=0,19$, $p=0,660$] e os três fatores juntos: tratamento, acondicionamento e dias de observação [$F(72/79)=0,01$, $p=0,915$]. O teste de comparação múltipla mostrou que no fator acondicionamento os animais isolados apresentaram valores mais elevados neste parâmetro que os agrupados ($p<0,001$).

Tabela 7 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no comportamento de brincar da prole masculina de ratas no PND 30. Os valores são representados como média ± S.E. n=10 para ambos os grupos

Parâmetros	Acondicionamento	Grupos	
		Controle	Experimental
<i>Pinning</i>	-	8,90 ± 1,71	3,90 ± 0,72 *
Farejar (s)	Isolados	188,90 ± 5,15	148,80 ± 5,62 *
Farejar (s)	Agrupados	36,70 ± 3,71	28,90 ± 5,57
Passar sobre ou sob	Isolados	13,20 ± 1,57	8,20 ± 0,63 *
Passar sobre ou sob	Agrupados	1,10 ± 0,18	0,50 ± 0,22
Montar	Isolados	8,00 ± 1,24	3,78 ± 1,07 *
Montar	Agrupados	0,30 ± 0,21	0,40 ± 0,22
Perseguir (s)	Isolados	32,50 ± 5,34	23,10 ± 5,34
Perseguir (s)	Agrupados	2,90 ± 0,96	1,60 ± 0,27
Locomoção (s)	Isolados	46,90 ± 2,89	48,30 ± 4,26
Locomoção (s)	Agrupados	7,80 ± 0,90	8,40 ± 1,27

* p<0,05 comparado com o grupo controle (ANOVA de três vias)

Tabela 8 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no comportamento de brincar da prole masculina de ratas no PND 31. Os valores são representados como média ± S.E. n=10 para ambos os grupos

Parâmetros	Acondicionamento	Grupos	
		Controle	Experimental
<i>Pinning</i>	-	8,80 ± 2,15	4,70 ± 0,78 *
Farejar (s)	Isolados	170,80 ± 6,57	138,40 ± 5,43 *
Farejar (s)	Agrupados	45,40 ± 4,47	33,40 ± 6,18
Passar sobre ou sob	Isolados	11,70 ± 2,11	7,40 ± 1,08
Passar sobre ou sob	Agrupados	0,70 ± 0,21	0,90 ± 0,18
Montar	Isolados	7,10 ± 1,79	4,40 ± 1,08
Montar	Agrupados	0,50 ± 0,40	0,50 ± 0,27
Perseguir (s)	Isolados	23,80 ± 3,41	20,50 ± 1,98
Perseguir (s)	Agrupados	2,60 ± 0,67	2,70 ± 0,52
Locomoção (s)	Isolados	41,70 ± 2,73	43,30 ± 1,87
Locomoção (s)	Agrupados	6,20 ± 0,49	7,00 ± 0,82

* p<0,05 comparado com o grupo controle (ANOVA de três vias)

Figura 20 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no comportamento de brincar da prole masculina de ratas. Os valores são representados como média $\pm$ S.E. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes (ANOVA de três vias, $p < 0,05$). $n=10$ para ambos os grupos

4.6 DOSAGEM DE NEUROTRANSMISORES DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS

As tabelas 9, 10 e 11 mostram os resultados da dosagem de neurotransmissores e metabólitos no estriado, hipotálamo e córtex frontal da prole das ratas tratadas ou não com a solução de LPS.

No estriado (Figura 9) observou-se redução significativa nos níveis de DA ($p=0,0290$), DOPAC ($p=0,0274$) e HVA ($p=0,0211$) do grupo experimental, comparado com aqueles do grupo controle. Os outros neurotransmissores, metabólitos e as relações metabólitos / neurotransmissores não se modificaram significativamente: DOPAC/DA ($p=0,5354$), HVA/DA ($p=0,8766$), 5HT ($p=0,7115$), 5HIAA ($p=0,1982$), 5HIAA/5HT ($p=0,3795$) e NOR ($p=0,4769$).

No hipotálamo (Figura 10), nenhum dos neurotransmissores ou metabólitos avaliados apresentou alteração significativa quando se comparou os resultados de animais do grupo experimental e controle, assim como não foram encontradas alterações nas relações metabólitos / neurotransmissores: DA ($p=0,2582$), DOPAC ($p=0,2264$), HVA ($p=0,2163$), DOPAC/DA ($p=0,7127$), HVA/DA ($p=0,0665$), 5HT ($p=0,6958$), 5HIAA ($p=0,6912$), 5HIAA/5HT ($p=0,9297$) e NOR ($p=0,7679$).

No córtex frontal (Figura 11), assim como no hipotálamo, nenhuma alteração foi detectada nos níveis dos neurotransmissores, metabólitos, e nas relações metabólitos / neurotransmissores, comparando o grupo tratado com LPS (pré-natalmente) com o grupo controle: DA ($p=0,6329$), DOPAC ($p=0,8976$), HVA ($p=0,6331$), DOPAC/DA ($p=0,5221$), HVA/DA ($p=0,5005$), 5HT ($p=0,5313$), 5HIAA ($p=0,8212$), 5HIAA/5HT ($p=0,4142$) e NOR ($p=0,8639$).

Tabela 9 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no estriado da prole masculina de ratas. Os valores são representados como média $\pm$ S.E. n=7 para animais do grupo controle e n=9 para animais do grupo experimental

Parâmetros	Grupos	
	Controle	Experimental
DA	9024,600 $\pm$ 290,250	7498,600 $\pm$ 502,270 *
DOPAC	1077,300 $\pm$ 45,960	878,600 $\pm$ 61,267 *
HVA	532,390 $\pm$ 21,273	441,340 $\pm$ 26,030 *
DOPAC / DA	0,119 $\pm$ 0,002	0,117 $\pm$ 0,002
HVA / DA	0,059 $\pm$ 0,002	0,059 $\pm$ 0,002
5HT	330,880 $\pm$ 90,060	292,100 $\pm$ 57,863
5HIAA	855,800 $\pm$ 59,315	750,640 $\pm$ 50,877
5HIAA / 5HT	4,629 $\pm$ 1,792	3,127 $\pm$ 0,475
NOR	80,870 $\pm$ 25,681	60,775 $\pm$ 13,926

* p<0,05 comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student)

Tabela 10 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no hipotálamo da prole masculina de ratas. Os valores são representados como média $\pm$ S.E. n=7 para animais do grupo controle e n=9 para animais do grupo experimental

Parâmetros	Grupos	
	Controle	Experimental
DA	463,860 $\pm$ 42,964	519,780 $\pm$ 25,428
DOPAC	59,352 $\pm$ 3,623	67,662 $\pm$ 5,037
HVA	30,442 $\pm$ 2,942	25,558 $\pm$ 2,417
DOPAC / DA	0,135 $\pm$ 0,016	0,130 $\pm$ 0,006
HVA / DA	0,070 $\pm$ 0,012	0,049 $\pm$ 0,003
5HT	1005,200 $\pm$ 50,854	1035,300 $\pm$ 53,203
5HIAA	911,330 $\pm$ 37,150	938,440 $\pm$ 51,139
5HIAA / 5HT	0,911 $\pm$ 0,025	0,908 $\pm$ 0,024
NOR	683,740 $\pm$ 34,948	670,600 $\pm$ 27,317

* p<0,05 comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student)

Tabela 11 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no córtex frontal da prole masculina de ratas. Os valores são representados como média $\pm$ S.E. n=7 para animais do grupo controle e n=9 para animais do grupo experimental

Parâmetros	Grupos	
	Controle	Experimental
DA	526,600 $\pm$ 205,920	695,010 $\pm$ 257,520
DOPAC	74,211 $\pm$ 24,171	70,731 $\pm$ 14,096
HVA	62,171 $\pm$ 14,194	74,136 $\pm$ 18,510
DOPAC / DA	0,216 $\pm$ 0,038	0,182 $\pm$ 0,035
HVA / DA	0,280 $\pm$ 0,082	0,208 $\pm$ 0,066
5HT	334,860 $\pm$ 30,071	367,410 $\pm$ 37,952
5HIAA	431,530 $\pm$ 30,763	444,230 $\pm$ 42,118
5HIAA / 5HT	1,376 $\pm$ 0,189	1,228 $\pm$ 0,053
NOR	120,770 $\pm$ 7,382	122,730 $\pm$ 8,052

* p<0,05 comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student)

4.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CÉREBRO DA PROLE MASCULINA NA IDADE ADULTA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS

Não foi observada nenhuma alteração cerebral ao nível morfológico por meio do estudo dos cortes histológicos em microscopia óptica de luz nos encéfalos da prole tratada com LPS (pré-natalmente) em relação ao grupo controle.

Todas as estruturas cerebrais dos cortes sagito-mediais foram examinadas. As figuras 21-24 são fotografias dos cortes das estruturas: cerebelo (Figura 21), córtex frontal (Figura 22), plexo coróide (Figura 23) e vasos sanguíneos (Figura 24).

Figura 21 - Efeitos da exposição pré-natal a (A) solução salina e (B) LPS (100 μg/kg no GD 9,5) no cerebelo da prole masculina de ratas. (HE – escala em barra)

Figura 22 - Efeitos da exposição pré-natal a (A) solução salina e (B) LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no córtex frontal da prole masculina de ratas. (HE – escala em barra)

Figura 23 - Efeitos da exposição pré-natal a (A) solução salina e (B) LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no plexo coróide da prole masculina de ratas. (HE – escala em barra)

Figura 24 - Efeitos da exposição pré-natal a (A) solução salina e (B) LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos vasos sanguíneos cerebrais da prole masculina de ratas. (HE – escala em barra)

4.8 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO SOCIAL DA PROLE MASCULINA NA IDADE ADULTA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS

A tabela 12 mostra e a figura 25 ilustra a interação social avaliada na idade adulta da prole isolada por seis dias, tratada ou não pré-natalmente com LPS. A interação social no PND 60 foi reduzida nos seguintes parâmetros, quando comparada com aqueles do grupo controle: passar sobre ou sob o outro ($p=0,0264$) e montar ($p=0,047$). Não houve diferenças entre os grupos observados para os parâmetros: farejar ($p=0,1714$), perseguir ($p=0,4174$) e locomoção ($p=0,3889$). Nos animais agrupados, assim como demonstrado na avaliação do comportamento de brincar, nenhuma alteração foi encontrada (dados não mostrados).

Tabela 12 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na interação social na idade adulta da prole masculina isolada de ratas. Os valores são representados como média $\pm$ S.E. n=7 para ambos os grupos

Parâmetros	Grupos	
	Controle	Experimental
Passar sobre ou sob o outro	2,57 $\pm$ 0,53	1,14 $\pm$ 0,40 *
Montar	4,29 $\pm$ 0,86	2,29 $\pm$ 0,68 *
Farejar (s)	30,57 $\pm$ 2,62	25,86 $\pm$ 3,99
Perseguir (s)	5,00 $\pm$ 0,79	5,29 $\pm$ 1,08
Locomoção (s)	10,57 $\pm$ 1,02	10,14 $\pm$ 1,08

* p<0,05 comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student)

Figura 25 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 μ g/kg no GD 9,5) na interação social na idade adulta da prole masculina isolada de ratas. Pa: passar sobre/sob o outro; Mo: montar no parceiro; Fa: farejar o parceiro; Pe: perseguir o parceiro; Lo: locomoção. * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle (Teste t de Student). Os valores são representados como média $\pm$ S.E. $n=7$ para ambos os grupos

4.9 AVALIAÇÃO DA CATATONIA INDUZIDA POR HALOPERIDOL NA PROLE MASCULINA NA IDADE ADULTA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS

A tabela 13 mostra os resultados observados na catatonia induzida por 2,5 mg / kg de haloperidol na prole masculina de ratas tratadas pré-natalmente com LPS ou com solução salina. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos em relação ao parâmetro nos diferentes períodos de observação: 10 minutos ($p=0,1984$), 20 minutos ($p=1,0000$); 40 minutos ($p= 0,0805$), 60 minutos ($p=0,1827$), 90 minutos ($p=1,5238$), 120 minutos ($p=1,0000$) e 180 minutos ($p=0,4762$).

Tabela 13 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na catatonia induzida por 2,5 mg / kg de haloperidol na prole masculina de ratas observada na idade adulta. Os valores são representados como frequência de ocorrência de catatonia e correspondente porcentagem. n=11 para ambos os grupos

Tempo (em min) após a administração de haloperidol	Grupos			
	Controle		Experimental	
10	7/11	(64 %)	3/11	(28 %)
20	9/11	(82 %)	8/11	(72 %)
40	9/11	(82 %)	4/11	(36 %)
60	9/11	(82 %)	5/11	(46 %)
90	10/11	(90 %)	10/11	(90 %)
120	11/11	(100 %)	10/11	(90 %)
180	11/11	(100 %)	9/11	(82 %)

* p<0,05 comparado com o grupo controle (Teste exato de Fisher)

4.10 AVALIAÇÃO DA ESTEREOTÍPIA INDUZIDA POR APOMORFINA NA PROLE MASCULINA NA IDADE ADULTA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS

A tabela 14 mostra os resultados observados na estereotípiia induzida na prole masculina tratada pré-natalmente com LPS ou com solução salina. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos em relação à estereotípiia nos diferentes períodos de observação: 15 minutos ($p=0,2165$), 25 minutos ($p=0,6707$), 35 minutos ($p=0,5240$), 45 minutos ($p=0,8326$), 60 minutos ($p=0,7046$) e 70 minutos.

Tabela 14 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na estereotipia induzida por 0,6 mg / kg de apomorfina da prole masculina de ratas observada na idade adulta. Os valores são representados como média $\pm$ S.E. n=8 para ambos os grupos

Tempo (em minutos) após	Grupos	
administração de apomorfina	Controle	Experimental
15	3,62 $\pm$ 0,18	3,25 $\pm$ 0,16
25	4,50 $\pm$ 0,46	4,12 $\pm$ 0,35
35	4,25 $\pm$ 0,37	3,87 $\pm$ 0,29
45	3,00 $\pm$ 0,38	2,87 $\pm$ 0,48
60	0,75 $\pm$ 0,49	0,50 $\pm$ 0,38
70	0	0

p<0,05 comparado com o grupo controle (Teste *U* de Mann-Whitney)

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Como descrito nos resultados deste trabalho, a dose administrada de LPS durante a gestação de ratas, 100 µg / kg no GD 9,5, causou diversos problemas para estes animais e também para seus filhotes. Em relação ao grupo controle, as ratas tratadas com LPS apresentaram comportamento doentio, expresso pela redução da atividade geral (locomotoção, levantar e auto-limpeza) após uma hora de tratamento, e da ingestão de alimentos nos três dias seguintes ao tratamento, sendo que a temperatura corpórea aumentou apenas 48 horas após o tratamento. Estes animais apresentaram prejuízo nos parâmetros reprodutivos, ganhando menos peso durante a gestação e dando a luz a um número menor de filhotes, mas sem interferências na duração da gestação e no peso total desta prole. Na prole masculina, as alterações mais relevantes foram a redução no comportamento de brincar na infância e na interação social na idade adulta em animais isolados, e nos níveis de dopamina e metabólitos estriatais. A atividade geral no PND 21, exceto com relação a auto-limpeza, a catatonía e a estereotípia não foram modificadas. Os mesmos resultados foram obtidos da análise dos demais neurotransmissores e metabólitos no estriado, hipotálamo e córtex frontal e na morfologia cerebral.

Há mais de 20 anos, está bem documentado que infecções e inflamações causam o comportamento doentio nos animais. Esse comportamento é presente em diferentes espécies como roedores e humanos, sendo importante para lutar contra o microorganismo invasor, buscando a cura. Isso é possível graças à modulação do sistema imune na atividade do sistema nervoso (PAVLOV; TRACEY, 2004; HAVA et al., 2006; DANTZER; KELLEY, 2007). Este comportamento apresenta uma sintomatologia bastante variada, incluindo aqui a diminuição na atividade exploratória e na ingestão de alimentos (LARSON; DUNN, 2001). O LPS pode inclusive agir no hipotálamo por meio das citocinas, nas áreas relacionadas à alimentação, levando a doença anoréxica (BECSKEI et al., 2008). Os dados obtidos aqui estão parcialmente de acordo com os da literatura, quando se enfoca a atividade geral e ingestão alimentar; entretanto, as fêmeas não apresentaram febre após o tratamento. De fato, a temperatura corpórea normal de um rato é de 35,9 a 37,5°C e o aumento observado às 48 horas nos animais tratados com LPS (36,69°C) está dentro da normalidade (SHARP; LAREGINA, 1998). A febre é um sintoma comum do comportamento doentio (ELMQUIST; SCAMMELL; SAPER, 1997; FORTIER et al., 2004), sugerindo um processo inflamatório

brando e induzido tardiamente. Neste sentido, é documentado que ratas têm resposta febril atenuada ao LPS durante a gestação (FOFIE; FEWELL, 2003).

O prejuízo da viabilidade da prole, expresso pelo número inferior de filhotes nascidos das ratas expostas ao LPS, comparado com o grupo controle, sugere que estas ratas apresentaram reabsorção de filhotes. De fato, o LPS pode induzir aborto espontâneo, reabsorção embrionária e mortalidade intra-uterina (AVITSUR; COHEN; YIRMIYA, 1997; XU et al., 2006; ZHAO et al., 2008).

O tratamento pré-natal com LPS não interferiu no desenvolvimento físico e reflexológico, inclusive no peso individual dos animais nos diferentes períodos da sua vida: PND 2, PND 21 e PND 60, ou seja, na infância e idade adulta. Neste sentido, Collins et al. (1994) mostraram um efeito bifásico do LPS administrado a hamsters no GD 8, com aumento do peso corpóreo dos filhotes tratados pré-natalmente com LPS na dose de 3 µg / kg e redução no mesmo, quando a dose aplicada era de 100 µg / kg. Presentemente, a falta de efeitos do LPS sobre o peso corpóreo da prole pode ser consequência da menor sensibilidade ao LPS nos nossos animais, diferenças na espécie e dia de tratamento. No caso, uma maior nutrição pós-natal da prole em função de um menor número de filhotes nascidos, foi compensada pela padronização da prole em 8 filhotes por fêmea, portanto não seria este fator determinante da ausência de alterações no peso corporal da prole.

Em campo aberto, a atividade geral da prole masculina tratada pré-natalmente com LPS não se mostrou significativamente diferente daquela dos animais do grupo controle, incluindo aqui parâmetros exploratórios como distância percorrida e frequência de levantar. Portanto, parece que este tratamento também não alterou a atividade motora dos filhotes. Esses achados estão de acordo com os reportados por Meyer et al. (2005), que ativaram o sistema imune pela administração de PolyI:C em camundongos fêmeas no GD 9, os quais não observaram alterações motoras (distância percorrida), mas com tendência visual de diminuição neste parâmetro comportamental, de modo similar ao observado no presente trabalho. Esses autores atribuíram esta pequena redução como sendo de natureza emocional e não motora, desde que esses animais apresentaram ainda outros sintomas, como aumento de neofobia. Portanto, a exposição pré-natal ao LPS levaria a distúrbios emocionais na prole. Essa hipótese pode também explicar a redução do comportamento de auto-limpeza aqui observado, uma vez que o mesmo ocorre em situações de baixo estímulo, como observado após a habituação em exposição repetida ao campo aberto (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1979; BERNARDI; DE-SOUZA; PALERMO-NETO, 1981).

Dessa forma, não só a ausência de alterações na atividade geral em campo aberto, bem como aquela observada na catatonia e estereotipia, descartam a hipótese de que a administração pré-natal de LPS tenha modificado a atividade motora da prole masculina.

O comportamento de brincar da prole masculina tratada pré-natalmente com LPS foi reduzido no PND 30, não apenas o brincar propriamente dito (*pinning*), mas também aqueles de solicitação de brincar (farejar o parceiro, montar no parceiro e passar sobre ou sob o parceiro). Não foram detectadas interferências no parâmetro locomoção, ligado ao aspecto motor / exploratório, o que concorda com os achados no campo aberto. Além disso, o comportamento de brincar anormal foi observado somente nos filhotes tratados pré-natalmente com LPS que foram isolados. O comportamento de *pinning* não foi modificado entre os dois dias de observação, sugerindo que a exposição prévia ao parceiro não foi capaz de modificar este comportamento. Por outro lado, passar sobre / sob, montar e perseguir, que são comportamentos de solicitações, foram atenuados.

No presente trabalho, somente os filhotes machos foram estudados, uma vez que existem diferenças claras quanto ao sexo do indivíduo e a brincadeira. Meaney, Stewart e Beatty (1985) em uma revisão, concluem que na maioria das espécies estudadas até hoje, o macho brinca mais que a fêmea. Apenas em lobos, cães, coiotes, gatos e gerbilos, a fêmea brinca tanto quanto o macho. Em nenhum dos estudos revistos, a fêmea despende mais tempo em brincadeira do que o filhote macho. No caso específico de roedores, ratos machos iniciam mais comportamentos de brincadeira do que fêmeas (POOLE; FISH, 1976; MEANEY; STEWART, 1981; THOR; HOLLOWAY, 1983). Além disso, fêmeas interrompem mais freqüentemente um episódio de brincadeira do que machos (MEANEY; STEWART; BEATTY, 1985) e os eventos de interação lúdica entre elas tendem a ser mais curtos (HOLE, 1988).

A exposição a andrógenos durante períodos precoces do desenvolvimento cerebral influencia a freqüência da brincadeira durante o período juvenil. Observou-se que a administração de testosterona (androgênio primário), ainda no período neonatal, masculiniza o comportamento social de ratas fêmeas - incluindo a brincadeira (OLIOFF; STEWART, 1978; WARD; STEHM, 1991; PELLIS; MCKENNA, 1992; PELLIS; PELLIS; KOLB, 1992; PELLIS; PELLIS; MCKENNA, 1994). Comprovaram também empiricamente que o estresse pré-natal da mãe provocou diminuição da brincadeira em ratos machos. Portanto, parece que a diferenciação sexual da brincadeira é devida, em parte, a ação hormonal que ocorre mesmo antes do nascimento (MEANEY, 1988).

O comportamento de brincar é o primeiro comportamento que ocorre em animais jovens não dirigidos à mãe, sendo bastante freqüente na vida de animais jovens, principalmente mamíferos. O estudo deste comportamento pode ser considerado um meio pelo qual é possível compreender como ocorre o desenvolvimento comportamental e social. É fato que existem incongruências e problemas no estudo científico da brincadeira, sendo que este comportamento permanece um enigma biológico (nem sempre é possível identificar suas funções para o indivíduo ou para a espécie, embora os custos sejam mais visíveis) que pode e deve ser mais bem investigado (FAGEN, 1977; PANKSEPP, 1981; MARTIN; CARO, 1985).

A brincadeira parece não ter uma importância biológica prontamente percebida, pois não representa um ato consumatório que pode ser visto em outros comportamentos (BEKOFF; ALLEN, 1998). O que se observa é a alternância de quem é dominado e dominante (PANKSEPP; BEATTY, 1980; JANUS, 1987) e padrões motores repetitivos e usados exageradamente (FAGEN, 1981). Segundo Bekoff e Allen (1998), brincadeira é toda atividade motora que o indivíduo apresenta após o nascimento e que parece não ter um objetivo imediato, no qual padrões motores de outros contextos podem ser usados de forma modificada e alterada em termos de seqüência temporal. No caso da brincadeira social em roedores, embora possam ser usados comportamentos de outros contextos, tais como agressividade e interação sexual, eles são usados de forma exagerada ou incompleta (VANDERSCHUREN; NIESINK; VAN-REE, 1997).

Esses comportamentos seriam uma forma de metacomunicação, informando ao parceiro que a interação a seguir é de “brincadeira” e não de “verdade” (VIEIRA; SARTORIO, 2002).

De um modo geral, pode-se dizer que a brincadeira, além de ter características específicas, compartilha propriedades em comum com outros sistemas motivacionais indispensáveis para a sobrevivência do indivíduo, tais como o comer e o beber. Por exemplo, é bem estabelecido na literatura que após um período de isolamento social, o comportamento de brincadeira aumenta significativamente (PANKSEPP; BEATTY, 1980; THOR; HOLLOWAY, 1984).

Quando observado aos pares, onde um rato é previamente isolado (e o outro é mantido agrupado), este inicia de forma mais intensa a brincadeira, quando comparado aos animais agrupados. Portanto, o isolamento social acentua os episódios de interações sociais quando existe subsequente pareamento de animais (FILE; SETH, 2003). A solicitação de brincar nos ratos isolados ocorre inclusive independentemente da capacidade dos agrupados em estar envolvidos na brincadeira (VANDERSCHUREN; NIESINK; VAN-REE, 1997).

Por este motivo e para incrementar a expressão do brincar, é que neste trabalho animais foram isolados e brincaram com agrupados. Neste sentido, esta manipulação mostrou-se importante, pois as alterações decorrentes do tratamento pré-natal só foram aparentes nos animais isolados: o comportamento de *pinning*, no primeiro dia de observação, foi reduzido nos animais tratados pré-natalmente com o LPS que foram isolados, mas não naqueles agrupados. Esta redução foi persistente nestes animais no segundo dia de observação, assim como o parâmetro farejar, ligado à solicitação de brincadeira.

Portanto, foi observado que filhotes isolados de ratas tratadas ou não com LPS exibiram significativamente mais solicitações de brincar que os agrupados. Entretanto, a exposição pré-natal ao LPS reduziu a brincadeira e as suas solicitações somente nos animais isolados.

Além disso, o comportamento de auto-limpeza testado em campo aberto foi reduzido neste grupo experimental. Tanto o comportamento de brincar como o comportamento de limpeza podem representar um decréscimo na motivação dos filhotes como consequência da exposição pré-natal a endotoxina.

Outro fato interessante de ressaltar é que ocorre o processo de saciedade do brincar. De fato, em ratos, constata-se que a frequência da brincadeira decai com o passar do tempo (HOLE, 1991; VIEIRA; OTTA, 1997). Através de um experimento realizado com hamsters dourados, verificaram que após períodos de 8, 24 e 48 horas de isolamento social, o tempo despendido em brincadeira foi proporcional ao período em que os animais ficaram sozinhos. No entanto, não houve diferença entre os grupos com relação ao tempo despendido em contato físico. Esse resultado indica que os efeitos do isolamento social não foram os mesmos para as diferentes categorias de comportamento. Por outro lado, notou-se decréscimo gradativo no tempo de brincadeira ao longo da sessão experimental, em todos os grupos, o que indica um processo de saciedade (VIEIRA, 2001).

Dessa forma, os dados indicando atenuação nos comportamentos de solicitação de brincar na segunda sessão de observação podem ser consequência da prévia exposição à brincadeira. Este fato foi reforçado porque os pares de animais foram os mesmos na primeira e segunda sessão, não havendo no caso o fator “novidade de parceiro” que poderia aumentar a solicitação de brincar.

No esquema experimental empregado, os animais tratados foram pareados com animais não tratados, permitindo estimar separadamente os efeitos do tratamento infeccioso no comportamento de ratos isolados e agrupados (PLETNIKOV et al., 1999) e impedindo que reduções na solicitação de brincar do parceiro da brincadeira pudessem reduzir o brincar *per*

se. Com isso, pode-se concluir que o menor envolvimento na brincadeira por parte dos animais tratados pré-natalmente com LPS não foi consequência da falta de comportamentos de solicitação de brincar dos parceiros, pois os mesmos não foram expostos ao LPS.

Sabe-se que quando as solicitações para brincar não são respondidas, ratos acabam diminuindo tais comportamentos. Thor e Holloway (1983) manipularam o comportamento social do parceiro de ratos com auxílio de drogas. Formaram-se duplas de ratos jovens e um dos parceiros tinha seu comportamento alterado através de drogas. Em um dos grupos, o parceiro recebeu doses de clorpromazina e em outro de anfetamina. Essas drogas diminuem a frequência de brincadeira, sendo que a primeira é depressiva e pode causar aumento na frequência de comportamentos amigáveis (não incluindo a brincadeira), como, por exemplo, farejar o companheiro, mover-se em sua direção ou simplesmente manter-se em contato físico com ele. A anfetamina causa hiper-atividade e este fato reduz a interação social por predomínio da motricidade do animal tratado. Constatou-se que os animais tratados com drogas foram menos preferidos, em comparação com grupos controles, em que os animais eram expostos a um parceiro normal. Isto sugere que o comportamento de brincar foi importante para determinar a atratividade animal que estava sendo testada.

O fator que interfere decisivamente no comportamento lúdico é a idade do indivíduo. Já é bem documentada na literatura que a brincadeira é uma atividade característica de animais jovens que estão em desenvolvimento. No rato, a brincadeira aparece em torno do PND 15, aumenta de frequência nos dias posteriores e atinge um pico por volta do PND 36, decaindo posteriormente (MEANEY; STEWART, 1981). Após esse período o nível de tolerância entre os indivíduos decai e, conseqüentemente, diminui também a taxa de contato físico e outras formas de interação social, como a brincadeira.

Esta foi a razão pela qual em nossos experimentos foram escolhidos os PND 30 e 31 para os testes do comportamento de brincar.

Segundo Fagen (1981), os benefícios da brincadeira podem ser enquadrados em seis hipóteses: 1) treinamento físico; 2) desenvolvimento de habilidades sociais; 3) regulação da taxa de desenvolvimento; 4) competição intra-específica; 5) promoção de vínculos e coesão social; e 6) aprendizagem de informações específicas.

Assim, a brincadeira pode servir para desenvolver e manter vínculos sociais. A interação lúdica pode facilitar a manutenção de laços sociais e a integração na estrutura social do grupo, como é caso do rato albino que desde o desmame até o início da maturidade sexual - período em que a brincadeira é mais freqüente - a frequência com que um parceiro fica sobre o outro ou lança ataques e contra-ataques, torna-se progressivamente assimétrica, ou seja,

começa a ocorrer dominância de um animal sobre o outro (PANKSEPP, 1981; MEANEY; STEWART; BEATTY, 1985; PELLIS; PELLIS, 1991). Contudo, não foram os animais que apresentaram as maiores taxas de início de brincadeira que se tornaram dominantes em idades mais avançadas. Parece que o padrão de comportamento de ratos subordinados, mesmo durante as interações lúdicas, tem como função a manutenção de laços de amizade, permitindo a coexistência pacífica em colônias (PELLIS; PELLIS, 1992).

Em ratos albinos, a brincadeira parece ser indispensável para o desenvolvimento adequado de enfrentamento relacionado com o ambiente social (VAN DEN BERG et al., 1999). Ratos jovens foram privados de interações sociais durante um período de pico de brincadeiras sociais, apresentando decréscimo da atividade social, incluindo o comportamento sexual, sem alterações na atividade locomotora ou o desempenho do animal no teste de cruz elevada (MEANEY; STEWART, 1981).

No presente trabalho, verificou-se que animais expostos na gestação ao LPS não só apresentaram redução no comportamento de brincar como na interação social na idade adulta.

Portanto, tomando-se em conjunto os resultados da atividade geral observada em campo aberto e a locomoção medida no comportamento de brincar, mostrando ausência de alterações motoras associadas à redução do comportamento de brincar, tanto da solicitação como do *pinning* e da interação social na idade adulta, pode-se sugerir que o tratamento pré-natal com LPS no GD 9,5 tenha prejudicado de forma persistente a atividade social da prole de ratas.

A análise dos níveis de neurotransmissores e metabólitos no cérebro da prole masculina (PND 60) mostrou um decréscimo significativo nos níveis de DA e seus metabólitos (DOPAC e HVA) estriatal. É sabido que filhotes de ratas gestantes tratadas com LPS no GD 10,5 têm uma permanente e significante perda de neurônios dopaminérgicos (LING et al., 2002). O LPS pré-natal pode ainda causar uma perda significativa permanente de células imunorreativas de tirosina hidroxilase, um marcador neural de DA.

É demonstrado ainda que a DA está envolvida não só no controle do movimento, mas na sinalização de erro a predição da recompensa, na motivação e na cognição (IKEMOTO, 2007). Sabe-se ainda que infecções pré-natais podem representar fatores de risco para doença de Parkinson, esquizofrenia, autismo e déficit de atenção em crianças hiper-ativas, assim como o abuso as drogas (BROWN, 2006). Da mesma forma, a DA está intimamente associada com comportamentos de busca e recompensa, como aproximação, consumo e vício as drogas (IKEMOTO, 2007). Estudos recentes sugerem que o disparo de neurônios dopaminérgicos é um substrato motivacional para a recompensa. Essa hipótese é baseada na

evidência que, quando a recompensa é maior que a esperada, o disparo de certos neurônios dopaminérgicos aumenta, que consequentemente aumenta o desejo ou a motivação no sentido da recompensa (ARIAS-CARRIÓN; POPPEL, 2007). Com isso, os dados reportados no presente trabalho, mostrando decréscimo dos níveis de DA e seus metabólitos, podem estar ligados ao efeito de redução no comportamento de brincar, no sentido da alteração motivacional dos animais. Em adição, a exposição ao LPS causa efeito a longo prazo no sistema dopaminérgico, uma vez que os experimentos foram realizados no PND 60.

Eventos perinatais têm efeitos a longo prazo no desenvolvimento do sistema nervoso e no comportamento. Além da origem genética das anomalias, fatores ambientais estão sendo correlacionados, e eventos estressantes durante períodos pré- e pós-natal podem causar um desenvolvimento deletério de funções cerebrais (KOEHL et al., 2001). Manipulações estressantes neste período demonstram ser indutoras de alterações a longo prazo, levando a prejuízos cognitivos e emocionais, quando a prole se torna adulta (KOFMAN, 2002). A sensibilidade aumentada do eixo HPA, o sistema endócrino que controla a secreção de hormônios do estresse (corticóides), aparecem como sendo o maior elemento dessas patologias. A disfunção do eixo HPA aparece logo após o nascimento (com três dias) e dura por meses. Desde que o comportamento doentio materno durante a gestação é também acompanhado por estresse materno (KOFMAN, 2002), a exposição ao LPS administrado no GD 9,5 poderia afetar o eixo HPA da prole, sendo responsável por alterações emocionais aqui observadas. Em vista disso, foram avaliados os níveis de neurotransmissores e seus metabólitos hipotalâmicos, em particular da noradrenalina. A falta de efeitos observada nos níveis deste neurotransmissor sugere que o estresse materno pré-natal não tenha alterado a prole, pelo menos por esta via. No entanto, não se pode descartar a hipótese de uma interferência com o eixo HPA, pois os níveis de corticóides não foram medidos nesta prole. Além disto, os metabólitos da NOR, por motivos técnicos, também não foram avaliados.

Os níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no córtex frontal também foram avaliados, pois danos precoces nesta região em humanos podem causar prejuízo nos comportamentos cooperativos e recíprocos, na interação social, e na cognição social (ANDERSON; ULEVITCH, 1999; ESLINGER; FLAHERTY-CRAIG; BENTON, 2004; SCHNEIDER; KOCH, 2005). Como não foram observadas alterações nestes parâmetros, é possível sugerir que a exposição pré-natal ao LPS não provocou danos no córtex frontal da prole das ratas, e que as alterações comportamentais aqui observadas não foram fruto deste processo.

Em se tratando da análise neuroanatômica da prole masculina exposta pré-natalmente ao LPS, não foram encontradas alterações quando se comparou com os animais do grupo controle. Este achado, adicionado ao fato da redução de DA e seus metabólitos no estriado, apontam para um prejuízo funcional e não anatômico no cérebro dos filhotes. No entanto, estes achados não excluem que outras análises mais específicas possam revelar alterações na morfologia cerebral.

Tomados em conjunto, a hipótese para explicar os resultados deste trabalho envolve redução clara na motivação da prole, expressa pelo decréscimo no comportamento de brincar, na interação social na idade adulta, na diminuição da auto-limpeza e na diminuição da DA estriatal.

Desde que o comportamento de brincar é utilizado em estudos de injúrias produzidas por infecções durante a gestação relacionadas ao autismo, pode-se especular que a exposição de ratas gestantes ao LPS no GD 9,5 poderia representar um modelo experimental animal para esta doença (PLETNIKOV et al., 1999).

No autismo ocorre dificuldade na interação social e de compartilhar emoções, bem como demonstrar reciprocidade social ou emocional. Observam-se prejuízos na comunicação, com atraso ou falta de linguagem verbal, grande dificuldade em iniciar ou manter uma conversa, uso estereotipado e repetitivo da linguagem e dificuldade em brincadeiras de "faz de conta". Outro aspecto refere-se à ocorrência de padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades tais como rotinas ou rituais inflexíveis, ou seja, "manias" ou focalização em um único assunto de interesse, maneirismos motores estereotipados (agitar ou torcer as mãos, por exemplo) e preocupação insistente com partes de objetos, em vez do todo (fixação na roda de um carrinho, por exemplo) (SICILE-KIRA, 2004).

Déficits no comportamento de brincar e outras interações sociais em consequência da doença causada pelo vírus Borna em ratos, associada ao desenvolvimento de injúrias no cérebro, suporta o valor da infecção neonatal a esse vírus como sendo um modelo experimental para o autismo (PLETNIKOV et al., 1999). Além disso, outro trabalho, independentemente publicado em 1999, (HORNIG et al., 1999), mostrou anormalidades comportamentais em resultado a exposição neonatal ao vírus Borna. Diversos outros grupos também mostraram que anormalidades comportamentais são frutos de desafios imunes (PATTERSON, 2002; SHI et al., 2003; VOJDANI; PANGBORN; VOJDANI, 2003). Similarmente, perturbações clínicas produzem fenômenos associados ao autismo em modelos animais (RODIER et al., 1997; INGRAM et al., 2000). Em todos esses casos, o ambiente

natural das perturbações potencialmente reproduz as condições vividas por humanos. Adicionando a isso, a ação desses agentes químicos e infecciosos é usualmente de natureza global, em oposição a focos específicos em uma região cerebral. Essa combinação cria tanto um modelo mais completo de autismo, como necessita de interpretações dos resultados mais complexas. As causas do espectro das desordens autistas são desconhecidas, mas estudos clínicos e experimentais indicam que mecanismos imunes, incluindo em particular as citocinas, são fatores contribuintes nessa etiologia (PONZIO et al., 2007).

Portanto, os presentes resultados mostram que uma única dose de LPS, no GD 9,5 de ratas, prejudica a interação social da prole (na infância e na idade adulta), associada a efeitos nos neurotransmissores e metabólitos dopaminérgicos estriatais, sugerindo que a infecção / inflamação materna causa efeitos a longo prazo nos seus filhotes, e que podem representar um modelo animal para estudos autistas. Entretanto, estudos usando outros modelos de autismo, mostram aumento no comportamento de auto-limpeza (CRAWLEY, 2007), um fato não observado neste trabalho. Em vista disso, outros experimentos estão sendo conduzidos em nossos laboratórios para o melhor entendimento do mecanismo que interferiu no comportamento observado e nos efeitos neuroquímicos.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

A administração de LPS (100 µg / kg) em ratas gestantes (no GD 9,5) causou comportamento doentio nestes animais e prejudicou a viabilidade de sua prole.

Essa dose e tratamento também interferiram nos filhotes destes animais, diminuindo o comportamento de auto-limpeza, o comportamento de brincar, a interação social na idade adulta e os níveis de dopamina estriatal e seus metabólitos. Esses efeitos parecem ser de origem emocional, ou motivacional. O sistema motor desses animais não foi afetado, já que a atividade geral e a catatonia e estereotipia induzidas não foram modificadas.

Dessa forma, infecções e inflamações maternas durante a gestação, no caso uma infecção bacteriana, podem resultar em danos cerebrais e prejuízos comportamentais nos seus filhos, persistentes por toda vida.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.

ANDERSON, A. W.; BECHARA, A.; DAMÁSIO, H.; TRANEL, D.; Damásio, A. R. Impairment of social and moral behavior related to early damage in human prefrontal cortex. **Nature neuroscience**, v. 2, n. 11, p. 1032-1037, 1999.

ARIAS-CARRIÓN, O.; PÖPPEL, E. Dopamine, learning, and reward-seeking behavior. **Acta neurobiologiae experimentalis (Wars)**, v. 67, n. 4, p. 481-488, 2007.

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.

AVITSUR, R.; COHEN, E.; YIRMIYA, R. Effects of interleukin-1 on sexual attractivity in a model of sickness behavior, **Physiology & behavior**, v. 31, n. 63, p. 25-30, 1997.

AVITSUR, R.; POLLAK, Y.; YIRMIYA, R. Different receptor mechanisms mediate the effects of endotoxin and interleukin-1 on female sexual behavior. **Brain research**, v. 773, n. 1-2, p. 149-161, 1997.

AVITSUR, R.; YIRMIYA, R. The immunobiology of sexual behavior: gender differences in the suppression of sexual activity during illness. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 64, n. 4, p. 787-796, 1999.

BECSKEI, C.; RIEDIGER, T.; HERNÁDFALVY, N.; ARSENIJEVIC, D.; LUTZ, T. A.; LANGHANS, W. Inhibitory effects of lipopolysaccharide on hypothalamic nuclei implicated in the control of food intake, **Brain behavior, and immunity**, v. 22, n. 1, p. 56-64, 2008.

BEKOFF, M.; ALLEN, C. Intentional communication in social play: how and why animals negotiate and agree to play. In: BEKOFF, M.; BYERS, J. A. (Org.). **Play: evolutionary, comparative and ecological perspectives**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. p. 97-114.

BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Effects of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open field behavior of rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 65, p. 247-250, 1979.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 807-816.

BERNARDI, M. M.; DE SOUZA, H.; PALERMO NETO, J. Effects of single and long-term haloperidol administration on open field behavior of rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 73, p. 171-175, 1981.

BROADHURST, P. L. Experiments in psychogenetics: Applications of biometrical genetics to the inheritance of behaviour. In: EYSENCK, H. J. **Experiments in personality**. London: Routledge & Kegan Paul, 1960. v. 1, p.1-256.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Estrutura celular. In: _____. **Jawetz, melnick & adelberg: microbiologia médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 6-30.

BROWN, A. S. Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. **Schizophrenia bulletin**, v. 32, n. 2, p. 200-202, 2006.

CALDER, P. C. n-3 fatty acids, inflammation, and immunity--relevance to postsurgical and critically ill patients. **Lipids**, v. 39, n. 12, p. 1147-1161, 2004.

CHEZ, M. G.; DOWLING, T.; PATEL, P. B.; KHANNA, P.; KOMINSKY, M. Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. **Pediatric neurology**, v. 36, n. 6, p. 361-365, 2007.

COLLINS, J. G.; SMITH, M. A.; ARNOLD, R. R.; OFFENBACHER, S. Effects of *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on pregnancy outcome in the golden hamster. **Infection and immunity**, v. 62, n. 10, p. 4652-4655, 1994.

CRAWLEY, J. N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. **Brain pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 17, n. 4, p. 448-459, 2007.

DANTZER, R. EuroConference on cytokines in the brain: Expression and action of cytokines in the brain and pathophysiological implications. **Brain, behavior, and immunity**, v. 19, n. 3, p. 263-267, 2005.

DANTZER, R.; BLUTHÉ, R. M.; LAYÉ, S.; BRET-DIBAT, J. L.; PARNET, P.; KELLEY, K. W. Cytokines and sickness behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, p. 586-590, 1998.

DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. **Brain, behavior, and immunity**, v. 21, n. 2, p. 153-160, 2007.

DESESSO, J. M. Comparative features of vertebrate embryology, In: HOOD, R. D. **Developmental and reproductive toxicology: a practical approach**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2006.

DUNN, A. J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clinical neuroscience research**, v. 6, p. 52-68, 2006.

ELMQUIST, J. K.; SCAMMELL, T. E.; SAPER, C. B. Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response, **Trends in neuroscience**, v. 20, n. 12, p. 565-570, 1997.

ENGEL, J. A.; ZHANG, T.; BERGSTRÖM, N.; CONRADI, N.; FORKSTAM, C.; LILJEROTH, A.; SVENSSON, L. Neonatal herpes simplex virus type 1 brain infection affects the development of sensorimotor gating in rats. **Brain research**, v. 863, n. 1-2, p. 233-240, 2000.

ESLINGER, P. J.; FLAHERTY-CRAIG, C. V.; BENTON, A. L. Developmental outcomes after early prefrontal cortex damage. **Brain and cognition**, v. 55, n. 1, p. 84-103, 2004.

FAGEN, R. M. **Animal play behavior**. New York: Oxford University Press, 1981.

FAGEN, R. M. Selection for optimal age-dependent schedules of play behavior. **American naturalist**, v. 111, p. 395-414, 1977.

FAGGIN, B. M.; PALERMO-NETO, J. Differential alterations in brain sensitivity to amphetamine and pentylentetrazol in socially deprived mice. **General pharmacology**, v. 16, n. 3, p. 299-302, 1985.

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, n. 4, p. 253-256, 1996.

FENTON M. J.; GOLENBOCK, D. T. LPS-binding proteins and receptors. **Journal of leukocyte biology**, v. 64, n. 1, p. 25-32, 1998.

FILE, S. E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 35-53, 2003.

FOFIE, A. E.; FEWELL, J. E. Influence of pregnancy on plasma cytokines and the febrile response to intraperitoneal administration of bacterial endotoxin in rats. **Experimental physiology**, v. 88, n. 6, p. 747-754, 2003.

FORTIER, M. E.; JOOBER, R.; LUHESHI, G. N.; BOKSA, P. Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine-induced locomotion and startle responses in adult rat offspring. **Journal of psychiatric research**, v. 38, n. 3, p. 335-345, 2004.

FORTIER, M. E.; LUHESHI, G. N.; BOKSA, P. Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. **Behavioral brain research**, v. 181, n. 2, p. 270-277, 2007.

GAYLE, D. A.; BELOOSESKY, R.; DESAI, M.; AMIDI, F.; NUNEZ, S. E.; ROSS, M. G. Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 286, n. 6, p. R1024-R1029, 2004.

GERENUTTI, M. **Efeitos da doramectina em ratos: estudos comportamentais e neuroquímicos**. 1996. 170 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

GOLAN, H. M.; LEV, V.; HALLAK, M.; SOROKIN, Y.; HULEIHEL, M. Specific neurodevelopmental damage in offspring following maternal inflammation during pregnancy. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 6, p. 903-917, 2005.

HARJU, K.; OJANIEMI, M.; ROUNIOJA, S.; GLUMOFF, V.; PAANANEN, R.; VUOLTEENAHU, R.; HALLMAN, M. Expression of toll-like receptor 4 and endotoxin responsiveness in mice during perinatal period. **Pediatric research**, v. 57, n. 5, p. 644-648, 2005.

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

HAVA, G.; VERED, L.; YAEL, M.; MORDECHAI, H.; MAHOUD, H. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. **Developmental psychobiology**, v. 48, n. 2, p. 162-168, 2006.

HOLE, G. Temporal feature of social play in the laboratory rat. **Ethology**, v. 52, p. 1-5, 1988.

HOLE, G. The effects of social deprivation on levels of social play in the laboratory rat (*Rattus norvegicus*). **Behavioral process**, v. 25, p. 41-53, 1991.

HOLSON, J. F.; NEMEC, M. D.; STUMP, D. G.; KAUFMAN, L. E.; LINDSTÖM, P.; VARSHO, J. Significance, reliability, and interpretation of developmental and reproductive toxicity study findings. In: HOOD, R. D. **Developmental and reproductive toxicology: a practical approach**. 2. ed. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2006. p. 329-424.

HORNIG, M.; WEISSENBOCK, H.; HORSCROFT, N.; LIPKIN, W. I. An infection-based model of neurodevelopmental damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 21, p. 12102-12107, 1999.

IKEMOTO, S. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. **Brain research reviews**, v. 56, n. 1, p. 27-78, 2007.

INGRAM, J. L.; PECKHAM, S. M.; TISDALE, B.; RODIER, P. M. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. **Neurotoxicology and teratology**, v. 22, n. 3, p. 319-324, 2000.

JANUS, K. Early separation of young rats from the mother and the development of play fighting. **Physiology & behavior**, v. 39, n. 4, p. 471-476, 1987.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 99-106.

KENT, S.; BLUTHÉ, R. M.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Sickness behavior as a new target for drug development. **Trends in pharmacological sciences**, v. 13, n. 1, p. 24-28, 1992.

KOEHL, M.; LEMAIRE, V.; VALLÉE, M.; ABROUS, N.; PIAZZA, P. V.; MAYO, W.; MACCARI, S.; LE MOAL, M. Long term neurodevelopmental and behavioral effects of perinatal life events in rats. **Neurotoxicity research**, v. 3, n. 1, p. 65-83, 2001.

KOFMAN, O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 26, n. 4, p. 457-470, 2002.

LARSON, S. J.; DUNN, A. J. Behavioral effects of cytokines. **Brain, behavior, and immunity**, v. 15, n. 4, p. 371-387, 2001.

LEITE, L. G.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; PIACENTI, A.; ARAGÃO, M.; SCHONS, S. V. Susceptibilidade de animais de laboratório à intoxicação por *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae). **Pesquisa veterinária brasileira**, v. 22, n. 2, p. 73-78, 2002.

LENT, R. As unidades do sistema nervoso. In: _____. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 65-95.

LEVITON, A.; DAMMANN, O.; DURUM, S. K. The adaptive immune response in neonatal cerebral white matter damage. **Annals of neurology**, v. 58, n. 6, p. 821-828, 2005.

LING, Z.; GAYLE, D. A.; MA, S. Y.; LIPTON, J. W.; TONG, C. W.; HONG, J. S.; CARVEY, P. M. In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 17, n. 1, p. 116-124, 2002.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian journal of biology**, v. 62 n. 4, p. 609-614, 2002.

MARTIN, P.; CARO, T. M. On the functions of play and its role in behavioral developmental. **Advances in the study of behavior**, v. 15, p. 59-103, 1985.

MEANEY, M. J. The sexual differentiation of social play. **Trends in neurosciences**, v. 11, n. 2, p. 54-58, 1988.

MEANEY, M. J.; STEWART, J. A descriptive study of social development in the rat (*Rattus norvegicus*). **Animal behavior**, v. 29, p. 34-45, 1981.

MEANEY, M. J.; STEWART, J.; BEATTY W. W. Sex differences in social play: the socialization of sex roles. **Advances in the study of behavior**, v. 15, p. 1-56, 1985.

MEYER, U.; FELDON, J.; SCHEDLOWSKI, M.; YEE, B. K. Towards an immuno-precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 29, n. 6, p. 913-947, 2005.

MIMS, C. et al. **Microbiologia médica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1999. 501-534 p.

MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. **International immunopharmacology**, v. 3, n. 1, p. 119-128, 2003.

NOLDUS INFORMATION TECHNOLOGY. **EthoVision**: video tracking, motion analysis & behavior recognition system. Wageningen, 1997. Reference Manual.

NORTON, S. Methods for behavioral toxicology. In: HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**. 2. ed. New York: Raven, 1989. p. 553-571.

OLIOFF, M.; STEWART, J. Sex differences in the play behavior of prepubescent rats. **Physiology & behavior**, v. 20, p. 113-115, 1978.

PANKSEPP, J. The ontogeny of play in rats. **Developmental psychobiology**, v. 14, p. 327-332, 1981.

PANKSEPP, J.; BEATTY, W. W. Social deprivation and play in rats. **Behavioral and neural biology**, v. 30, p. 197-206, 1980.

PATTERSON, P. H. Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. **Current opinion in neurobiology**, v. 12, n. 1, p. 115-118, 2002.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Neural regulators of innate immune responses and inflammation. **Cellular and molecular life sciences**, v. 61, n. 18, p. 2322-2331, 2004.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1998.

PELLIS, S. M.; MCKENNA, M. M. Intrinsic and extrinsic influences on play fighting in rats: effects of dominance, partner's playfulness, temperament and neonatal exposure to testosterone propionate. **Behavioural brain research**, v. 50, p. 135-145, 1992.

PELLIS, S. M.; PELLIS V. C. Juvenitized play fighting in subordinate male rats. **Aggressive behavior**, v. 18, p. 449-457, 1992.

PELLIS, S. M.; PELLIS V. C. Role reversal changes during the ontogeny of play fighting in male rats: attack versus defense. **Aggressive behavior**, v. 17, p. 179-189, 1991.

PELLIS, S. M.; PELLIS V. C. ; KOLB, B. Neonatal testosterone augmentation increases juvenile play fighting but does not influence the adult dominance relationships of male rats. **Aggressive behavior**, v. 18, p. 437-447, 1992.

PELLIS, S. M.; PELLIS V. C.; MCKENNA, M. M. Feminine dimension in the play fighting of rats (*Rattus norvegicus*) and its defeminization neonatally by androgens. **Journal of comparative psychology (Washington, D. C., 1983)**, v. 108, n. 1, p. 68-73, 1994.

PERRY, V. H. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. **Brain, behavior, and immunity**, v. 18, n. 5, p. 407-413, 2002.

PLETNIKOV, M. V.; RUBIN, S. A.; VOGEL, M. W.; MORAN, T. H.; CARBONE, K. M. Effects of genetic background on neonatal Borna disease virus infection-induced neurodevelopmental damage I. Brain pathology and behavioral deficits. **Brain research**, v. 944, p. 97-107, 2002.

PONZIO, N. M.; SERVATIUS, R.; BECK, K.; MARZOUK, A.; KREIDER, T. Cytokine levels during pregnancy influence immunological profiles and neurobehavioral patterns of the offspring. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1107, p. 118-128, 2007.

POOLE, T. B.; FISH, J. An investigation of individual, age, and sexual differences in the play of *Rattus norvegicus* (Mammalia: Rodentia). **Journal of the Zoological Society, London**, v. 179, p. 249-260, 1976.

RODIER, P. M.; INGRAM, J. L.; TISDALE, B.; CROOG, V. J. Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. **Reproductive toxicology (Elmsford, N. Y.)**, v. 11, n. 2-3, p. 417-422, 1997.

ROMERO, R.; ESPINOZA, J.; GONÇALVES, L. F.; KUSANOVIC, J. P.; FRIEL, L.; HASSAN, S. The role of inflammation and infection in preterm birth. **Seminars in reproductive medicine**, v. 25, n. 1, p. 21-39, 2007.

SALUK-JUSZCZAK, J.; WACHOWICZ, B. The proinflammatory activity of lipopolysaccharide. **Postepy biochemii**, v. 51, n. 3, p. 280-287, 2005.

SCHNEIDER, M.; KOCH, M. Deficient social and play behavior in juvenile and adult rats after neonatal cortical lesion: effects of chronic pubertal cannabinoid treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 5, p. 944-957, 2005.

SCHWARZ, A.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M.; DAGLI, M. L. Z.; SPINOSA, H. S. Effects of *Ipomoea carnea* aqueous fraction intake by dams during pregnancy on the physical and neurobehavioral development of rat offspring. **Neurotoxicology and teratology**, v. 25, p. 615-626, 2003.

SETLER, P.; SARAU, H.; MCKENZIE, G. Differential attenuation of some effects of haloperidol in rats given scopolamine. **European journal of pharmacology**, v. 39, n. 1, p. 117-126, 1976.

SHARP, P. E.; LAREGINA, M. C. Important biological features. In: _____. **The laboratory animal pocket reference series: the laboratory rat**. Boca Raton: CRC Press, 1998. p. 1-20.

SHI, L.; FATEMI, S. H.; SIDWELL, R. W.; PATTERSON, P. H. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. **The journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 297-302, 2003.

SICILE-KIRA, C. **Autism spectrum disorders: the complete guide to understanding autism, Asperger's syndrome, pervasive developmental disorder, and other ASDs**. New York: The Berkeley Publishing Group, 2004.

SMITH, S. E.; LI, J.; GARBETT, K.; MIRNICS, K.; PATTERSON, P. H. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. **The journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 40, 10695-10702, 2007.

SPENCER, S. J.; MOUIHATE, A.; GALIC, M. A.; ELLIS, S. L.; PITTMAN, Q. J. Neonatal immune challenge does not affect body weight regulation in rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 293, n. 2, p. R581-589, 2007.

THOR, H. D.; HOLLOWAY, Jr., W. R. Developmental analysis of social play behavior in juvenile rats. **Bulletin of the Psychonomic Society**, v. 22, p. 587-590, 1984.

THOR, H. D.; HOLLOWAY, Jr., W. R. Play-solicitation behavior in juvenile male and female rats. **Animal learning & behavior**, v. 11, p. 173-178, 1983.

URAKUBO, A.; JARSKOG, L. F.; LIEBERMAN, J. A.; GILMORE, J. H. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. **Schizophrenia research**, v. 47, n. 1, p. 27-36, 2001.

VAN DER BERG, C. L.; HOL, T.; VAN REE, J. M.; SPRUIJT, B. M. Play is indispensable for an adequate development of coping with social challenges in the rat. **Development psychobiology**, v. 34, p. 129-138, 1999.

VANDERSCHUREN, L. J.; NIESINK, L. J.; VAN REE, J. M. The neurobiology of social play behavior in rats. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 21, n. 3, p. 309-326, 1997.

VIEIRA, M. L. Semelhanças e diferenças na estrutura da brincadeira social de hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) isolados e não isolados. **Biotemas**, v. 14, p. 19-36, 2001.

VIEIRA, M. L.; OTTA, E. Efeitos de diferentes períodos de privação social sobre a brincadeira de hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*). **Biotemas**, v. 10, p. 29-46, 1997.

VIEIRA, M. L.; SARTORIO, R. Análise motivacional, causal e funcional da brincadeira e, duas espécies de roedores. **Estudos de psicologia**, v. 7, n. 1, p. 189-196, 2002.

VOJDANI, A.; PANGBORN, J. B.; VOJDANI, E.; COOPER, E. L. Infections, toxic chemicals and dietary peptides binding to lymphocyte receptors and tissue enzymes are major instigators of autoimmunity in autism. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 16, n. 3, p. 189-199, 2003.

WANG, X.; ROUSSET, C. I.; HAGBERG, H.; MALLARD, C. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. **Seminars in fetal & neonatal medicine**, v. 11, n. 5, p. 343-353, 2006.

WARD, I. L.; STEHM, K. Prenatal stress feminizes juvenile play patterns in male rats. **Physiology & behavior**, v. 50, p. 601-605, 1991.

XU, D. X.; CHEN, Y. H.; WANG, H.; ZHAO, L.; WANG, J. P.; WEI, W. Tumor necrosis factor alpha partially contributes to lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal growth restriction and skeletal development retardation in mice. **Toxicology letters**, v. 163, n. 1, p. 20-29, 2006.

YIRMIYA, R.; WEIDENFELD, J.; BARAK, O.; AVITSUR, R.; POLLACK, Y.; GALLILY, R.; WOHLMAN, A.; OVADIA, H.; BEN-HUR, T. The role of brain cytokines in mediating

the behavioral and neuroendocrine effects of intracerebral mycoplasma fermentans. **Brain research**, v. 829, n. 1-2, p. 28-38, 1999.

ZBINDEN, G. Experimental methods in behavioral teratology. **Archives of toxicology**, v. 48, n. 2-3, p. 69-88, 1981.

ZHAO, L.; CHEN, Y. H.; WANG, H.; JI, Y. L.; NING, H.; WANG, S. F.; ZHANG, C.; LU, J. W.; DUAN, Z. H.; XU, D. X. Reactive oxygen species contribute to lipopolysaccharide-induced teratogenesis in mice. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 103, n. 1, p. 149-157, 2008.