EVELISE DE SOUZA MONTEIRO FONSECA

*Participação do sistema opioidérgico e dos
glicocorticóides nas alterações comportamentais e
da imunidade inata induzidas na prole pelo
estresse pré-natal*

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

Departamento:
Patologia

Área de Concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. João Palermo-Neto

São Paulo
2005

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

E/K
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
13/9/05

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1560
FMVZ

Fonseca, Evelise de Souza Monteiro

Participação do sistema opioideérgico e dos glicocorticóides nas alterações comportamentais e da imunidade inata induzidas na prole pelo estresse pré-natal / Evelise de Souza Monteiro Fonseca. – São Paulo : E. S. M. Fonseca, 2005.
169: il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2005.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. João Palemo-Neto.

1. Neuroimunomodulação. 2. Estresse. 3. Catecolaminas.
4. Macrófagos. 5. Neutrófilos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos de um estresse pré-natal em parâmetros comportamentais e imunológicos de uma prole de camundongos", Protocolo nº 09/2001, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Palermo Neto, 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 30/01/2002.

(We certify that the Research "Effects of prenatal stress on behavior and immune parameters in Swiss mice offspring" protocol number 09/2001, under the responsibility of Prof. Dr. João Palermo Neto, 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 01/30/2002 meeting.)

São Paulo, 30 de janeiro de 2002

Profª Drª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FONSECA, Evelise de Souza Monteiro

Título: Participação do sistema opioideérgico e dos glicocorticóides nas alterações comportamentais e da imunidade inata induzidas pelo estresse pré-natal

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÒRIA

A Deus, por tudo que eu sou, tenho e acredito.

A minha grande amiga e querida Mãe:

Mil páginas seriam insuficientes para agradecer a sua presença, força e carinho na minha vida. Não há palavras na sua amada Língua Portuguesa capaz de descrever o meu amor e admiração por você. Muito obrigada pelo exemplo, paciência, confiança e paz. Assim como foi no Mestrado, essa é mais uma vitória nossa. Parabéns! EU TE AMO!

A minha família:

Mano, Tias, Tios, Primos e Queridas “Agregadas”. Muito obrigada. Todos vocês fazem parte da minha vida e dessa conquista. Obrigada por todo amor e carinho que vocês me dão. Adoro vocês!

Ao Edson:

Você aparece de repente, desarrumou tudo, mudou meus planos e resolveu minha vida. Muito obrigada por ter feito da sua casa a nossa casa; muito obrigada alegria que você trouxe à minha vida, muito obrigada pelos novos sonhos e pela vontade de realizá-los todos, um a um. Muito obrigada por me tornar uma pessoa melhor pelo “simples” fato de te amar. Você é muito especial Querido, e estou muito feliz por termos escolhido continuar a vida juntos. O finalzinho dessa jornada é dedicado a você. TE AMO!

Ao meu orientador Professor Doutor João Palermo-Neto:

Foram anos de trabalho juntos. Um longo caminho. Muito obrigada pela oportunidade. Muito obrigada por sempre acreditar em mim e nunca permitir e eu duvidasse da minha competência. Muito obrigada pelo apoio nas horas que eu precisei. Muito obrigada pela paciência. Muito obrigada por ter me ensinado o suficiente para que, partir de agora, eu caminhe com minhas próprias pernas. E tomara que eu seja tão feliz como nesses anos.

*A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado
de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro,
procs nº 99/04228-7, 04/14128-0 e 01/11363-0*

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Jorge Camilo Flório pela dosagem de catecolaminas e, principalmente, pela amizade.

Ao Prof. Dr. Cláudio Alvarenga (VRA-FMVZ-USP) e às técnicas de laboratório Erica e Patrícia pela dosagem hormonal.

Ao Prof. Dr. Luciano Freitas Felício (VPT-FMVZ-USP) pelo carinho e atenção durante todos esses anos.

Aos funcionários do Biotério (VPT-FMVZ-USP): Claudia, Idalina, Rosires, Nelson, Herculano e Luis por cuidar com tanto carinho de mim e dos meus animais.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia (VPT-FMVZ-USP): Priscila, Magali e Ricardo por toda a ajuda nos experimentos.

Às funcionárias das secretarias (VPT-FMVZ-USP): Cristina, Claudia, Silvia, Romeika e Marguiti pela convivência, torcida e carinho.

Às funcionárias da secretaria de pós-graduação da FMVZ-USP pela colaboração.

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

À Ozeni, amiga iluminada, e ao seu anjo Carlos, que me encheram de boas energias e paz quando precisei.

Ao Padre Xavier, pela paz, apoio e carinho.

A Mônica, Silvinha, Patrícia e Dario por nunca me deixar sozinha e sempre me fazer rir de tudo que parecia sem solução. A vida fica fácil com vocês do meu lado. Muito obrigada!

À Fê, Clau, Pri, Célia e todos os meus amigos que cansaram de ouvir que eu não ia sair porque tinha que escrever o relatório, qualificação, seminário, tese... E mesmo assim nunca desistiram de me ter por perto.

A todos os meus amigos de pós-graduação que sempre torceram, riram e choraram comigo.

Obrigada pela companhia, pela descontração e pela convivência. Obrigada por tornar a salinha de pós a minha casa, o meu refúgio. Levo um pedacinho de cada um comigo. Sorte pra todos nós!

Um obrigado especial a todas as pessoas do Grupo de Neuroimunomodulação (VPT-FMVZ-USP). Obrigada pelas discussões, críticas e ajuda nos experimentos. Obrigada por me fazer enxergar muito além do laboratório e do meu trabalho. Obrigada pela acolhida carinhosa e por me ensinar o que é GRUPO.

RESUMO

FONSECA, E. S. M. **Participação do sistema opioide e dos glicocorticóides nas alterações comportamentais e da imunidade inata induzidas na prole pelo estresse pré-natal.** [Role of opioide system and glicocorticoids on behavior and innate immunity alterations induced by prenatal stress]. 2005. 169 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Devido ao seu rápido crescimento, o feto é particularmente vulnerável a insultos e modificações no *milieu* hormonal. Este fato sugere que situações adversas experimentadas pela mãe grávida podem alterar o desenvolvimento e a saúde criança. Em vista das dificuldades metodológicas de se investigar o impacto do estresse pré-natal sobre o desenvolvimento e sobre o comportamento de crianças, muita da informação que se tem sobre este assunto advém de estudos conduzidos em animais de laboratório. Este foi o objeto desta tese, guardando-se sempre os devidos cuidados com as extrapolações. Mais especificamente, avaliamos os efeitos de um estresse pré-natal aplicado no terço final de gestação sobre o comportamento, sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos e macrófagos peritoneais, sobre os níveis de corticosterona e testosterona séricos e sobre a neuroquímica de uma prole de camundongos Swiss, machos e fêmeas avaliados aos 30 dias de vida. Investigamos, também, os efeitos da naloxona (antagonista opioide) e da metirapona (inibidor da síntese de corticosterona), aplicadas antes do estresse materno, sobre os parâmetros descritos acima. Os resultados obtidos mostraram que: 1) o estresse pré-natal aumentou a locomoção total dos machos avaliados em campo aberto; a naloxona aplicada antes do estresse preveniu este efeito; 2) o estresse pré-natal e a injeção de metirapona aumentaram os níveis de ansiedade da prole de machos e fêmeas; a aplicação de metirapona antes do estresse preveniu o aumento da ansiedade nas proles dos dois sexos; 3) a naloxona, seja sozinha ou associada ao estresse materno, diminuiu o *burst* oxidativo dos neutrófilos sanguíneos na prole de machos e fêmeas; a injeção somente de naloxona aumentou a capacidade de fagocitose destas células na prole de fêmeas. 4) o estresse pré-natal diminuiu a capacidade de fagocitose dos macrófagos peritoneais da prole de machos;

o tratamento com naloxona antes do estresse preveniu este efeito; 5) o estresse pré-natal diminuiu o *burst* oxidativo e a fagocitose dos macrófagos peritoneais da prole das fêmeas; a injeção de naloxona antes do estresse gestacional evitou o aparecimento destas alterações; 6) o estresse pré-natal diminuiu os níveis séricos de corticosterona na prole de macho; a naloxona sozinha ou associada ao estresse e a metirapona sozinha aumentaram os níveis deste hormônio; 7) Na prole de fêmeas, o estresse pré-natal aumentou os níveis séricos de corticosterona; o tratamento com metirapona antes da exposição das fêmeas grávidas ao estresse preveniu esse efeito; 8) o estresse pré-natal aumentou o *turnover* de Nor nos machos e nas fêmeas; 9) o tratamento com naloxona aumentou o *turnover* de DA na prole de machos; 10) o tratamento com metirapona aumentou o *turnover* de DA na prole de machos e fêmeas. 11) o estresse pré-natal e os tratamentos com naloxona ou metirapona apresentaram efeitos diferentes em machos e de fêmeas. Em seu conjunto, os presentes resultados mostraram que o estresse pré-natal tem profundos efeitos sobre o desenvolvimento dos animais, podendo as alterações por ele induzidas perdurar até a idade adulta dos animais. Os resultados mostraram, também, que os efeitos do estresse pré-natal podem ser prevenidos quer pelo bloqueio do sistema opióide quer da liberação de corticosterona durante a administração do estímulo aversivo. Sugerimos que as alterações comportamentais e de imunidade inata encontradas neste trabalho estejam ligadas tanto às modificações induzidas pelo estresse no funcionamento do eixo HPA como ao aumento da atividade catecolaminérgica da prole tratada. Estes resultados foram discutidos à luz das interações entre os sistemas nervoso central e imune.

Palavras chave: Neuroimunomodulação. Estresse. Catecolaminas. Macrófagos. Neutrófilos

ABSTRACT

FONSECA, E. S. M. **Role of opioidergic system and glucocorticoids on behavior and innate immunity alterations induced by prenatal stress.** [Participação do sistema opioidérgico e dos glicocorticóides nas alterações comportamentais e da imunidade inata induzidas na prole pelo estresse pré-natal]. 2005. 169 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Due to its rapid growth, the fetus is particularly vulnerable to insults and the attendant changes in its hormonal milieu. This led to the suggestion that adverse life situations experienced by the pregnant mother can induce alterations in the fetal environment and result in deleterious effects on the rate of development and health of the child. In view of the considerable methodological difficulties in assessing the impact of the stress on human mothers, and evaluating its effects on the development and behavior of their children, much of our information about sequelae from gestational stress has been derived from studies in experimental animals. That was the objective of this study, taking into account the required grounds for reasonable comparisons. We particularly aimed the effects of prenatal stress applied from gestational day (GD) 15 to GD19 on behavior, immunological parameters, levels of corticosterone and testosterone and brain neurochemistry of male and female Swiss mice offspring, on post natal day 30. We also study the effects of naloxone (opioid antagonist) and of metyrapone (corticosterone synthesis inhibitor), both applied before prenatal stress, on parameters described above. The results of this work showed that: 1) prenatal stress increased total locomotion in males evaluated in an open field and naloxone treatment before stress prevented this effect; 2) prenatal stress and metyrapone injection increased anxiety levels of male and female offspring. Metyrapone injection before prenatal stress prevented this effect; 3) naloxone, alone or associated to prenatal stress, decreased oxidative burst of blood neutrophils in male and female pups. On the other hand, in female offspring naloxone alone increased blood neutrophil phagocytosis; 4) prenatal stress decreased phagocytosis of peritoneal macrophage and naloxone before stress prevented this effect; 5) prenatal stress decreased oxidative burst and phagocytosis of peritoneal

macrophage in female pups and naloxone treatment before stress prevented this effect; 6) prenatal stress decreased corticosterone serum levels in male offspring and naloxone treatment, alone or associated to stress increased it. 7) In female pups, prenatal stress increased corticosterone serum levels and metyrapone before stress prevented this alteration; 8) gestational stress increased Nor turnover in male and female offspring; 9) naloxone increased DA turnover only in male offspring; 10) metyrapone treatment increased DA turnover in male and female offspring; 11) prenatal stress, naloxone or metyrapone treatment had different effects on male and female offspring. Altogether, these findings show that prenatal stress has relevant effects on animal development; these effects last until adulthood. The results also show that many of prenatal stress effects can be prevented by naloxone or metyrapone, and suggests that the opioid system and corticosterone are important for behavioral and immune modifications linked to prenatal stress. We postulate in this study that the changes observed might be driven by the alteration in the offspring HPA axis and catecholaminergic activity. These results were discussed in the light of an interaction between the central nervous system and the immune system.

Keywords: Neuroimmunomodulation. Stress. Catecholamines. Macrophage. Neutrophyl.

LISTA DE ABREVIATURAS

11βHSD2	- 11 β -hidroxi-esteróide desodrogenase
5-HT	- serotonina
ACTH	- hormônio adrenocorticotrófico
CRH	- hormônio liberador de corticotrofinas
DA	- dopamina
DCFH	- diclorofluoresceína
DOPAC	-ácido 4,4-diidroxifenilacético
Eixo HPA	- eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
EPN	- estresse pré-natal
ERO	- espécie reativa de oxigênio
GD	- dia de gestação
HPLC	- cromatografia líquida de alta pressão
HVA	- ácido homovanílico
IFN	- interferon
IgG	- imunoglobulinaG
IL	- interleucina
LPS	- lipopolissacáride
Met	- metirapona
MHPG	-3-metoxi-4-hidroxifeniletilenoglicol
Nal	- naloxona
NIM	- neuroimunomodulação
Células NK	células <i>Natural Killer</i>
Nor	- noradrenalina
OVA	- ovoalbumina
PMA	- miristato de forbol acetato
PND	- dia pós-natal
POMC	- proopiomelanocortina
PPG	- propilenoglicol
PVN	- núcleo paraventricular do hipotálamo
SAPI	- <i>Staphilococcus aureus</i> conjugado com iodeto de propídeo
sc	subcutâneo
SI	- sistema imune
SNC	- sistema nervoso central
Th	- T <i>helper</i>
TNF	- fator de necrose tumoral

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO¹	18
2 REVISAO DA LITERATURA	21
2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO	21
2.2 DA ATIVIDADE NERVOSA PARA OS PROCESSOS DE IMUNOCOMPETÊNCIA	25
2.3 ESTRESSE E SUAS IMPLICAÇÕES	28
2.4 ESTRESSE PRÉ-NATAL	36
2.5 ALGUMAS CONSIDERAÇÕES SOBRE MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS	48
3 OBJETIVOS	52
3.1 OBJETIVO GERAL	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4 MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1 ANIMAIS	54
4.2 PARÂMETROS REPRODUTIVOS E GESTACIONAIS	55
4.3 APARELHOS E PROCEDIMENTOS	56
4.3.1 Caixa de choque e modelo de estresse	56
4.3.2 Tratamento das mães com naloxona	58
4.3.3 Tratamento das mães com metirapona	58
4.3.4 Sistema de Observação Computadorizada – EthoVision	59
4.3.5 Campo aberto e medida da atividade geral	59
4.3.6 Medida de ansiedade por meio LCE	60
4.3.7 Preparo do sangue para estudo dos neutrófilos	62
4.3.8 Preparo das células da cavidade peritoneal	62
4.3.9 Medida do burst oxidativo e da fagocitose através do citômetro de fluxo	63
4.3.10 Dosagem hormonal – Corticosterona e Testosterona séricas	68
4.3.11 Neuroquímica	69
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	71
5.1 EXPERIMENTO 1 AO EXPERIMENTO 5	71
5.2 EXPERIMENTO 6 AO EXPERIMENTO 10:	72

6 RESULTADOS	74
6.1 EXPERIMENTO 1: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM NALOXONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE A ATIVIDADE GERAL E OS NÍVEIS DE ANSIEDADE DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS	74
6.2 EXPERIMENTO 2: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM NALOXONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS SANGÜÍNEOS DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS	80
6.3 EXPERIMENTO 3: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM NALOXONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE A ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS	85
6.4 EXPERIMENTO 4: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM NALOXONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA E TESTOSTERONA DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SW... ..	89
6.5 EXPERIMENTO 5: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM NALOXONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE A NEUROQUÍMICA DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS	92
6.6 EXPERIMENTO 6: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM METIRAPONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE A ATIVIDADE GERAL E OS NÍVEIS DE ANSIEDADE DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS.	97
6.7 EXPERIMENTO 7: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM METIRAPONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS SANGÜÍNEOS DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS	103
6.8 EXPERIMENTO 8: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM METIRAPONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE A ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS	107
6.9 EXPERIMENTO 9: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM METIRAPONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA E TESTOSTERONA DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS	111

6.10 EXPERIMENTO 10: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM METIRAPONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE A NEUROQUÍMICA DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS.....	113
7 DISCUSSÃO	118
7.1 ESTRESSE PRÉ-NATAL	120
7.2 INTERAÇÃO DO SISTEMA OPIOIDÉRGICO COM O ESTRESSE PRÉ-NATAL	130
7.3 INTERAÇÃO GLICOCORTICÓIDE COM ESTRESSE PRÉ-NATAL	138
8 CONCLUSÕES	146
REFERÊNCIAS	148

1 INTRODUÇÃO¹

Parece intuitivo, para o leigo, o conhecimento de que seja o estresse um fator que predispõe à ocorrência de problemas de saúde. Galeno, em 200 AC, já relatava que mulheres de “sangue quente” tinham maior probabilidade de desenvolver câncer de mama. De fato, a relação entre estresse e sistema imune é há muito tempo pesquisada e reconhecida. Em 1936, Hans Selye descreveu que a aplicação de um estresse em ratos provocava, nos mesmos, atrofia do timo e aumento do peso do baço. Este trabalho foi um dos primeiros dentro da área que investiga as inter-relações entre o sistema nervoso central e o sistema imune, conhecida como *neuroimunomodulação*.

Alguns anos mais tarde descobriu-se que essa relação era bidirecional, ou seja, que o sistema imune modula a atividade do sistema nervoso central através, por exemplo, da liberação de citocinas. Talvez, o melhor exemplo desta interação “de baixo para cima” seja a expressão do *comportamento doentio* induzido experimentalmente pela aplicação intra peritoneal de lipopolissacáride (LPS). Esta síndrome é caracterizada nos animais por alterações comportamentais como queda da libido, diminuição da ingestão alimentar e de líquidos e diminuição da atividade geral avaliada em campo aberto.

Em especial, esta tese de doutorado aborda a seguinte questão: como um estresse físico aplicado durante a gestação pode alterar o comportamento e alguns parâmetros imunes de uma prole de camundongos submetida a ele intra-útero?

¹ As referências bibliográficas estão citadas no item 2 Revisão de Literatura

Alterações comportamentais relacionadas à exposição a um estresse pré-natal já foram descritas em animais e em humanos. De fato, há uma correlação positiva entre a ocorrência de estresse durante a gestação e níveis de agressividade, de ansiedade ou de depressão medidos na prole. Diversos trabalhos realizados em humanos mostraram que a administração de glicocorticóides a mulheres grávidas ou a ocorrência de um estresse durante a gestação estavam relacionados a um baixo peso dos filhos ao nascer. Neste sentido, estudos epidemiológicos mostraram haver correlação positiva entre a redução do peso no nascimento e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas, como diabetes tipo 2, resistência à insulina, hipertensão arterial e infarto. Estresse pré-natal e baixo peso ao nascer também foram associados a diversas desordens psicológicas, como a esquizofrenia e ao suicídio. Estudos em animais corroboraram e explicaram algumas destas alterações. Por exemplo, Weinstock et al. mostraram que ratos estressados no terço final de gestação apresentavam aumento dos níveis e do *turnover* de noradrenalina quando estressados novamente na idade adulta. Neste sentido, sabe-se que alterações dos níveis e *turnover* de noradrenalina no SNC estão ligadas a episódios depressivos. Palermo-Neto et al. mostraram que animais estressados apresentavam um aumento da ansiedade no labirinto em cruz elevado fato este também relatado em seres humanos.

Diversos trabalhos mostraram que a exposição a um estresse pré-natal altera a atividade imune de ratos e camundongos. Fonseca et al. mostraram que um estresse por choque nas patas, isto é, igual ao que será utilizado nesta tese, foi capaz de alterar a atividade de macrófagos peritoneais de uma prole de camundongos avaliados em 2 idades: aos 30 e aos 60 dias. Sobrian et al. mostraram que a exposição de fêmeas grávidas a um estresse por contenção e luz, no terço final de gestação, diminuía os níveis de IgG da prole avaliada em diversos momentos após o nascimento e até o desmame.

Vários trabalhos relacionaram estresse pré-natal a alterações hormonais da prole. Embora contraditórios, alguns trabalhos relataram que o estresse pré-natal altera os níveis de glicocorticóides e de testosterona da prole.

Diversos pesquisadores tentaram explicar quais mecanismos poderiam levar a estas alterações. Barbazanges et al. mostraram que a adrenalectomia de ratas grávidas revertia tanto o aumento do número de receptores para CRF do tipo I no hipotálamo como o aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona observados na prole adulta e estressada *in utero*. Outros autores também creditaram aos glicocorticóides maternos os efeitos do estresse pré-natal na prole.

Por outro lado, alguns trabalhos mostraram ser possível reverter algumas alterações comportamentais relacionadas ao estresse pré-natal através do bloqueio do sistema opioidérgico, mostrando estes achados uma importante relação entre a ativação deste sistema e o estresse pré-natal.

O objetivo desta tese foi verificar se um estresse aplicado no terço final da gestação a camundongas poderia interferir com o comportamento e com o sistema imune inato da prole. Foi, também, objetivo deste trabalho “traduzir” estas prováveis alterações comportamentais e de imunidade em termos neuroquímicos e hormonais. Por fim, investigamos se um bloqueio do sistema opioidérgico ou do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA) da mãe e/ou do feto seria capaz de reverter as alterações observadas na prole de camundongos machos e de fêmeas estressadas *in utero*.

Os dados encontrados foram discutidos à luz dos fenômenos de neuroimunomodulação. Acreditamos que a riqueza dos resultados obtidos e a importância do tema corroborem para as discussões que têm sido feitas nas mais diferentes esferas de estudo, sejam estas relacionadas à neurociência ou às humanidades.

2 REVISAO DA LITERATURA

Transcreve-se abaixo uma revisão dos dados de literatura mais relevantes e por nós considerados como necessários para a compreensão deste trabalho.

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO

Muito antes do conhecimento das múltiplas interações entre os sistemas nervoso, endócrino e imune, já se suspeitava que as emoções pudessem influenciar o bem estar dos seres humanos. Aproximadamente 200 AC, Galeno ensinava que mulheres melancólicas eram mais susceptíveis ao desenvolvimento de um tumor de mama que as chamadas, “mulheres de sangue quente” (DUNN, 1988; STERNBERG, 1997). Calzolari¹ (1898 apud LAWRENCE; KIM, 2000) mostrou que os hormônios gonadais influenciavam a celularidade do timo. Selye (1936) relatou que a exposição de ratos ao frio resultava em um aumento do peso das adrenais e na involução do timo.

As alterações fisiológicas observadas em resposta ao estresse são hoje estudadas dentro de uma disciplina chamada Neuroimunomodulação. Depois de Selye (1936), outros trabalhos mostraram a interação funcional entre os sistemas nervoso, endócrino e imune (ADER, 1980; BROOKS et al., 1982; FELSZEGHY; GASPAR; NYAKAS, 1996; FRIEDMAN; GLASGOW; ADER, 1969; SPECTOR, 1996).

¹CALZOLARI, A. Recherches expérimentales sur un rapport probable entre la fonction du thymus et celle des testicules. **Archives of Italiane Biologie**, v. 30, p. 71-80, 1989.

Atualmente, o acúmulo de evidências na área de estudo abarcada pela neuroimunomodulação (NIM) permite afirmar, sem a menor dúvida, que os sistemas neuro-endócrino e imune interagem entre si e de forma bidirecional. Hoje, sabe-se que várias doenças, aparentemente desconectadas, como infecções, asma, alergias, câncer, anorexia nervosa, doença de Alzheimer e esclerose múltipla podem ter, como “pano de fundo”, uma etiologia neuroimunológica (DINARELLO; SAVAGE, 1989).

Grande parte da influência do SNC sobre o SI é exercida pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). O hipotálamo apresenta diversas conexões neurais com o sistema límbico, que está envolvido nos processos de adaptação e nas respostas neuro-endócrinas e emocionais ao estresse. O hipotálamo recebe informações da periferia, integra-as com o ambiente interno, e promove o necessário ajuste de certas funções, como o funcionamento do sistema nervoso simpático e a secreção endócrina (JACOBSON, 2005).

Outra excitante evidência da existência de comunicação entre o SNC e o SI foi inaugurada pelos trabalhos de Metalnikov e Chorine na década de 20. Estes trabalhos mostraram que o sistema imune poderia ser condicionado (METALNIKOV; CHORINE, 1926). Mais recentemente, Cara, Conde e Vaz (1994) mostraram que era possível alterar a preferência de camundongos ao sabor doce se esse estímulo fosse pareado com um agente aversivo. Utilizando o mesmo modelo experimental de alteração de preferência ao sabor, Basso et al. (2004) mostraram, em nossos laboratórios, que esta alteração era acompanhada tanto por um aumento da ansiedade mediada comportamentalmente como pela expressão de *c-fos* no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Este mesmo grupo mostrou que o aumento da *c-fos* era dependente de imunoglobulina E. De fato, o uso de bloqueadores da IgE preveniu não só o aumento de *c-fos* no PVN, mas também a alteração ao sabor (BASSO et al., 2003). Palermo-Neto e Guimarães (2000) mostraram condicionamento semelhante, mas em um modelo de inflamação pulmonar. Depois de algum tempo do pareamento

som e luz (estímulo neutro) com ovalbumina foi possível observar que apenas o estímulo neutro causava alterações comportamentais e imunes em animais OVA-sensibilizados, isto é, alterações iguais as produzidas pela exposição à OVA.

Assim, como já dito, a relação neuroimune é bidirecional, o que quer dizer que o SI também pode alterar o funcionamento do SNC, como observado por Basso et al. (2004; 2003). De fato, diferentes laboratórios relataram que fatores liberados durante o processo inflamatório, em especial as citocinas, tinham múltiplas atividades no SNC (BESEDOVSKY; DEL REY, 1987; CONNOR et al., 1998; HOPKINS; ROTHWELL, 1995; MULLER; ACKENHEIL, 1998; ROTHWELL; HOPKINS, 1995). Neste particular, muito interessantes são os relatos sugerindo que a excessiva produção de interleucina 2 (IL-2) ou de seus receptores em linfócitos T esteja relacionada ao aparecimento dos sintomas de esquizofrenia (MAES et al., 1995; SMITH; MAES, 1995).

As citocinas são produtos que regulam processos biológicos relevantes como imunoregulação, inflamação, febre, proliferação e diferenciação celular, síntese de proteínas de fase aguda, quimiotaxia, catabolismo, fibrose, ações antivirais e produção de outras moléculas de citocinas e moléculas de adesão. Originam-se de diversas células, sendo as principais os macrófagos, os linfócitos, as células *Natural Killer* (NK), os monócitos, as células dendríticas, endoteliais e epiteliais, os fibroblastos e os astrócitos. Alguns representantes desta “família” de glicoproteínas são a IL1, IL2, IL3, IL4, fator de necrose tumoral (TNF) e interferon gama (INF) (ROTHWELL; HOPKINS, 1995).

Soliven e Albert (1992) mostraram, em um estudo conduzido *in vitro*, que o TNF diminuiu a liberação de noradrenalina (Nor) por neurônios do gânglio cervical superior do hipotálamo. Quando administradas *in vivo*, as citocinas afetam a atividade do SNC. Neste sentido, o tamanho e a estrutura química das citocinas dificultam a difusão simples destas moléculas para o interior do SNC, através da barreira hematoencefálica. Entretanto, existem sítios neurológicos no SNC que estão fora desta barreira (BLATTEIS, 1992). Mais que isto, alguns autores têm descrito a existência de

um sistema de transporte ativo para as citocinas no SNC (BANKS; KASTIN; GUTIERREZ, 1994; GUTIERREZ; BANKS; KASTIN, 1994). Por outro lado, Friedman et al. (1996) demonstraram que um estresse psicológico (Guerra do Golfo) aumentava a permeabilidade da barreira hemato-encefálica, permitindo a entrada de substâncias que, como as citocinas, não chegariam até o cérebro em condições normais. Outros autores, mostraram que as citocinas poderiam induzir a expressão de outras moléculas de citocinas ou de prostaglandinas no SNC (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; LAWRENCE; KIM, 2000), sendo estas as responsáveis pela resposta final.

Mostrou-se, ainda, que linfócitos T e macrófagos podem adentrar o SNC em casos de injúria ou inflamação das meninges ou vasos cerebrais, representando uma fonte para a síntese de citocinas dentro do cérebro. Estas citocinas exercem múltiplas funções no SNC, como indução de febre, sono de ondas lentas, anorexia, diminuição do comportamento exploratório (síndrome conhecida como comportamento doentio) (DUNN; ANTOON; CHAPMAN, 1991; OTTERNESS et al., 1988) e aumento da secreção de hormônio liberador de corticotrofinas (CRF) (DUNN; ANTOON; CHAPMAN, 1991). Connor et al. (1998) observaram que a aplicação intracerebroventricular de IL1 β e de TNF α produzia um estado ansiogênico em ratos avaliados no labirinto em cruz elevado. Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que estas citocinas diminuía os níveis de dopamina hipotalâmica. Estes dados, e outros da literatura (WAAGE et al., 1991), mostram que substâncias que antes se acreditava pertencerem somente à esfera imune, podem interferir com o funcionamento do sistema nervoso.

As relações entre sistema nervoso e sistema imune já aparecem na ontogenia. De fato, o timo é inervado por fibras vagais antes do desenvolvimento da função endócrina e imune, sugerindo esta observação que a presença destas fibras seja crítica para o desenvolvimento tímico (FRIEDMAN; IRWIN, 1997). No baço, a elaboração dos nervos catecolaminérgicos na região periarteriolar dos vasos linfáticos se dá em paralelo com a ocorrência de mudanças na compartimentalização entre os

linfócitos T e B, o que sugere ser a liberação noradrenérgica, no local, importante para a movimentação dos linfócitos para o interior do baço e para o desenvolvimento dos compartimentos das células T e B (ACKERMAN et al., 1991; SCHLEIFER; KELLER; STEIN, 1987).

Resumindo, atualmente está bem estabelecida a idéia um de *cross-talk* entre o SI e o sistema neuro-endócrino. Este conceito, que figura entre os mais importantes da biologia e da medicina moderna, resultou de estudos sobre os efeitos de várias condições estressantes sobre o sistema imune e da observação da presença de hormônios típicos da resposta ao estresse em células do SI. Entretanto, é importante ressaltar mais uma vez a importância dos trabalhos que mostram que o SI também influencia a atividade do sistema neuro-endócrino, revertendo o antigo dogma que assumia serem as modificações do SI durante o estresse simples consequência da ativação do SNC e da liberação de hormônios e neurotransmissores (BAKKER et al., 1995; BESEDOVSKY; DEL REY, 1987; BESEDOVSKY et al., 1986; BESEDOVSKY et al., 1975; BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; BESEDOVSKY; DEL REY; SORKIN, 1985). É importante entender que os 2 sistemas, SNC e SI, participam ativamente da resposta ao estresse, modulando o comportamento e a atividade imune de acordo, entre outros fatores, com o tipo, a duração e a intensidade do agente estressor.

Uma vez que esta tese foi delineada com o objetivo de entender melhor as relações que se fazem do SNC para o SI de uma prole estressada intra-útero, analisaremos mais profundamente esta via de conexão neuroimune.

2.2 DA ATIVIDADE NERVOSA PARA OS PROCESSOS DE IMUNOCOMPETÊNCIA

Há numerosos caminhos pelos quais o SNC pode influenciar as respostas imunes. Já comentamos a existência de uma inervação direta dos órgãos imunes

primários e secundários. Esta inervação é feita principalmente pelo sistema nervoso autônomo simpático, que inerva o timo, a medula óssea (órgãos imunes primários) e o baço e os linfonodos (órgãos imunes secundários) (FRIEDMAN; IRWIN, 1997). A inervação do timo e da medula óssea apresenta efeitos regulatórios sobre o desenvolvimento dos linfócitos T e B, respectivamente. No interior do baço e dos linfonodos, há um contato muito íntimo entre o sistema nervoso autônomo e as células T; alguns autores descrevem este contato como *synapse-like* (JANKOVIC, 1989). Esta proximidade é importante na regulação da resposta imune, uma vez que as células T CD4⁺ geralmente respondem à maioria dos antígenos (antígenos T-dependentes) antes das células B. Na verdade, as células *T helper* CD4⁺ direcionam a resposta das células B (LAWRENCE; KIM, 2000).

Estes efeitos só são possíveis porque os sistemas neuro-endócrino e imune partilham de receptores comuns para citocinas, neurotransmissores, neuropeptídeos e hormônios (BLALOCK, 1989). Produtos tidos como específicos do SI ou do sistema neuro-endócrino coexistem nos tecidos linfóide, endócrino e nervoso; mediadores endócrinos e neurais podem afetar o SI e mediadores imunes podem afetar estruturas neurais e endócrinas (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996).

Sanders (1998) mostrou que a liberação de noradrenalina ou de adrenalina por axônios ativava a proliferação ou a produção de citocinas por células T. Neste particular, e muito interessante, foi a observação de que as células T CD4⁺ e as células *T helper* 1, que induzem imunidade do tipo Th1, via produção de IL2 e IFN γ , expressam receptores β 2 adrenérgicos. As células *T helper* 2, que induzem preferencialmente imunidade do tipo Th2, via produção de IL4, 5, 10 e 13, não expressam receptores β 2 adrenérgicos (SANDERS, 1998). Adrenalina, noradrenalina e dexametasona inibem a produção de IL12 e aumentam a produção de IL10 por macrófagos (ELENKOV et al., 1996). Tanto o hormônio liberador de corticotrofinas (CRH) como a corticosterona (em roedores) ou o cortisol (em humanos) inibem a

produção de IL12, o que favorece a resposta imune do tipo Th2 (BLOTTA; DEKRUYFF; UMETSU, 1997; DEKRUYFF; FANG; UMETSU, 1998).

Outras evidências de que a atividade nervosa modula a imunocompetência vêm de trabalhos onde se observou que lesões ou auto-estimulação de áreas específicas do cérebro poderiam levar à alteração da imunidade (FELTEN, 1991; LIVNAT et al., 1985; VLAJKOVIC et al., 1993). De fato, foi observado que estímulos elétricos aplicados no hipotálamo aumentavam os sintomas da reação de Arthus e que lesões no hipotálamo anterior causavam prejuízo na resposta de hipersensibilidade tardia mediada por linfócito T (BLALOCK, 1989).

Madden e Felten (1995) observaram que a remoção da hipófise produzia mudanças na morfologia do tecido linfóide e na reatividade imune. Trabalhos demonstrando alterações no *turnover* de neurotransmissores em paralelo com o desenvolvimento da resposta imune suportam, com mais evidências, a idéia da existência de uma comunicação bilateral entre o SNC e o SI (CARLSON et al., 1987; ZALCMAN; SHANKS; ANISMAN, 1991).

Em uma série de experimentos *in vitro*, Blalock (1989) mostrou que o sistema imune por si mesmo é capaz de sintetizar neurohormônios. Dependendo do estímulo, linfócitos produzem ACTH e beta-endorfinas pela clivagem do precursor pro-opiomelanocortina (POMC) (HARBOUR; SMITH; BLALOCK, 1987a,b; SMITH; BLALOCK, 1981). Também foi observado a síntese de moléculas POMC-like em macrófagos (LOLAIT et al., 1986). Estes estudos mostram que o sistema imune poderia influenciar mecanismos neurais e imunológicos pela síntese dos seus próprios neuropeptídeos.

Outras substâncias produzidas pelo sistema nervoso, como os neuropeptídeos, o peptídeo intestinal vasoativo, as endorfinas, as encefalinas, a tireotrofina, a prolactina, o hormônio do crescimento e várias outras também têm atividade sobre o sistema imune (BLALOCK, 1989; MADDEN; FELTEN, 1995).

São vários os trabalhos que servem de base para a construção dos conhecimentos sobre a NIM. Dentre estes, vamos explorar as evidências que mostram ser a resposta a um estresse capaz de exercer grande influência sobre a resposta imune, seja via eixo HPA, via sistema nervoso autônomo simpático ou via sistema opióide. Apresentaremos fatos que mostram que a alteração imune observada em resposta ao estresse não é mera coincidência ou simples efeito dos hormônios ou neurotransmissores liberados mas, sim, parte importante e ativa da resposta ao estresse. Não podemos esquecer que as células imunológicas também têm a capacidade de modular a atividade central, podendo, desta forma, mudar o curso da resposta ao estresse.

2.3 ESTRESSE E SUAS IMPLICAÇÕES

“A constância do “milieu interieur” é a condição para um existência livre e independente” CLAUDE BERNARD² (1878, apud Axelrod e Reisine(1984).

Quando um animal é confrontado com algo que ameaça sua integridade física ou sua própria sobrevivência, seja esta ameaça representada por um predador ou por uma mudança no meio ambiente que o advirta da ocorrência um de dano iminente, ele apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de medo.

²BERNARD, C. **Les phenomenes de la vie**. Paris, 1878. v. 1.

Em circunstâncias onde a situação de perigo não é tão evidente, porém é vaga e persistente, ou onde os sinais de advertência não estão claros, surge a ansiedade. O estresse, neste contexto, pode ser definido como uma condição que perturba a homeostase física e psicológica.

A resposta ao estresse tem por objetivo coordenar a adaptação do organismo a alterações internas ou externas. Os principais componentes desta resposta são o eixo HPA e o caminho noradrenérgico/autônômico do *locus ceruleus*. A ação destes dois sistemas é sinérgica. Enquanto as catecolaminas facilitam a obtenção de energia para os órgãos vitais, os glicocorticóides liberados pela adrenal funcionam como hormônios anti-estresse, ajudando a conter as reações neurais defensivas deflagradas pelo estresse (MCEWEN, 1998; MUNCK; GUYRE; HOLBROOK, 1984). Entretanto, a falta de controle sobre a secreção de glicocorticóides representa uma ameaça à saúde e ao bem-estar do organismo. Por exemplo, a regulação inapropriada da resposta ao estresse já foi implicada na patogênese da asma, da hipertensão (MCEWEN; STELLAR, 1993), da depressão, das desordens pós-traumáticas (TAGAY et al., 2005) e da doença de Alzheimer (LANDFIELD et al., 1991).

A resposta ao estresse está centrada principalmente na atividade do eixo HPA. Entretanto, o funcionamento deste eixo está submetido ao controle outras porções do cérebro, como o sistema límbico e o hipocampo. A iniciação da resposta ao estresse se dá através de fibras catecolaminérgicas que se projetam diretamente em neurônios do PVN que contém CRH. O controle da atividade do eixo HPA é exercido principalmente a este nível, no PVN. Não é de se estranhar, pois, a quantidade de conexões existentes entre o eixo HPA, o restante do SNC e a periferia, uma vez que este eixo tem de responder a estímulos muito diferentes, que podem variar desde estresses endógenos, como hemorragia ou dispnéia, até os estresses psicológicos como a presença de um predador ou outras situações que gerem a sensação de medo.

Neurônios catecolaminérgicos promovem a secreção do eixo HPA nos casos de hemorragia, hipotensão, problemas respiratórios (PLOTSKY; CUNNINGHAM; WIDMAIER, 1989), desafios imunes, como injeção de LPS (ERICSSON; KOVACS; SAWCHENKO, 1994) e outros estresses chamados “sistêmicos”, que representam uma ameaça direta à homeostasia do organismo. Os efeitos excitatórios das catecolaminas sobre o eixo HPA são mediados principalmente pelos α adrenoreceptores presentes no PVN (HERMAN; CULLINAN, 1997). Já para o estresse chamado “processivo”, como, por exemplo, contenção, medo condicionado ou exposição a novos ambientes, estes estímulos chegam até o eixo HPA através de fibras provenientes do sistema límbico; dependem, assim, de uma comparação com experiências prévias, isto é, já vivenciadas, para a tomada de decisão no sentido de caracterizar se elas representam ou não uma ameaça (HERMAN; CULLINAN, 1997).

Tanto os estímulos sistêmicos como os processivos chegam ao PVN, centro regulatório do eixo HPA e ponto de convergência de qualquer estímulo estressante. A partir deste ponto, a resposta ao estresse é sempre igual, variando apenas em magnitude, dependendo do estímulo gerador.

O eixo HPA é composto por três tecidos: o hipotálamo, em especial o PVN, a hipófise anterior e o córtex da adrenal. Quando submetido a um estresse, seja de natureza física ou psicológica, animais ou humanos respondem através da produção de altas quantidades de CRH e de arginina-vasopressina no PVN. Estas substâncias são liberadas nos vasos porta e promovem a clivagem da POMC, molécula precursora do ACTH e das endorfinas. O ACTH, por sua vez, entra na corrente sanguínea e estimula a secreção dos glicocorticóides (cortisol em humanos, corticosterona nos roedores) (HEUSER; LAMMERS, 2003). A secreção dos glicocorticóides, produto final do eixo HPA, é mantida dentro de um limite ótimo através da inibição da sua própria liberação por um mecanismo de *feedback* negativo, isto é, a ligação dos glicocorticóides a receptores existentes no hipotálamo e na hipófise inibe a liberação de CRH e ACTH, diminuindo, assim, a liberação do próprio glicocorticóide (MCEWEN

et al., 1997). Seguido da secreção de CRH, há um aumento “compensatório” na expressão de mRNA para CRH no PVN (LIGHTMAN; YOUNG, 1989; YI; BARAM, 1994) o que é, evidentemente, prevenido pelos glicocorticóides (SWANSON; SIMMONS, 1989; YI; MASTERS; BARAM, 1993; YOUNG; MEZEY; SIEGEL, 1986). Os opióides endógenos liberados pela ativação do eixo também regulam a resposta ao estresse. Estes ou inibem a liberação de CRH por uma ação direta nos terminais CRHérgicos presentes no PVN ou reduzem os efeitos estimulatórios da Nor nesta região (PLOTSKY, 1986).

O controle da resposta ao estresse não é exclusivo do eixo HPA. O hipocampo é uma área importante de regulação da resposta e é, ao mesmo tempo, afetado pelo estresse (HEUSER; LAMMERS, 2003). O hipocampo tem altas densidades de receptores para glicocorticóides e modula a liberação deste hormônio através de seus efeitos inibitórios sobre o eixo HPA. A formação hipocampal está associada com aspectos de aprendizado e de memória (MORGADO, 2005) e com os aspectos cognitivos da resposta ao estresse (MCEWEN; SAPOLSKY, 1995). Neste sentido, elevações agudas dos níveis de glicocorticóides e de catecolaminas facilitam a formação de memórias relacionadas a eventos considerados emotivos (ROOZENDAAL, 2000). A manutenção por longo tempo de níveis elevados de hormônios ligados ao estresse, em especial os glicocorticóides, contribui para prejudicar as funções cognitivas e promover lesões no hipocampo (LUPIEN; MCEWEN, 1997; MCEWEN; SAPOLSKY, 1995).

A resposta ao estresse, envolvendo catecolaminas, CRH, ACTH e glicocorticóides é extremamente importante para a sobrevivência; como dito por Claude Bernard no pensamento que inaugura este capítulo. De fato, os mecanismos básicos e as moléculas envolvidas com a reação ao estresse são similares e estão conservados na escala evolutiva em diferentes espécies, de invertebrados a vertebrados superiores (OTTAVIANI et al., 1994; OTTAVIANI et al., 1992).

Vários trabalhos relacionam especificamente o estresse e o sistema imune. De forma geral, o estresse está relacionado à imunossupressão. Experimentos realizados em diferentes laboratórios têm mostrado que a aplicação de estímulos estressantes aversivos inescapáveis como som, rotação, choque e imobilização alteravam os componentes da resposta imune celular *in vitro*. Trinchieri et al. (1993) demonstraram que a exposição de ratos a um choque na cauda resultava em diminuição da proliferação de linfócitos em resposta ao mitógeno fitohemaglutinina, da citotoxicidade das células NK, da produção de IL 2 e IFN γ e da densidade de receptores para IL 2. Estudos conduzidos a respeito dos efeitos do estresse na hipersensibilidade tardia demonstraram que um estresse agudo aumenta a resposta de hipersensibilidade (DHABHAR et al., 2000). Por outro lado, a aplicação de um estresse crônico (3 a 5 semanas) levou à supressão desta resposta (DHABHAR; MCEWEN, 1997, 1999).

A aparente contradição entre os resultados relatados acerca dos efeitos do estresse agudo ou crônico sobre a imunocompetência, provavelmente é devida a diferenças no tipo de estresse aplicado e na resposta imune estudada. Neste sentido, é importante ressaltar que a severidade, a duração, o tipo de estresse (físico x psicológico) e a resposta comportamental emitida pelos animais em resposta ao agente estressor determinam a magnitude e a qualidade das alterações dos parâmetros celulares a serem medidos (HERMAN; CULLINAN, 1997). De fato, foi demonstrado que ratos expostos a um choque inescapável na cauda apresentavam função linfocitária diminuída, enquanto animais que tinham a possibilidade de escapar do choque não apresentavam nenhuma alteração (MAIER; LAUDENSLAGER, 1988). Palermo-Neto, Massoco e Roberspierre de Souza (2003) mostraram resultado semelhante. Neste interessante trabalho, os autores observaram que a exposição dos animais a um estresse inescapável, de natureza física (choque nas patas) apresentava os mesmos efeitos imunossupressores que um estresse de natureza psicológica (testemunhar outro animal ser exposto ao choque). Por outro lado, os animais expostos aos choques escapáveis não apresentavam nenhuma alteração

comportamental ou da atividade de macrófagos peritoneais, reforçando a idéia de que a habilidade de controlar ou escapar de uma situação estressante era um fator crítico para as respostas comportamentais e imunes ao estresse.

Inicialmente, as alterações imunológicas apresentadas pelos animais ou humanos submetidos ao estresse foi creditada às ações dos glicocorticóides liberados pela adrenal. Em altas doses, este hormônio tem efeito imunossupressor, e foi por esta propriedade que os glicocorticóides ficaram conhecidos (FELSZEGHY; GASPAR; NYAKAS, 1996; MCEWEN et al., 1997). Entretanto, Kass et al. (1991) demonstraram que a administração exógena de corticosterona era importante para recuperação de infecções em animais adrenalectomizados.

Keller et al. (1983) demonstraram que a imunossupressão induzida pelo estresse ocorria tanto em animais intactos como nos adrenalectomizados, demonstrando a participação de outros fatores, além da ativação do eixo HPA e da liberação de glicocorticóide, na alteração imune. Alguns anos mais tarde demonstrou-se, também, que o sistema nervoso autônomo simpático participa de forma relevante da resposta ao estresse e da modulação da atividade imune (FRIEDMAN; IRWIN, 1997). De fato, foi observado que animais adrenalectomizados apresentavam imunossupressão em resposta à administração de anfetamina (FREIRE-GARABAL et al., 1991; LIGEIRO-OLIVEIRA et al., 2004). Interessante, muitos dos efeitos da anfetamina envolvem a modulação do sistema adrenérgico e mimetizam um estado de ansiedade (ANTELMAN et al., 1980; SUTTON et al., 1982). Também, a supressão da proliferação de linfócitos em resposta a um estresse, independente da liberação de hormônios pela hipófise, foi relacionada aos sistemas catecolaminérgicos centrais e periféricos (KELLER et al., 1988).

Um mecanismo interessante e importante pelo qual o estresse, via glicocorticóide, pode modular a atividade imune é através dos seus efeitos sobre o balanço Th1/Th2. As respostas imunes são reguladas por células apresentadoras de antígenos, que são os monócitos/macrófagos, células dendríticas e outros fagócitos,

que são os componentes da resposta imune inata, e por linfócitos das subclasses Th1 e Th2, que compõem a resposta imune adquirida. O que diferencia estas 2 subpopulações de linfócitos é o perfil de citocinas liberado por estas células (ELENKOV et al., 2000). As células Th1 secretam IL-2, IFN γ e TNF β , que atuam como promotores da atividade imune celular. As células Th2 liberam principalmente IL-4, IL-10, IL-13 e IL-9, que estimulam a imunidade humoral (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996; MOSMANN; SAD, 1996). Dentre os principais fatores que influenciam a diferenciação dos linfócitos para o padrão Th1 ou Th2 encontram-se a IL-12 e o TNF α , produzidos pelas células que compõem o sistema imune inato, e que estimula a diferenciação dos linfócitos para o padrão Th1, o que aumenta a resposta imune celular. A IL-12 e o TNF α agem em conjunto com o IFN γ produzido pelas células NK, o que promove mais respostas do tipo Th1, isto é, celular (TRINCHIERI; SCOTT, 1995). Estas três citocinas, IL-12, TNF α e IFN γ , também estimulam a síntese de óxido nítrico e outros mediadores inflamatórios, sendo por isso conhecidas como citocinas pró-inflamatórias (MOSMANN; SAD, 1996; TRINCHIERI; SCOTT, 1995). As repostas Th1 e Th2 são mutualmente inibitórias, a IL-12 e o IFN γ inibem respostas do tipo Th2 e a IL-4 e a IL-10 inibem as Th1, como em um prato de balança (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996; MOSMANN; SAD, 1996). Importante ressaltar que as citocinas IL-4 e IL-10 inibem a ativação dos macrófagos, a proliferação de células T e a síntese das citocinas pró-inflamatória. Por isso, a IL-4 e a IL-10 são as principais citocinas anti-inflamatórias (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996; MOSMANN; SAD, 1996). O estresse, via liberação de glicocorticóides, atua favorecendo as respostas do tipo Th2 (IWAKABE et al., 1998). A corticosterona atua sobre monócitos, macrófagos e células dendríticas, inibindo a produção de IL-12, TNF α e IFN γ , e, conseqüentemente, a diferenciação dos linfócitos em Th1. Como resultado, as citocinas Th1 deixam de inibir aquelas citocinas importantes para a resposta Th2, e o “prato da balança” pende para a diferenciação dos linfócitos em Th2. Nesta situação, há uma diminuição da resposta

imune celular concomitante com o aumento da resposta imune humoral, o que aumenta a susceptibilidade a alergias e doenças auto imunes mediadas por anticorpos (ELENKOV; CHROUSOS; WILDER, 2000). Por isso, na dependência do parâmetro analisado, o estresse pode aumentar ou diminuir a resposta imune/inflamatória. Quando se avaliam respostas mediadas por anticorpos, a exposição ao estresse tende a aumentar esta resposta, por favorecer respostas do tipo Th2. Por outro lado, se a avaliação dos efeitos do estresse for sobre a imunidade celular, os resultados indicaram diminuição desta resposta (ELENKOV; CHROUSOS; WILDER, 2000; ELENKOV et al., 2000).

Trabalhos realizados *in vitro* também demonstraram a resposta do sistema imune à estimulação catecolaminérgica. Sigola e Zinyama (2000) mostraram que a adrenalina inibe a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais estimulados com LPS. A incubação de macrófagos peritoneais com 10^{-7} e 10^{-3} M de Nor aumentou a fagocitose destas células; por outro lado, a concentração de 10^{-5} diminuiu esta função (ORTEGA et al., 2000). Neste mesmo trabalho, foi observado que a incubação com várias concentrações de Nor levou a um aumento da capacidade microbicida dos macrófagos peritoneais, fato que foi atribuído a um aumento da produção de ânion superóxido.

A observação de que os níveis séricos de beta-endorfinas aumentavam em paralelo aos do ACTH em resposta ao estresse, levou à busca de sítios imunológicos para ação destas endorfinas (MADDEN; FELTEN, 1995). De fato, atualmente estão descritos mRNA para moléculas opioidérgicas, peptídeos e receptores em vários tipos de células imunes, como linfócitos T, monócitos e neutrófilos (SALZET; VIEAU; DAY, 2000). Shavit et al. (1984) observaram que a diminuição da atividade das células NK seguida da exposição ao estresse era bloqueada pela aplicação de naloxona, um antagonista opióide, sugerindo este resultado que a atividade das células NK, em situações de estresse, seja regulada por um mecanismo mediado pelos opióides. Neste sentido, efeitos diretos dos opióides sobre linfócitos e macrófagos peritoneais já

foram sugeridos por estudos conduzidos *in vitro* e *in vivo* (SALZET; VIEAU; DAY, 2000).

O presente trabalho enfocará, especificamente, a participação da ativação do “sistema estresse” materno no desenvolvimento e em parâmetros fisisiológicos da prole. A partir deste ponto, enfocaremos os efeitos que tem sido relatados para um estresse pré-natal sobre a prole, isto é, sobre animais submetidos intra-útero e em uma fase muito importante do desenvolvimento a toda essa pletora de hormônios, neurotransmissores e neuropetídeos.

2.4 ESTRESSE PRÉ-NATAL

Segundo Bernardi (1996), denomina-se fase peri-natal ao intervalo de tempo que tem início na concepção e que termina no desmame. A gestação coincide com o período pré-natal, estendendo-se da concepção ao parto. Finalmente, o período neonatal, vai do parto ao desmame. Ainda, o período peri-natal pode ser dividido em 4 fases:

1. *implantação*: começa na fecundação do oócito e termina com a implantação do blatocisto no endométrio;
2. *organogênese*: período de formação dos órgãos rudimentares, fase de intensa proliferação, diferenciação e migração celular;
3. *desenvolvimento fetal*: crescimento dos tecidos. Este período é marcado por uma alta taxa de replicação celular e é nele que acontece grande parte da maturação e diferenciação do cérebro e do sistema imune. Em camundongos, esta fase vai do 15° ao 19° dia de gestação; por isso, escolhemos este período para a realização das manipulações pré-natais (VOM SAAL; EVEN; QUADAGNO, 1991);

4. *período neonatal.*

Tem sido discutida a possibilidade de que várias formas de desordens comportamentais em humanos sejam resultantes de interações entre fatores genéticos individuais e o ambiente pré e pós-natal em que este indivíduo está inserido. A observação de Sontag (1941), que descreveu uma relação entre distúrbios emocionais durante a gestação e dificuldades de alimentação em crianças, estimulou muitos estudos a respeito dos efeitos do estresse pré-natal sobre o comportamento de crianças. Mais tarde, foram relatadas associações entre estresse materno e baixo peso ao nascimento, alteração no desenvolvimento físico (CABRERA et al., 1999; JONES; TAUSCHER, 1978; LOU et al., 1994; SECKL, 2001; WEINSTOCK, 2001) e alta incidência de distúrbios emocionais em crianças (WARD; STEHM, 1991). Foi descrita, também, a existência de uma associação entre o estresse pré-natal e a esquizofrenia, a depressão, o suicídio e abuso de drogas (BUITELAAR et al., 2003; KOENIG; KIRKPATRICK; LEE, 2002; KOFMAN, 2002; WATSON et al., 1999; WEINSTOCK, 2001, 2002).

Durante a gestação em primatas e roedores, várias mudanças acontecem na regulação do sistema neuro-endócrino materno para proteger o feto e assegurar o parto. Em roedores, estas mudanças incluem mecanismos para diminuir a resposta do eixo HPA ao estresse (NEUMANN, 2003). Ainda, foi descrita em roedores uma enzima, a 11 β -hidroxi-esteróide desidrogenase (11 β HSD2), que catalisa a conversão da corticosterona ativa em dehidrocorticosterona, um metabólito inerte (WELBERG; SECKL; HOLMES, 2000). A 11 β HSD2 está expressa na placenta e em vários tecidos fetais (BROWN et al., 1996). Foi observado que a atividade da 11 β HSD presente na placenta varia muito entre os indivíduos (BENEDIKTSSON et al., 1997), o que pode ser uma explicação para as diferentes susceptibilidades que os animais apresentam aos efeitos do estresse pré-natal. Apesar da existência destes

mecanismos de proteção, tem sido observada uma correlação positiva entre o aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona e de aldosterona nas mães e nos fetos após a exposição a um estresse aplicado no terço final de gestação; este fato indica que a atividade enzimática é insuficiente para prevenir o alcance do esteróide materno até a circulação fetal (BENEDIKTSSON et al., 1997; WILLIAMS et al., 1999b). Estes resultados são consistentes com um papel do eixo HPA nos efeitos do estresse materno. Ainda, por volta do 17º dia de gestação o eixo HPA fetal já é capaz de responder às alterações dos hormônios maternos com liberação de CRH, ACTH, corticosterona e beta-endorfinas (OHKAWA et al., 1991). Assim, além dos glicocorticóides e da beta-endorfina materna, que atravessam a placenta (CHURCHILL et al., 1981; MILKOVIC et al., 1973; SANDMAN; KASTIN, 1981; ZARROW; PHILPOTT; DENENBERG, 1970), o feto também tem que controlar o funcionamento do seu próprio eixo HPA. A partir do 13º dia de gestação é possível detectar mRNA para receptores de glicocorticóides em várias áreas do cérebro de ratos (PVN, núcleo arqueado, núcleos da rafe e *locus ceruleus*), mRNA para receptores de mineralocorticóides aparecem a partir do 16º dia de gestação (CINTRA et al., 1993). Então, mudanças que ocorrem nos níveis de esteróides maternos após o 13º dia de gestação podem influenciar a atividade neuronal e o funcionamento do eixo HPA da prole, por interagir com receptores de glicocorticóides presentes no SNC dos fetos.

Vários trabalhos demonstraram que a aplicação de um estresse pré-natal altera o funcionamento do eixo HPA da prole (KOEHL et al., 1997; TAKAHASHI; BAKER; KALIN, 1990; TAKAHASHI et al., 1988; VALLEE et al., 1999; VALLEE et al., 1996; WARD et al., 2000; WEINSTOCK, 2001; WEINSTOCK et al., 1998). Estes trabalhos sugerem que o estresse aplicado na fase peri-natal, em especial no período pré-natal, poderia alterar o sistema nervoso dos animais. De fato, enquanto o estresse pré-natal

induzia em ratos adultos um aumento no pico e no tempo de secreção da corticosterona em resposta a um estresse (FRIDE et al., 1986; HENRY et al., 1994), manipulações pós-natais como o *handling* (MEANEY et al., 1989; VALLEE et al., 1996) e a privação materna (OGAWA et al., 1994) diminuía a amplitude e a duração da secreção de corticosterona induzida pelo estresse. Koehl et al. (1997) mostraram que um estresse pré-natal alterava o ritmo circadiano de uma prole de ratos adultos, adiantando em quase 4 horas o pico de secreção de corticosterona em relação à prole não estressada. Um estresse pós-natal (aplicado do dia do nascimento até o 7º dia de vida) revertia esta alteração (KOEHL et al., 1997). Diferenças no *status* de maturação do eixo poderiam ser responsáveis pelos diferentes efeitos do estresse pré e pós-natal.

Mesmo em condições basais, os níveis plasmáticos de corticosterona estavam elevados em ratos e macacos Rhesus adultos expostos a um estresse *in útero* (CLARKE et al., 1994; FRIDE et al., 1986; PETERS, 1982); entretanto, alguns outros trabalhos não encontraram os mesmos resultados (HENRY et al., 1994; MACCARI et al., 1995; TAKAHASHI; TURNER; KALIN, 1992). As diferenças entre estes estudos são decorrentes, provavelmente, do tipo e da duração do estresse empregado, da idade dos animais no momento do estudado, da hora do dia em que as amostras de sangue foram coletadas para a dosagem de corticosterona e, é claro, estes resultados dependem da exposição ou não dos animais a uma experiência prévia ou a outras situações que envolvem a ativação do eixo HPA antes do experimento (FUJIOKA et al., 1999; WEINSTOCK, 1997).

O prejuízo na regulação do eixo HPA em ratos estressados *in utero* é freqüentemente descrito após a exposição a um outro estresse na idade adulta (WEINSTOCK, 1997). Takahashi e Kalin (1991) e Takahashi et al. (1988) estudaram a resposta de uma prole de ratos machos estressada *in utero* a um novo estresse (10 minutos de choques inescapáveis nas patas) aplicado no 14º ou 21º dia de vida da prole. Este grupo mostrou que, nesta situação, havia um aumento das concentrações

plasmáticas de corticosterona e ACTH nos dois momentos analisados (14° e 21° dia de vida). Foi observado em alguns trabalhos que as altas concentrações de ACTH e de corticosterona induzidas pelo estresse pré-natal mantinham-se até a idade adulta dos animais (MCCORMICK et al., 1995; WARD et al., 2000; WEINSTOCK et al., 1992; WEINSTOCK et al., 1998). Ward et al. (2000) mostraram que ratos estressados durante a fase pré-natal apresentavam hipertrofia da adrenal, o que, segundo os autores, poderia ser resultado de uma super estimulação desta glândula pelo ACTH. Neste sentido, as fêmeas parecem ser mais sensíveis do que os machos ao aumento de corticosterona observado após a exposição a um estresse durante a gestação (MCCORMICK et al., 1995; SZURAN et al., 2000; WEINSTOCK et al., 1992). Entretanto, é relevante destacar que alguns trabalhos não encontraram diferenças significantes entre animais estressados e outros de grupo controle no que diz respeito aos níveis de corticosterona e ACTH (STOHR et al., 1998; TAKAHASHI; TURNER; KALIN, 1992). Ainda, outros autores reportaram diminuição nos níveis de ACTH avaliados no 21° dia de vida da prole (TAKAHASHI; BAKER; KALIN, 1990). Por fim, há dados mostrando que o declínio dos níveis de corticosterona depois do estresse era mais lento nos animais estressados no período pré-natal. Este fato foi associado a uma diminuição do número de receptores para glicocorticóides e mineralocorticóides presentes no hipocampo (BARBAZANGES et al., 1996a; HENRY et al., 1994).

A exposição repetida ao mesmo ambiente, na ausência de estímulos considerados estressantes ou perigosos, leva à adaptação, e os níveis de corticosterona não aumentam mais em resposta a este meio ambiente (FILE, 1982). Entretanto, Fride et al. (1986) descreveram que quando ratos estressados durante toda a gestação eram expostos repetidamente a um mesmo campo aberto, eles continuavam liberando altas quantidades de corticosterona mesmo após 8 dias consecutivos de exposição. Esta resposta, no entanto, era abolida após 4 dias de exposição nos animais controle. Este resultado indica que o estresse gestacional interfere com os processos normais de adaptação. Os autores sugeriram que o fato

que observaram seria uma decorrência de alterações hipocampais observadas nos animais submetidos ao estresse pré-natal.

Apesar de tudo quanto relatado, o mecanismo responsável pelas anormalidades no funcionamento do eixo HPA da prole estressada ainda não está completamente esclarecido. Neste sentido, Fujioka et al. (1999) demonstraram que embriões de fêmeas submetidas a 240 minutos de contenção do 15º ao 19º dia de gestação apresentavam neurônios curtos e células em apoptose, quando comparados a neurônios obtidos de um grupo controle, não estressado. Vários estudos mostraram que ratos adultos estressados *in utero* apresentavam menos receptores do tipo I (para mineralocorticóides) e do tipo II (para glicocorticóides) no hipocampo e em outras áreas cerebrais (HENRY et al., 1994; WEINSTOCK, 2001; WEINSTOCK et al., 1992). Outra evidência de alteração do funcionamento do eixo HPA foi dada por Cratty et al. (1995). Trabalhando em um modelo *in vitro*, estes autores demonstraram que a amígdala da prole de ratos adultos submetida a um estresse do 14º ao 21º dia de gestação liberava altas quantidades de CRH em resposta ao KCl, um agente despolarizante. Naquela ocasião, foi sugerido que o aumento dos níveis de CRH na amígdala refletia os altos níveis de glicocorticóides circulantes.

Foram relatadas, também, diversas alterações nas concentrações de catecolaminas em animais submetidos ao EPN. Em ratos adultos, em condições de repouso, a exposição a um estresse pré-natal aumentou o *turnover* de Nor no telencéfalo e no diencéfalo (HUTTUNEN; NISKANEN, 1978). Ratos machos, com 70 a 90 dias de idade, expostos a um estresse *in utero* aplicado em dias alternados desde o 2º dia de gestação, apresentavam aumento do *turnover* de Nor no córtex cerebral e no *locus ceruleus* tanto em repouso como imediatamente após a exposição a um novo estresse (TAKAHASHI; TURNER; KALIN, 1992). Weinstock et al. (1998) observaram

que os níveis de Nor e de dihidroxifenilglicol estavam aumentados em uma prole de ratos estressada pré-natalmente após um choque aplicado na idade adulta, sugerindo estas observações que os animais estressados durante a gestação apresentavam maior ativação do sistema nervoso autônomo simpático. Há relatos de um aumento na liberação de acetilcolina hipocampal após a aplicação de um estresse moderado e após a injeção de CRH em animais adultos submetidos a um estresse pré-natal, sugerindo estes achados que esta manipulação poderia interferir, também, com o desenvolvimento do sistema colinérgico (DAY et al., 1998).

Animais estressados *in utero* apresentaram, também, aumento do *turnover* de dopamina no córtex pré-frontal e diminuição daquele medido no estriado e no núcleo *accumbens* (ALONSO et al., 1997; FRIDE; WEINSTOCK, 1988). A aplicação de um estresse pré-natal também alterou a sensibilidade dos neurônios dopaminérgicos do núcleo *accumbens*, modificando a densidade dos diferentes tipos de receptores dopaminérgicos nesta região (HENRY et al., 1995).

Por outro lado, o estresse pré-natal não produziu alterações significantes no *turnover* de serotonina no córtex pré-frontal, núcleo *accumbens* ou estriado de animais adultos (FRIDE et al., 1986; FRIDE; WEINSTOCK, 1988). No entanto, já foi relatado um ligeiro aumento dos níveis deste neurotransmissor no cérebro dos fetos e neonatos expostos ao estresse durante a gestação (PETERS, 1990).

Alterações na sensibilidade do sistema opioide também foram creditadas ao estresse pré-natal. Neste modelo, foi observada uma diminuição na densidade dos receptores opióides do tipo μ em diferentes regiões cerebrais (INSEL et al., 1988; INSEL et al., 1990; SANCHEZ et al., 1996). Talvez isso explique o fato de os animais pré-natalmente estressados apresentarem diminuição dos comportamentos mediados pelo sistema opióide, como natação forçada (ALONSO et al., 1991), preferência à sacarina (KESHET; WEINSTOCK, 1995) e indução de analgesia em resposta ao

estresse (KINSLEY; MANN; BRIDGES, 1988; SZURAN et al., 1991; TAKAHASHI et al., 1988). Poltyrev e Weinstock (1997) mostraram que os comportamentos de locomoção e levantar mediado por opióides estavam diminuídos pela exposição ao estresse pré-natal. Embora indiretamente, estes trabalhos sugeriram aos autores que algumas alterações comportamentais induzidas pelo estresse gestacional poderiam resultar de um aumento da atividade opióide na mãe e no feto.

Vários experimentos têm mostrado que a aplicação de um estresse pré-natal altera o comportamento sexual e provocava alterações morfológicas no hipotálamo de ratos machos (REZNIKOV; NOSENKO; TARASENKO, 1999; WARD; STEHM, 1991; WEINSTOCK, 2001). Estas alterações estruturais e comportamentais observadas na prole dos machos foram consideradas com sendo resultado da ocorrência de um desequilíbrio hormonal em um período crítico para a diferenciação sexual. Em ratos, este período se dá por volta dos dias 18 e 19 de gestação, época em que ocorre um aumento da concentração de testosterona circulante (WARD; WEISZ, 1984). A aplicação de um estresse no final da gestação adiantou este pico em 1 dia e reduziu os níveis deste hormônio nos dias 18 e 19 de gestação (WARD; WEISZ, 1984). O estresse pré-natal também diminuiu a atividade da enzima aromatase (que faz a conversão da testosterona em estradiol, evento importante para a diferenciação sexual) medido no hipotálamo e na amígdala de fetos machos, fato que não ocorreu nas fêmeas avaliadas nos dias 18 e 19 de gestação (MURASE, 1994). Em ratos, foi observado um segundo pico de testosterona 2 a 4 horas depois do parto (CORBIER et al., 1990). Este pico também estava diminuído nos animais estressados (CORBIER et al., 1990). Estas alterações foram prevenidas pela administração de testosterona às fêmeas prenhes estressadas e/ou aos seus filhotes após o parto (DORNER; GOTZ; DOCKE, 1983).

Estudos recentes mostraram em ratos e macacos que o estresse materno induz comportamentos ansiogênicos e depressivos, caracterizados por depressão comportamental, desamparo aprendido e anedonia (WEINSTOCK, 2001,2002,2005). Estudos independentes conduzidos em ratos demonstraram aumento da ansiedade e depressão comportamental em animais pré-natalmente estressados e avaliados no campo-aberto (FRIDE et al., 1986) e no labirinto em cruz elevado (FRIDE; WEINSTOCK, 1988; PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001; POLTYREV et al., 1996; VALLEE et al., 1997; ZIMMERBERG; BLASKEY, 1998). A ansiedade apresentada pelos animais estressados foi relacionada a um aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona (VALLEE et al., 1997), a uma diminuição dos sítios para a ligação de benzodiazepínicos do hipocampo (FRIDE et al., 1985) e a um aumento dos níveis de CRH na amígdala (CRATTY et al., 1995). Neste sentido, o comportamento ansiogênico dos ratos estressados *in utero* foi reduzido pela injeção de antagonistas de CRH (WARD et al., 2000) e mimetizado pela injeção de CRH na amígdala (DAVIS, 1992), sugerindo estes dados uma possível associação entre alterações na atividade hormonal da prole estressada e ansiedade.

Conforme descrito, na ausência de conexões diretas entre o feto e a mãe, hormônios maternos devem induzir alterações no funcionamento do sistema neuro-endócrino da prole. Neste sentido, há evidências substanciais de que os glicocorticóides endógenos sejam os mediadores de algumas alterações importantes na responsividade do eixo HPA dos animais estressados. Ratas grávidas foram adrenalectomizadas no 13º dia de gestação e implantadas com um *pellet* de 100 mg de corticosterona, quantidade esta tida como sendo suficiente para assegurar os limites basais deste hormônio. Estas ratas foram estressadas diariamente (contenção em cilindros) durante a última semana de gestação. A prevenção da liberação de corticosterona em resposta ao estresse pela adrenalectomia, associada à manutenção

dos níveis basais de corticosterona, preveniu tanto a ativação prolongada do eixo HPA como a *down-regulation* de receptores para mineralocorticóide observada no hipocampo da prole. Embora a liberação de outros hormônios maternos também tenha sido bloqueada pela adrenalectomia, o prejuízo na regulação do eixo HPA foi constatado na prole estressada após a administração de corticosterona em uma dose que mimetizava os níveis observados na circulação materna posterior ao estresse (BARBAZANGES et al., 1996a). Outra evidência de que os glicocorticóides maternos poderiam levar ao funcionamento anormal do eixo HPA e, por isso, alterar o comportamento da prole estressada, advém do achado de ser a administração de carbenoxolona, um inibidor da 11β HD2, capaz de induzir alterações no eixo HPA e no comportamento ansioso e depressivo, de forma semelhante ao observado em uma prole de ratos estressada (WELBERG; SECKL; HOLMES, 2000).

Como já mostrado, além da corticosterona, a mãe estressada libera vários outros hormônios e neurotransmissores (URSIN, 1998). Embora não se saiba exatamente o porquê, a prole adulta estressada *in utero* apresentou redução na expressão de mRNA para POMC no hipotálamo (WEINSTOCK et al., 1992) e uma *down-regulation* de receptores opióides no cérebro (INSEL et al., 1990; SANCHEZ et al., 1996; SANDERS, 1998). Uma redução no número de receptores opióides ou na ação das beta-endorfinas poderia resultar, também, em um aumento da liberação de CRH pela hipófise (PLOTSKY, 1986) e, possivelmente, da ação do CRH no núcleo central da amígdala, região implicada com as manifestações de medo e da ansiedade (MAKINO; GOLD; SCHULKIN, 1994). Isto talvez explique a ansiedade comumente relatada em ratos pré-natalmente estressados. De fato, alguns trabalhos da literatura têm mostrado ser possível reverter alguns comportamentos relacionados à aplicação de um estresse pré-natal através da manipulação do sistema opióide (KESHET; WEINSTOCK, 1995; WARD; MONAGHAN; WARD, 1986). Vathy, Etgen e Barfield (1985) mostraram, em especial, que a aplicação pré-natal de morfina a ratas resultou

em desmasculinização dos machos e inibição do comportamento sexual feminino, efeitos antes relacionados ao estresse pré-natal (WARD; STEHM, 1991). Mostrou-se, ainda, que a administração de naltrexona (um antagonista opióide) 3 vezes por dia a ratas grávidas foi capaz de reverter as alterações provocadas pelo estresse no comportamento sexual da prole (WARD; MONAGHAN; WARD, 1986). Todos estes trabalhos sugerirem uma ligação entre alguns dos efeitos relatados para o estresse pré-natal e a ativação do sistema opioidérgico em resposta ao estresse.

Alguns trabalhos examinaram mais especificamente os efeitos de um estresse pré-natal sobre o sistema imune da prole (FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002; KAY et al., 1998; KLEIN; RAGER, 1995; LLORENTE et al., 2002; MAZUR-KOLECKA et al., 1996; NOGUEIRA et al., 1999; PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001; SOBRIAN et al., 1997; SOBRIAN et al., 1992; TUCHSCHERER et al., 2002; VON HERTZEN, 2002). Sobrian et al. (1992, 1997) observaram diminuição dos níveis séricos de Ig G em uma prole de ratos submetida a um estresse durante o terço final de gestação (choque nas patas do 15º ao 21º dias de gestação) e estudada aos 7 e aos 28 dias de vida. Von Herten (2002) enumerou diversos trabalhos em humanos e animais que relacionavam exposição a um estresse materno com alterações na diferenciação Th1/Th2, o que aumentava a susceptibilidade dos animais à asma e atopia. Coe et al. (2002) mostraram, em uma prole de macacas submetidas a um estresse acústico, diminuição da secreção de $TNF\alpha$ e IL-6 em resposta ao LPS. Este experimento foi realizado na prole de macacos analisada aos 24 a 48 meses de idade, isto é, pré-púberes, fato que mostrou que os efeitos de um estresse pré-natal sobre o sistema imune perduram por um longo tempo. Bakker et al. (1995) mostraram que a aplicação de dexametasona a ratas do 17º ao 19º dia de gestação diminuía o número

de células T no baço da prole avaliada do 1º ao 20º dia de vida e diminuía o número de células T no timo da prole com 1 dia. Neste trabalho, os autores sugeriram que o tratamento com dexametasona atrasava a migração de células T para o baço, o que poderia resultar em prejuízos para a resposta imune da prole. Neste sentido, Tuchscherer et al. (2002) observaram que filhotes de porcas estressadas no final da gestação apresentavam diminuição das concentrações de Ig G e da capacidade proliferativa dos linfócitos esplênicos em resposta à concanavalina A e ao LPS. Os autores também relataram um aumento da morbidade e mortalidade da prole submetida ao estresse pré-natal.

Alguns autores estudaram a tríade estresse pré-natal, sistema imune e dimorfismo sexual. Em especial, Klein e Rager (1995) mostraram que a citotoxicidade das células NK de ratos era menor em machos que em fêmeas jovens, independente da exposição ao estresse *in utero*. Neste trabalho, a exposição a um estresse do 14º ao 21º dia de gestação reduziu ainda mais a atividade das células NK, porém, o fez apenas nos ratos machos adultos. Kay et al. (1998) mostraram que a aplicação de um estresse por luz e barulho durante toda a gestação diminuiu a citotoxicidade das células NK e dos linfócitos sanguíneos e a taxa de proliferação dos linfócitos esplênicos, efeitos estes que foram mais marcantes na prole de ratas fêmeas. Llorente et al. (2002) observaram que o estresse de ratas durante o terço final de gestação resultou em uma hipertrofia da adrenal, porém o achado foi relatado apenas na prole de fêmeas. Em resposta a um estresse crônico aplicado na idade adulta, apenas na prole de machos foi observado aumento no peso da adrenal (LLORENTE et al., 2002).

Esta tese analisa os efeitos de um estresse pré-natal e de algumas manipulações farmacológicas sobre o comportamento, a neuroquímica, os níveis

hormonais e a atividade de neutrófilos sanguíneos e macrófagos peritoneais da prole de camundongos machos e fêmeas. Os dados apresentados nesta revisão de literatura justificam a proposta deste trabalho. Entretanto, seria conveniente finalizar este capítulo revendo o papel importante desempenhado pelos macrófagos peritoneais e pelos neutrófilos sanguíneos nos mecanismos de defesa dos organismos.

2.5 ALGUMAS CONSIDERAÇÕES SOBRE MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS

Nos roedores, assim como em várias outras espécies animais, o macrófago é uma das principais células efetoras da imunidade celular, tendo como principal característica a capacidade de fagocitar partículas estranhas, como lipoproteínas plasmáticas e eritrócitos envelhecidos; atua, também, na eliminação de microorganismos e de células tumorais, seqüestrando materiais não metabolizáveis e secretando citocinas (GORDON, 1998; SHEVACH, 1984). Esta célula foi descrita em 1905, por Metchnikoff, que, através da observação com animais invertebrados e mamíferos, relatou serem estas células dotadas de capacidade fagocítica. A partir deste momento, com base em um elevado número de trabalhos, postulou-se uma teoria que envolve os fagócitos e a fagocitose nos mecanismos de resistência dos organismos às infecções, que permanece até os dias atuais.

Os macrófagos originam-se na medula óssea, a partir de um precursor chamado promonócito. Este se diferencia na corrente sanguínea em monócito, que pode ficar até 24 horas na circulação, e após este período migra para vários tecidos transformando-se, então, em macrófago (GORDON, 1986, 1998).

Ainda está um pouco obscuro o mecanismo através do qual se faz o reconhecimento de substâncias estranhas e de componentes de tecido lesado pelos macrófagos. Entretanto, sabe-se que duas opsoninas principais, a C3b (produto de

clivagem do componente C3) e a IgG (subtipos 1 e 3) participam do reconhecimento e da posterior fagocitose das bactérias ou do material estranho pelos macrófagos (MCEKEEVER; SPICER, 1980). Após o encontro dos macrófagos com agentes estranhos, ele passa de um estado dormente para o estimulado. Se o estímulo continua, esta célula expõe, na membrana celular, integrinas que participam do processo de ativação, como os receptores CR3, p150, LFA-1 e ICAM-1, que reconhecem outras moléculas de matrizes extra-celulares, aumentando a atividade metabólica e funcional dos macrófagos, o que resulta em um aumento da capacidade de espraiamento, fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio e secreção de citocinas. Nesta situação, o macrófago passa de estimulado para ativado (ADAMS; HAMILTON, 1984; JORENS et al., 1992; NEWSHOLME et al., 1999).

As EROs são resultantes de uma seqüência de reações bioquímicas de alto consumo de oxigênio conhecida por *burst* oxidativo. As EROs mais estudadas são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido, o radical hidroxila e o oxigênio *singlet* (BADWEY; KARNOVSKY, 1980; PICK; MIZEL, 1981). A produção destes derivados do oxigênio é importante para intensificar a capacidade microbicida e tumoricida dos macrófagos e neutrófilos.

Como em qualquer processo biológico, existe também, em relação à atividade dos macrófagos, a necessidade de se conter uma resposta exacerbada, que poderia ser deletéria. Por isso, as EROs, por serem altamente reativas, precisam ser biotransformadas a partir de destruição espontânea ou de ligação com outras substâncias como a vitamina C, a histidina, a bilirrubina, a vitamina E, o caroteno (SIES, 1997), bem como por desativação enzimática através da superóxido desmutase, a catalase e a glutathione peroxidase (CADENAS; SIES, 1985). Foi descrito, ainda, a produção de um fator de desativação de macrófagos (*macrophage deactivating factor*), secretado por fibroblastos, células endoteliais, células tumorais e

pelos próprios macrófagos (CAMARERO et al., 1990; SZURO-SUDOL; MURRAY; NATHAN, 1983).

Em muitas espécies animais os neutrófilos correspondem a aproximadamente 60% dos leucócitos circulantes; são diferenciados de outros polimorfonucleares por apresentarem núcleos multilobulados e grânulos citoplasmáticos distintos. Estes incluem grânulos primários ou azurófilos, secundários ou específicos e grânulos terciários, os quais contem enzimas, proteínas e glicosaminoglicanas que se acredita participem de muitas funções do neutrófilo (NEWSHOLME et al., 1999). Estas células respondem rapidamente a estímulos quimiotáticos, fagocitam e destroem bactérias, podem ser ativadas por citocinas produzidas por macrófagos e células endoteliais e são primordiais para o processo inflamatório (COTRAN; KUMER E ROBBINS, 1989).

De uma maneira geral os neutrófilos, juntamente com os macrófagos, exercem um papel importante na defesa orgânica contra microrganismos. Sendo assim, a migração desta célula dentro dos tecidos é considerada como sendo crucial e de grande importância para a sobrevivência dos organismos (LEHRER et al., 1988). Os neutrófilos podem ser atraídos quimiotaticamente por bactérias e por corpos estranhos presentes nas áreas de inflamação, juntamente com mastócitos e basófilos. Em seqüência, ocorre a fagocitose e em consequência desta, os microrganismos fagocitados são mortos por proteínas citotóxicas derivadas de grânulos citoplasmáticos e/ou por produção local de espécies reativas de oxigênio (STITES; TERR, 1991). Sabe-se que estas células também estão envolvidas na síntese e liberação de citocinas (IL-1, IL-6 E TNF- α) e que modulam os efeitos de linfócitos T e B (LLOYD; OPPENHEIM, 1992). Além da produção das EROs, os grânulos azurófilos dos neutrófilos produzem a enzima mieloperoxidase, que quando combinada com a H_2O_2 gera hipoclorito, que apresenta uma atividade antimicrobiana ainda mais eficaz (BRIGGS et al., 1995).

Assim como descrito para os macrófagos, os neutrófilos também se protegem dos efeitos nocivos das EROs através da produção de enzimas antioxidantes como

superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase-dismutase. Além disso, produzem compostos antioxidantes como as vitaminas E e C (PEREIRA et al., 1995).

A mensuração dos níveis de liberação de peróxido de hidrogênio é considerada como um parâmetro relevante de avaliação da ativação de fagócitos (NATHAN, 1987; ROOT, 1975). Esta mensuração pode ser realizada através da oxidação do “phenol red” dependente de peroxidase (Horseradish peroxidase-HRPO), sendo este método utilizado, por exemplo, para análise da ativação de células da cavidade peritoneal (FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002; PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001; PICK; MIZEL, 1981). Outro método para avaliação da atividade dos fagócitos que tem sido empregado com sucesso em nossos laboratórios, é através do uso do citômetro de fluxo (DA SILVA et al., 2003; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003). Dentre outras vantagens, esta técnica permite a quantificação da capacidade de fagocitose das células juntamente com a mensuração do *burst* oxidativo.

Os macrófagos e os neutrófilos, pela quantidade de citocinas e espécies reativas que produzem, estão amplamente envolvidos na resposta imune inata dos organismos. Diferentes trabalhos têm indicado que estas células participam dos processos de inflamação, de morte celular e tecidual, de transformações neoplásicas, da aterosclerose e do envelhecimento (HAMMOND; KONTOS; HESS, 1985; LEY; ARFORS, 1982).

Mostramos, nos capítulos anteriores, que a atividade destas células pode ser modulada pelo sistema nervoso central, através do eixo HPA ou do sistema nervoso autônomo simpático. A atividade destas pode também ser modulada por opióides. Especificamente, macrófagos e neutrófilos têm sua atividade alterada por opióide (COSTA, 2004), citocinas (BESEDOVSKY; DEL REY, 1997), glicocorticóide (MCEWEN et al., 1997) e catecolaminas (SANDERS, 1998). Por isso, escolhemos estas células como representantes da conexão neuroimunológica que queremos investigar neste trabalho.

3 OBJETIVOS

Serão descritos os objetivos de modo geral e de maneira detalhada.

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do estresse pré-natal sobre o comportamento, a atividade imune, os níveis hormonais e a neuroquímica em uma prole de camundongos Swiss, machos e fêmeas, com 30 dias de vida. Investigar a importância da corticosterona e dos opióides maternos nos efeitos do estresse pré-natal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o comportamento de uma prole de machos e fêmeas provenientes de fêmeas estressadas e/ou tratadas com naloxona e/ou metirapona do 15° ao 19° dia de gestação (GD15-GD19);

Avaliar a atividade de neutrófilos sanguíneos de uma prole de machos e fêmeas provenientes de fêmeas estressadas e/ou tratadas com naloxona ou metirapona do GD15-GD19;

Avaliar a atividade de macrófagos peritoneais de uma prole de machos e fêmeas provenientes de fêmeas estressadas e/ou tratadas com naloxona ou metirapona do GD15-GD19;

Avaliar os níveis de corticosterona e testosterona de uma prole de machos e fêmeas provenientes de fêmeas estressadas e/ou tratadas com naloxona ou metirapona do GD15-GD19;

Avaliar as concentrações hipotalâmicas de Nor e MHPG de uma prole de machos e fêmeas provenientes de fêmeas estressadas e/ou tratadas com naloxona ou metirapona do GD15-GD19;

Avaliar as concentrações estriatais de DA, DOPAC e HVA de uma prole de machos e fêmeas provenientes de fêmeas estressadas e/ou tratadas com naloxona ou metirapona do GD15-GD19;

Correlacionar os dados obtidos dentro de uma contextualização neuroimune.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Transcreve-se abaixo e de modo especificado os materiais e métodos utilizados neste trabalho.

4.1 ANIMAIS

Para obtenção dos filhotes foram utilizadas camundongas Swiss, virgens, com 45 a 50 dias de idade e acasaladas com machos experientes da mesma linhagem. Os animais foram cedidos pelo Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ - USP e permaneceram durante todo o experimento em caixas plásticas medindo 28 x 17 x 12, forradas com maravalha. O número de animais por caixa foi de 3, 2 fêmeas para cada macho. As caixas moradia foram mantidas em sala com aeração, exaustão, temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (45% - 65%) controladas por meio de aparelhos de ar condicionado central em um ciclo claro/escuro de 12 h com luz ligada às 7:00h; água e ração foram fornecidos “*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 nº09/2001).

As fêmeas foram sincronizadas na fase de anestro do ciclo estral; então, duas fêmeas foram colocadas junto com um macho e realizou-se a observação diária da presença do tampão vaginal indicativo de acasalamento. O dia da observação do tampão foi considerado como dia zero de gestação (GD0). No 10º dia de gestação (GD10), as fêmeas foram separadas dos machos e colocadas em caixas individuais,

permanecendo assim até o desmame dos filhotes, o que foi feito aos 21 dias – (PND21).

4.2 PARÂMETROS REPRODUTIVOS E GESTACIONAIS

Ao PND1, todas as ninhadas foram ajustadas para 6 filhotes por mãe, com 3 machos e 3 fêmeas, os quais foram examinados externamente, sexados e pesados. Os demais machos e as fêmeas restantes foram separados e descartados, sendo utilizados em outros experimentos conduzidos em nosso laboratório.

Os filhotes foram pesados no dia do nascimento (PND1) e ao desmame (PND21). Toda a manipulação da prole até o desmame foi realizada à mesma hora do dia (8:30 às 10:30 hs). Uma vez que a unidade de análise era a ninhada, marcaram-se os filhotes individualmente para identificação.

No PDN21, as ninhadas foram desmamadas e os filhotes separados em grupos de oito ou dez, de acordo com o sexo. Foram utilizados todos os filhotes da ninhada, sendo um deles usado em cada experimento realizado. Procurou-se, com este procedimento, evitar eventuais efeitos de variáveis paternas nos resultados obtidos. Foram utilizados de 8 a 10 filhotes por experimento, por sexo.

Os seguintes parâmetros reprodutivos foram analisados: duração da gestação, presença de natimortos, abortamentos, presença de mal-formação, peso da ninhada, número de filhotes e relação macho/fêmea.

4.3 APARELHOS E PROCEDIMENTOS

Descreve de maneira detalhada os aparelhos e procedimentos utilizados neste trabalho.

4.3.1 Caixa de choque e modelo de estresse

Utilizou-se para a indução do estresse a aplicação de um choque elétrico nas patas dos animais, através de um aparelho constituído de uma caixa de acrílico medindo 36 x 25 x 18 cm, dividida em 2 campos iguais, no sentido transversal, por uma divisória também de acrílico. O piso da caixa é constituído de 36 barras metálicas separadas entre si por 1 cm, que permitem a passagem de uma corrente elétrica com sistema alternador de polaridade e de intensidade controlável (0-1mA); as excretas dos animais foram coletadas por duas bandejas plásticas situadas abaixo destas barras. A parede frontal da caixa é de acrílico transparente, o que permite a visualização do animal no interior do aparelho; a tampa superior da caixa contém uma trava de segurança para que o animal não fuja. Esta caixa encontra-se acondicionada no interior de uma outra que serve de isolamento acústico e visual, medindo 80 x 51 x 54 cm, fazendo com que o experimento seja isento de variações que possam interferir no estudo do comportamento animal.

As funções da caixa de choque, como número das sessões de choque, tempo de duração de cada sessão, tempo de adaptação do animal na caixa antes do início das sessões de choque, tempo máximo e mínimo entre uma sessão e outra são

reguladas e monitoradas através de um *software* que realiza a interface entre o equipamento e um microcomputador.

O modelo de estresse escolhido para o experimento foi o de choques intermitentes e inescapáveis aplicados nas patas dos animais. O choque foi aplicado durante 5 dias nas fêmeas dos grupos estressados do GD15-GD19, das 8:00 as 12:00h da manhã, com intervalo de 24 horas entre as aplicações. Este modelo já vem sendo utilizado em nossos laboratórios (FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002; PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001). Este período de gestação corresponde à fase de desenvolvimento fetal de acordo com Bernardi (1996).

As fêmeas foram colocadas individualmente na caixa de choque. Após 3 minutos de adaptação, as fêmeas dos grupos estresse pré-natal, naloxona+estresse pré-natal e metirapona+estresse pré-natal foram submetidas a sessões de 5 segundos de choque de intensidade de 0,2 mA intercalados por períodos de “descanso” que variaram randomicamente de 5 a 25 seg. O número total de choques para cada animal foi 10 por dia. Acredita-se que as conseqüências comportamentais, fisiológicas e neuroendócrinas deflagradas por esta metodologia têm semelhanças com aquelas observadas durante o estresse (FILE, 1980). Em relação à amperagem do choque, em alguns modelos chegou-se a empregar até 2,0 mA (DE VRY et al., 1993). Entretanto, a amperagem utilizada na maioria dos trabalhos aponta para 0,2 mA como intensidade ideal (HIMI; SAITO; NAKAJIMA, 1990). Esta amperagem foi, portanto, escolhida para este trabalho.

4.3.2 Tratamento das mães com naloxona

O tratamento foi realizado do 15° ao 19° dia de gestação e consistiu da administração subcutânea de 1 mg/kg de naloxona (SIGMA®) diluída em solução salina estéril 0,9%, 30 minutos antes da aplicação do estresse pré-natal. Segundo Miranda-Paiva et al. (2001), este esquema de tratamento impede a ativação do sistema opióide após o estresse.

4.3.3 Tratamento das mães com metirapona

O tratamento foi realizado do 15° ao 19° dia de gestação e consistiu da administração oral (gavagem) de 75 mg/kg de metirapona (SIGMA®) diluída em propilenoglicol (PPG) 40%, 3 horas antes da aplicação do estresse pré-natal. Segundo Calvo et al. (1998) este esquema de tratamento é capaz de impedir a liberação dos glicocorticóides em resposta ao estresse.

4.3.4 Sistema de Observação Computadorizada – EthoVision

O sistema de observação indireta é constituído por uma filmadora instalada no teto da sala de observação, conectada a um monitor Sony - Triniton e a um microcomputador, localizados fora da sala. Para interpretar as imagens observadas durante a realização do campo aberto existe um *software* (EthoVision - Video Tracking, Motion & Behavior Recognition System - versão 1.90) que faz virtualmente as divisões do campo aberto em 3 áreas concêntricas - central, média e periférica - e do labirinto em cruz elevado em braços abertos, braços fechados e zona central. Este *software* ainda digitaliza e analisa os comportamentos dos animais nestes dois aparelhos.

4.3.5 Campo aberto e medida da atividade geral

Em um ambiente novo os animais tendem a explorá-lo ou podem ficar imóveis, com a musculatura tensa, vigilantes e de prontidão. Esta última reação, denominada *freezing* (congelamento), traduz-se por diminuição do comportamento exploratório e da atividade geral dos animais. A atividade geral pode ser avaliada pelo campo aberto; esse aparelho constitui em um bom teste para quantificação dos efeitos comportamentais do estresse e da ansiedade (BELZUNG; GRIEBEL, 2001)

O campo aberto é constituído de uma arena circular com 40,0 cm de diâmetro e 40,0 cm de altura, pintado de cinza, com o piso subdividido virtualmente pelo Ethovision descrito no item 4.3.4.

A atividade geral dos animais foi avaliada por meio da observação dos animais com o auxílio do Sistema de observação computadorizada descrito em 4.3.4. Desta forma, a presença do observador não interferiu com os parâmetros observados, uma vez que este ficou fora da sala onde se encontravam os animais em teste. É importante ressaltar que a sala onde foi realizado o experimento era pouco iluminada e sem nenhum tipo de ruído. Ainda, os animais dos diferentes grupos foram intercalados entre si para evitar possíveis interferências do ritmo circadiano sobre os resultados. Os animais eram colocados no centro do aparelho e eram observados por 5 minutos. A avaliação da atividade geral foi feita sempre no mesmo período do dia (das 8:30 às 12:00 hs) e entre as observações o aparelho foi limpo com uma solução de água-álcool 5,0%.

Os parâmetros considerados indicativos de atividade geral foram os seguintes:

- Locomoção total, central, média e periférica (cm): o quanto o animal caminhou, em centímetros, em todo ou em diferentes zonas do campo aberto;
- Levantar (frequência): entende-se por levantar ao movimento vertical de elevação do corpo do animal, que permanece apoiado sobre o trem posterior, sendo que as patas anteriores do mesmo podem ou não estar encostadas nas paredes laterais do campo aberto.

4.3.6 Medida de ansiedade por meio LCE

O modelo para estudo dos níveis de ansiedade foi aquele descrito por Pellow et al. (1985) e usado para camundongos por (LISTER, 1987). Assim como o campo aberto, o labirinto em cruz elevado é outro teste frequentemente utilizado em roedores para avaliação da ansiedade. Este aparelho foi validado tanto para drogas ansiolíticas,

com os benzodiazepínicos (PELLOW et al., 1985) como para as ansiogênicas, como o pentilenotetrazol, a ioimbina, a cafeína e a anfetamina (LAPIN, 1993; PELLOW et al., 1985). Trata-se de um labirinto em forma de cruz, de madeira pintado de cinza, constituído por dois braços abertos medindo 15 cm de comprimento por 5 cm de largura cada um, em oposição a dois braços fechados de iguais medidas, mas com paredes laterais de 15 cm de altura. Na intersecção entre os braços abertos e os fechados forma-se um espaço central de 25 cm² de área, denominado centro. O aparelho é colocado sobre um suporte a 45 cm do chão. Segundo Barnett (1956; 1958), os roedores têm preferência natural por locais próximos a superfícies verticais, provavelmente por ficarem menos expostos aos predadores. Este comportamento faz parte do repertório defensivo natural dos roedores (GROSSEN; KELLEY, 1972). Assim, sabe-se que animais muito ansiosos preferem os braços fechados do aparelho, enquanto drogas ansiolíticas aumentam a exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado.

Cada animal foi colocado no espaço central do aparelho sendo observado por 5 minutos com auxílio do *Ethovision*® descrito no item 4.3.4.

A avaliação dos animais no labirinto em cruz elevado foi baseado em Pellow et al. (1985) e sugere o registro dos seguintes parâmetros:

- Número de entrada nos braços abertos (EBA);
- Número de entrada nos braços fechados (EBF);
- Tempo de permanência nos braços abertos em segundos (TBA);
- Tempo de permanência nos braços fechados em segundos (TBF);
- Locomoção total em cm (Lo total).

Para comparação dos níveis de ansiedade entre os grupos foram consideradas as seguintes taxas:

- Taxa de entrada nos braços abertos (%EBA) = $EBA/(EBA + EBF)$;
- Taxa de permanência nos braços abertos (%TBA) = $TBA/(TBA + TBF)$.

Os animais dos diferentes grupos foram intercalados e as observações foram feitas sempre no mesmo horário (8:00 h às 12:00 h). Entre as observações, o labirinto foi limpo com uma solução de água-álcool 5,0%.

4.3.7 Preparo do sangue para estudo dos neutrófilos

No dia do experimento, os animais foram eutanasiados e o sangue total de cada animal foi coletado em tubos tipo *ependorf*, com 10 µl de LIQUEMINE® em cada. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente até o início do experimento. As coletas foram todas realizadas à mesma hora do dia (entre 8:00 e 9:00 hs) e os animais dos diferentes grupos foram intercalados para evitar possíveis interferências do ritmo circadiano nos resultados.

4.3.8 Preparo das células da cavidade peritoneal

No dia do experimento, a cavidade peritoneal foi lavada com 5 ml de PBS estéril, a 4°C, e os macrófagos foram coletados após massagem vigorosa dos órgãos

abdominais, para que um maior número de células se desprendesse e fosse aspirada junto com o PBS injetado.

Após a obtenção do lavado peritoneal foi feito um teste de viabilidade celular com o auxílio do corante Azul de Tripán. Todos os lavados obtidos apresentaram viabilidade celular superior a 90% e foram utilizados nos experimentos.

Para cada animal, procedeu-se então à contagem das células por ml em câmara de Neubauer, contando-se o quadrante central da câmara. O número de células encontrado foi ajustado para 1×10^6 células/ml, que é a quantidade de células padrão para a realização dos experimentos descritos a seguir.

4.3.9 Medida do burst oxidativo e da fagocitose através do citômetro de fluxo

Foi utilizado o método proposto por Hasui, Hirabayashi e Kobayashi (1989). Resumidamente, para cada amostra foi montada uma bateria de cinco tubos de propileno, conforme seqüência da figura 1:

- Tubo A: 100µl de sangue ou 2×10^6 células peritoneais/ml em 1 ml de PBS;
- Tubo B: 100µl de sangue ou 2×10^6 células peritoneais/ml, 200µl de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (0,3 µM) em 800µl PBS. O DCFH-DA reage com os radicais livres de oxigênio produzidos pelas células e emite fluorescência verde;
- Tubo C: 100µl de sangue ou 2×10^6 células peritoneais/ml, 100µl de SAPI (1ng/µl) em 900µl PBS. O iodeto de propideo (PI) se intercala no DNA do leucócito e emite uma fluorescência vermelha;

- Tubo D: 100µl de sangue ou 2×10^6 células peritoneais/ml, 200µl de DCFH-DA (0,3 µM), 100µl de *Staphilococcus aureus* conjugado com iodeto de propídeo (SAPI) em 700µl PBS;
- Tubo E: 100µl de sangue ou 2×10^6 células peritoneais/ml, 200µl de DCFH-DA (0,3 µM), 100µl de miristato forbol acetato (PMA) (1ng/µl) em 700µl PBS.

Figura 1 - Representação esquemática da seqüência de reagentes utilizados na técnica de *burst* e fagocitose, onde: Tubo A - PBS, Tubo B – DCFH; Tubo C – SAPI; Tubo D – DCFH+SAPI, Tubo E – DCFH+PMA. Adaptado de Costa, 2005.

O PMA e a SAPI foram usados como estímulos *in vitro* para a produção de radicais livres de oxigênio. O tubo com a SAPI sozinha foi utilizado para avaliação da fagocitose dos leucócitos. As amostras foram então colocadas em banho-maria, sob agitação, a 37°C por 30 minutos. As reações foram interrompidas pela adição de 2 ml de solução gelada de EDTA (3mM), que tem a capacidade também de remover as bactérias aderidas à membrana das células, mas não fagocitadas (HASUI; HIRABAYASHI; KOBAYASHI, 1989). A seguir as amostras foram centrifugadas por 10

minutos a 1200rpm e os eritrócitos foram lisados por uma solução estéril de NaCl 0,2% (2,0 ml) durante 20 segundos. Logo em seguida, uma solução estéril de NaCl 1,6% (2 ml) foi colocada em cada amostra para restaurar a isotonicidade. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm e os botões celulares obtidos foram ressuspensos adicionando-se 1 ml de EDTA gelado (3mM). A magnitude do *burst* oxidativo e da fagocitose foi avaliada pela citometria de fluxo. Para as amostras de peritônio o procedimento foi idêntico ao descrito acima substituindo-se os 100 µl de sangue por 1×10^6 células peritoneais/ml. A única diferença entre o processamento do sangue e das células peritoneais é que estas últimas não sofrem a lise hipotônica; logo após o término da reação com 2 ml de EDTA gelado estas células já estão prontas para a leitura em citômetro de fluxo.

Cada amostra passou pelo citômetro apenas 1 vez, e de cada uma foram adquiridos 10.000 eventos (células). Os valores referentes ao *burst* oxidativo das amostras foram avaliados através da média geométrica (*geo mean*) da intensidade de fluorescência emitida pelas populações de neutrófilos sanguíneos ou dos macrófagos peritoneais. Este valor é dado pelo aparelho após a escolha do *gate* representativo da população em estudo e a análise do histograma de fluorescência desta população. Uma população representativa de neutrófilos sanguíneos e macrófagos peritoneais, bem como seus histogramas de fluorescência, estão ilustrados nas figuras 2a e 2b, respectivamente.

Com relação à fagocitose, verificou-se o número de neutrófilos ou macrófagos que fagocitaram o *S.aureus* marcado com PI, e que por isso apresentavam fluorescência vermelha, dividido pelo número total destas células multiplicadas por 100. Avaliou-se, também, a intensidade de fagocitose, que significa quantas bactérias foram fagocitadas pelas células em estudo. Os valores da intensidade de fluorescência também foram registrados através da análise da *geo mean* de fluorescência emitida pelas células. As figuras 2a e 2b ilustram um histograma de análise da fagocitose dos neutrófilos sanguíneos e dos macrófagos peritoneais, respectivamente.

Figura 2a - Representação do estudo de citometria de fluxo realizada para neutrófilos sanguíneos. Em A - *dot plot* dos leucócitos sanguíneos. Está representado em laranja o *gate* dos neutrófilos; B - histograma de *burst* oxidativo dos neutrófilos; C – histograma da fagocitose dos neutrófilos

Figura 2b - Representação do estudo de citometria de fluxo realizada para macrófagos peritoneais. Em A - *dot plot* das células presentes no lavado peritoneal. Está representado em marrom o *gate* dos macrófagos; B - histograma de *burst* oxidativo dos macrófagos; C - histograma da fagocitose dos macrófagos

Foi utilizado um citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) conectado a um computador (Macintosh Apple®). Foram analisados 10.000 eventos utilizando-se o software Cell Quest Pro® (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). As propriedades celulares foram reconhecidas por meio das propriedades FSC/SSC (tamanho e complexidade interna da célula, respectivamente). Os dados de neutrófilos do sangue e de macrófagos peritoneais foram coletados excluindo-se as demais populações da amostra por meio da análise dos *gates*. A fluorescência verde do DCFH-DA é mensurada a 530 ± 30 nm (detector FL1). A fluorescência vermelha do PI é

mensurada a 585 ± 42 nm (detector FL2). O tubo 1 (branco) foi utilizado apenas para calibrar o aparelho, como controle de fluorescência negativa, por isso os valores deste tubo não foram analisados.

4.3.10 Dosagem hormonal – Corticosterona e Testosterona séricas

O sangue foi colhido e deixado à temperatura ambiente para a retração do coágulo. Utilizou-se a mesma amostra de soro para a determinação dos níveis séricos de corticosterona e de testosterona. A dosagem foi realizada por meio de radioimunoensaio de fase sólida. Para tanto, utilizou-se um contador gama (Packard Instrument Company, Meriden, CT). Nas das dosagens foi empregado um conjunto (Coat-a-Count, Los Angeles, CA) de reagentes comerciais especialmente desenvolvidos para a avaliação quantitativa dos níveis séricos de corticosterona ou testosterona em roedores sem qualquer tipo de extração química ou processo de purificação, valendo-se hormônio marcado com I^{125} (elemento radioativo traçador). O conjunto consiste de tubos de polipropileno revestidos internamente com anticorpo contra corticosterona ou a testosterona de camundongo, frasco de hormônio marcado (I^{125} -corticosterona) na forma líquida, frascos contendo padrões dos hormônios nas seguintes concentrações: 0, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 ng de hormônio por ml de soro sanguíneo. Quanto maior a concentração do hormônio na amostra testada, menor a radiação contada pelo contador gama. Isto ocorre porque o hormônio marcado com I^{125} liga-se em menor quantidade aos anticorpos que estão no tubo do kit. O coeficiente de variação intra-ensaio da corticosterona e da testosterona foi de 2,8% e 3,2%, respectivamente.

Na tentativa de diminuir a variabilidade das amostras e evitar possíveis efeitos de estresses indesejáveis nos níveis hormonais, os camundongos foram manipulados diariamente para se habituarem às condições experimentais de coleta de sangue. As amostras foram colhidas à mesma hora do dia (entre 8:00 e 9:00 h) para minimizar os efeitos do ritmo circadiano sobre os níveis hormonais.

4.3.11 Neuroquímica

A dosagem de aminas cerebrais, metabólitos e *turnover* foi realizada por meio de HPLC, que teve como finalidade fornecer possíveis subsídios para serem associados aos parâmetros comportamentais e imunes avaliados.

Os animais foram sacrificados por decaptação e seus cérebros lavados com solução salina gelada (4°C). Imediatamente após, o cérebro foi dissecado sobre uma placa de gelo rodeado por pedras de gelo seco, formando assim um micro-ambiente o mais frio possível. Foram retirados o estriado do hemisfério esquerdo e o hipotálamo, pesados e congelados a - 80°C num tempo máximo de 3 minutos, onde permaneceram por um tempo máximo de 1 mês. Esses tecidos foram, então, homogeneizados por sonicação, durante 2 ou 3 minutos sobre uma cuba de gelo seco, com solução de ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02 % de Na₂S₂O₅, EDTA dissódico e uma concentração conhecida de DHBA, 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 homogeneizados foram mantidos durante a noite a 4°C, com a finalidade de se obter uma boa precipitação das proteínas e ácidos nucleicos e conseqüentemente, melhor purificação das amostras. Após esta etapa, o material foi centrifugado a 11.000

g por 30 min a 4°C. As dosagens de noradrenalina (Nor) e metabólito (MHPG) foram feitas no hipotálamo, enquanto a de dopamina (DA) e metabólitos (DOPAC e HVA) no estriado.

A análise das catecolaminas foi realizada por um HPLC (model 6A, Shimadzu, Kyoto, Japan) com coluna especificação C-18 (Shimpak, ODS, Kyoto, Japan), acoplados a um detector eletroquímico (model 6A, Shimadzu), um injetor de amostras (válvula para 20 µl) e um integrador (model 6A Chromatopac, Shimadzu). O limite de detecção foi 0,02 ng para DA, DOPAC, Nor e MHPG. O *turnover* de Nor foi expresso pela relação MHPG/Nor e o de dopamina pelas relações DOPAC/DA e HVA/DA. A taxa de recuperação foi maior de 95% para todas as amostras estudadas.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Antes de aplicar a análise estatística destinada à interpretação dos resultados obtidos, procurou-se verificar, através do teste de Bartlett, qual o tipo de análise – paramétrica ou não paramétrica - seria o mais adequado para avaliar cada situação experimental. Como teste paramétrico, foi utilizada a ANOVA de uma via. A este teste seguiu-se o teste de Student-Newman-Keuls de comparações múltiplas para verificação dos contrastes. Em alguns casos, os dados foram transformados em log a fim de se adequarem ao teste paramétrico. Se, após esta transformação, os dados ainda se comportassem como não paramétricos, era aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste U de Mann-Whitney para verificação dos contrastes. Todos os experimentos representam de 2 a 3 replicações. O parâmetro número de partos a termo foi avaliado pelo teste do Qui-Quadrado. Foram considerados significantes em todos os testes resultados com $p < 0,05$.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Além de estudar outros efeitos do estresse pré-natal diferentes daqueles por nós descritos no mestrado (FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002), outro objetivo desta tese foi investigar qual a participação do sistema opioide e da corticosterona nas alterações induzidas pelo estresse pré-natal. Sendo assim, esta tese está dividida em dois blocos de investigação.

5.1 EXPERIMENTO 1 AO EXPERIMENTO 5

Estes experimentos destinam-se a esclarecer a relação do sistema opioide com os efeitos do estresse pré-natal. Nestes experimentos o delineamento foi o que segue:

Foram utilizadas 64 fêmeas, distribuídas igualmente em 4 grupos:

- CONTROLE – as fêmeas foram tratadas, uma vez por dia, do GD15 ao GD19 com solução salina 0,9% sc, diluente da naloxona;
- EPN - as fêmeas foram submetidas a sessões diárias de estresse, do GD15 ao GD19, conforme descrito no item 4.3.1;
- NALOXONA+EPN (Nal+EPN) - as fêmeas foram tratadas com 1 mg/kg sc de naloxona (SIGMA®), 30 minutos antes do EPN descrito acima;
- NALOXONA (Nal) - as fêmeas foram tratadas com 1 mg/kg sc de naloxona (SIGMA®) do GD15 ao GD19.

Após o desmame foram formados 4 grupos de animais/sexo, com 8 machos e 8 fêmeas Swiss cada e que foram distribuídos respeitando-se o tratamento dado às mães durante a gestação. Todos os experimentos foram realizados na prole aos 30 dias de vida. É importante ressaltar novamente que dentro do mesmo experimento não foram utilizados animais de uma mesma ninhada. No dia do nascimento os filhotes de todas as ninhadas foram identificados individualmente, tendo sido deixados apenas 6 filhotes por mãe, 3 machos e 3 fêmeas. No dia do desmame, um filhote/sexo da ninhada foi destinado ao comportamento, outro à avaliação da atividade de neutrófilos e macrófagos (que foi realizada no mesmo animal) e o terceiro para estudo dos níveis de corticosterona e testosterona (técnica também realizada com o soro do mesmo animal). Posteriormente, outras 32 fêmeas foram acasaladas, no dia do nascimento foram deixados apenas 6 filhotes/mãe, 3 machos e 3 fêmeas, e apenas um filhote/sexo de cada ninhada foi utilizado para a realização de análises neuroquímicas. Os filhotes restantes foram utilizados para replicações dos resultados dos experimentos aqui descritos ou para a realização de outros trabalhos desenvolvidos nos nossos laboratórios.

Os tratamentos foram realizados todos à mesma hora do dia (10:00 às 12:00).

5.2 EXPERIMENTO 6 AO EXPERIMENTO 10:

Estes experimentos destinam-se a esclarecer a importância da corticosterona para os efeitos do estresse pré-natal. Nestes experimentos o delineamento foi o seguinte:

Foram utilizadas 80 fêmeas, distribuídas igualmente em 4 grupos:

- PPG40%— as fêmeas foram tratadas, uma vez por dia, do GD15 ao GD19 com PPG40% via oral, diluente da metirapona;
- EPN - as fêmeas foram submetidas às sessões diárias de estresse, do GD15 ao GD19, conforme descrito no item 4.3.1;
- METIRAPONA+EPN (Met+EPN) - as fêmeas foram tratadas com 75 mg/kg de metirapona (SIGMA®) por via oral, 3 horas antes da aplicação do EPN descrito acima;
- METIRAPONA (Met) - as fêmeas foram tratadas com 75 mg/kg de metirapona (SIGMA®) por via oral do GD15 ao GD19.

Os tratamentos foram realizados todos à mesma hora do dia (8:00 as 8:30 hs, choque das 11:00 às 11:30).

Após o desmame foram formados 4 grupos de animais, com 10 machos e 10 fêmeas Swiss cada e que foram distribuídos respeitando-se o tratamento dado às mães durante a gestação. Todos os experimentos foram realizados na prole aos 30 dias de vida. Nestes experimentos, também tivemos o cuidado de utilizar apenas um filhote/sexo/ninhada. A distribuição dos animais dentro dos experimentos foi a mesma descrita para os experimentos 1 a 5.

Realizamos diversos experimentos piloto que mostraram que a prole das fêmeas tratadas com solução salina, por gavagem, apresentava resultados semelhantes à prole tratada com PPG40%, por isso apresentamos apenas os resultados da prole tratada como PPG40% e assumiremos este grupo como controle dos experimentos 6 a 10.

6 RESULTADOS

Neste capítulo descrevem-se os resultados obtidos no presente trabalho.

6.1 EXPERIMENTO 1: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM NALOXONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE A ATIVIDADE GERAL E OS NÍVEIS DE ANSIEDADE DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS

Antes de descrever os resultados propriamente ditos, as tabelas 1 e 2 mostram os efeitos do estresse pré-natal e/ou da naloxona sobre os parâmetros reprodutivos e gestacionais das fêmeas. Esta avaliação é essencial para qualquer experimento conduzido no período neonatal. Como mostra a tabela 1, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos em relação aos parâmetros reprodutivos avaliados. A tabela 2 mostra que também não foram observadas diferenças entre os grupos em relação ao peso da prole no PND1 ou no PND21.

Tabela 1 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre parâmetros reprodutivos das fêmeas Swiss

Grupos ¹	partos a termo (partos/total)	Duração gestação-dias (med±SD)	nº de filhotes (med±SD)	Relação macho/fêmea (med±SD)
C	8/8	20,50±0,22	9,33±1,14	1,02±0,30
EPN	8/8	20,17±0,31	11,33±0,56	1,58±0,62
Nal+EPN	8/8	19,17±0,48	9,83±0,95	2,21±0,47
Nal	8/8	19,33±0,56	8,30±1,23	1,32±0,27

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. n = 8 animais/grupo

Tabela 2 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre o peso da prole de camundongos tomados no PND1 e no PND21. Os dados representam a média±desvio-padrão (SD)

Grupos ¹	PND1 (g)	PND21 (g)
C	1,73±0,10	25,25±0,45
EPN	1,85±0,09	24,13±0,95
Nal+EPN	1,80±0,12	25,63±0,94
Nal	1,75±0,14	23,12±0,61

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona

A tabela 3 mostra o efeito da naloxona e/ou do EPN aplicados no terço final de gestação sobre a atividade geral da prole de camundongos machos avaliada no campo aberto, aos 30 dias de vida. Da análise estatística dos resultados verificou-se um aumento na locomoção total dos animais estressados *in utero* que foi revertida pelo tratamento com naloxona ($F(3,28)=4,09$, $p=0,02$). O tempo de imobilidade não foi diferente entre os grupos ($F(3,28)=2,77$, $p=0,06$). A figura 3 ilustra estes dados.

Tabela 3 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre a atividade geral de uma prole de machos Swiss em campo aberto, no PND30. Os dados representam a média±SE (erro padrão da média)

Grupos ¹	Lot (cm)	Loc (cm)	Lop (cm)	Lev (freqcia)
C	3875,54±313,48	339,63±51,90	280,44±329,82	54,38±7,67
EPN	4815,52±262,66*	380,15±132,08	3526,32±222,96	58,23±8,16
Nal+EPN	3538,91±299,90#	311,04±102,68	2476,84±260,41#	45,38±4,01
Nal	4110,38±168,79	337,55±138,22	3027,70±180,10	48,87±23,04

* $p<0,05$ em relação ao grupo controle, # $p<0,05$ em relação ao grupo EPN, dentro do mesmo parâmetro, One-Way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

Lot = locomoção total, Loc = locomoção central, Lop = locomoção periférica, Lev = levantar

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. n = 8 animais/grupo

Figura 3 - Efeitos de um estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona (1mg/kg) sobre a locomoção de camundongos machos Swiss, aos 30 dias de idade, em campo aberto. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo EPN, one-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. Lot = locomoção total, Loc = locomoção central, Lop = locomoção periférica, Lev = levantar. $n = 8$ animais/grupo

A tabela 4 mostra os efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre os níveis de ansiedade dos machos Swiss, avaliados no labirinto em cruz elevado, no dia subsequente à exposição ao campo aberto. Neste parâmetro não foi possível verificar a existência de qualquer diferença estatística significativa entre os grupos. A locomoção total dos animais no aparelho também não foi diferente entre os grupos ($F(3,28)=0,35$; $p=0,79$).

Tabela 4 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre o nível de ansiedade de uma prole de machos Swiss avaliada no labirinto em cruz elevado no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ¹	% EBA	% TBA	% EBF	% TBF
C	14,32 $\pm$ 3,70	20,18 $\pm$ 4,34	85,68 $\pm$ 3,70	81,69 $\pm$ 3,47
EPN	20,09 $\pm$ 3,23	15,40 $\pm$ 6,50	79,91 $\pm$ 3,22	84,60 $\pm$ 2,30
Nal+EPN	26,53 $\pm$ 5,63	16,08 $\pm$ 2,51	73,47 $\pm$ 5,63	86,30 $\pm$ 2,56
Nal	16,95 $\pm$ 4,36	10,86 $\pm$ 4,42	83,05 $\pm$ 4,36	89,13 $\pm$ 1,56

EBA = entrada nos braços abertos, TBA = tempo de permanência nos braços abertos, EBF = entrada nos braços fechados, TBF = tempo de permanência nos braços fechados

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. $n = 8$ animais/grupo

Os dados comportamentais mostrados a seguir referem-se à prole de fêmeas, avaliadas no PND30. Desta forma, a tabela 5 mostra e a figura 4 ilustra o efeito da naloxona e/ou do estresse pré-natal aplicados no terço final de gestação sobre a atividade geral das fêmeas avaliada no campo aberto. A análise estatística destes dados mostrou que as fêmeas estressadas prenatalmente apresentaram um aumento da frequência de levantar, que foi revertido pelo tratamento com naloxona. As fêmeas submetidas ao tratamento com naloxona (grupo Nal) também apresentaram aumento da frequência de levantar ($F(3,28)=5,76$). Ainda, tanto as fêmeas estressadas *in utero* como as estressadas e tratadas com naloxona apresentaram aumento da locomoção total avaliada no campo aberto ($F(3,28)=4,32$). Os animais estressados durante a gestação apresentaram menor tempo de imobilidade se comparado ao grupo controle, $F(3,28)=3,23$; $p=0,04$).

Tabela 5 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre a atividade geral em campo aberto de uma prole de fêmeas Swiss avaliada no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ¹	Lot (cm)	Lo centro (cm)	Lop (cm)	Lev (freqcia)
C	3426,10 $\pm$ 197,42	337,19 $\pm$ 47,98	2440,11 $\pm$ 143,09	59,50 $\pm$ 5,03
EPN	4390,30 $\pm$ 231,08*	301,71 $\pm$ 35,70	3231,80 $\pm$ 234,24	90,00 $\pm$ 9,76*
Nal+EPN	4185,27 $\pm$ 174,82*	331,05 $\pm$ 63,26	2816,28 $\pm$ 307,31	67,50 $\pm$ 5,42
Nal	3980,65 $\pm$ 190,97	433,62 $\pm$ 73,23	2775,02 $\pm$ 212,90	90,00 $\pm$ 4,51*

* $p<0,05$ em relação ao grupo controle, One-Way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

Lot = locomoção total, Loc = locomoção central, Lop = locomoção periférica, Lev = levantar

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. n = 8 animais/grupo

Figura 4 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com naloxona (1mg/kg) sobre a atividade geral de fêmeas Swiss, aos 30 dias de idade, observadas em campo aberto. Em **A**: locomoção, **B**: frequência de levantar. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. Lot = locomoção total, Loc = locomoção central, Lop = locomoção periférica, Lev = levantar. $n = 8$ animais/grupo

A tabela 6 mostra o efeito da naloxona e/ou do estresse pré-natal aplicados no terço final de gestação sobre os níveis de ansiedade das fêmeas avaliadas no labirinto em cruz elevado. A análise dos dados revelou que a manipulação pré-natal seja a exposição ao estresse, a aplicação de naloxona ou ambos, diminuiu a %TBA ($F(3,28)=3,51$, $p=0,03$). Ainda, a associação naloxona+estresse pré-natal aumentou a %TBF das fêmeas avaliadas no labirinto em cruz elevado ($F(3,28)=3,24$, $p=0,037$). Não foi possível verificar diferenças estatísticas entre os grupos nos parâmetros %EBA e %EBF, nem na locomoção total no labirinto em cruz elevado. A figura 5 ilustra esses resultados.

Tabela 6 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre os níveis de ansiedade de uma prole de fêmeas Swiss avaliada no labirinto em cruz elevado no PND30. Os dados representam a média±SE

Grupos ¹	%EBA	%TBA	%EBF	%TBF
C	25,33±5,42	36,41±4,20	74,67±5,42	65,02±4,18
EPN	29,12±3,60	21,15±3,32*	70,88±3,60	78,85±3,32
Nal+EPN	26,66±4,38	20,65±3,52*	73,34±4,38	81,60±3,91*
Nal	29,39±4,38	23,40±4,67*	70,61±3,81	76,60±4,67

*p<0,05 em relação ao grupo controle, dentro do mesmo parâmetro. One-Way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

EBA = entrada nos braços abertos, TBA = tempo de permanência nos braços abertos, EBF = entrada nos braços fechados, TBF = tempo de permanência nos braços fechados

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona.. n = 8 animais/grupo

Figura 5 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com naloxona (1mg/kg) sobre os níveis de ansiedade de fêmeas Swiss, aos 30 dias de idade, observadas no labirinto em cruz elevado. Em **A**: % de exploração dos braços abertos, **B**: % de exploração dos braços fechados. *p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. EBA = entrada nos braços abertos, TBA = tempo de permanência nos braços abertos, EBF = entrada nos braços fechados, TBF = tempo de permanência nos braços fechados. n = 8 animais/grupo

6.2 EXPERIMENTO 2: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM NALOXONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS SANGÜÍNEOS DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS

A tabela 7 mostra e a figura 6 ilustra os efeitos da naloxona e/ou estresse pré-natal aplicados no terço final de gestação sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos sangüíneos de camundongos machos, avaliados aos 30 dias de vida. Neste experimento, observou-se que o tratamento com naloxona, seja antes do estresse ou sozinho, diminuiu a produção de radicais livres de oxigênio por neutrófilos de camundongos Swiss após estímulo *in vitro* com PMA ($F(3,28)=7,64$, $p=0,0007$) ou SAPI ($F(3,28)=7,42$, $p=0,0008$), quando comparado ao grupo controle ou EPN.

Tabela 7 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos sanguíneos de machos Swiss avaliados no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ¹	DCFH	DCFH +PMA	DCFH +SAPI
C	3,29 $\pm$ 0,65	7,49 $\pm$ 1,54	16,73 $\pm$ 3,25
EPN	3,21 $\pm$ 0,63	5,92 $\pm$ 1,04	12,33 $\pm$ 5,72
Nal+EPN	2,48 $\pm$ 0,31	3,19 $\pm$ 0,77*#	6,08 $\pm$ 1,38*#
Nal	3,28 $\pm$ 0,86	2,28 $\pm$ 0,44*#	5,10 $\pm$ 0,52*#

* $p<0,05$ em relação aos grupos controle # $p<0,05$ em relação ao respectivo grupo EPN. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. n = 8 animais/grupo

Figura 6 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com naloxona (1mg/kg) sobre o burst oxidativo de neutrófilos sangüíneos de machos Swiss, aos 30 dias de idade, após estímulo com PMA (A) ou SAPI (B). * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle, controle # $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo EPN. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. $n = 8$ animais/grupo

A tabela 8 mostra os efeitos de um EPN e/ou do tratamento com naloxona do GD15 ao GD19 sobre a capacidade de fagocitose dos neutrófilos sangüíneos. A fagocitose foi medida através de 2 parâmetros: 1. % de fagocitose – dentro do *gate* de neutrófilos, indica quantas células fagocitaram partículas de SAPI (*Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propideo); 2.– índice da fagocitose (expresso pela intensidade de fluorescência emitida pelas células): indica quantas partículas de SAPI foram fagocitadas pelos neutrófilos. Quanto maior a intensidade de fluorescência, mais partículas da bactéria foram ingeridas. Como pode ser observado, nenhum dos tratamentos empregados alterou a capacidade de fagocitose dos neutrófilos sangüíneos da prole de machos.

Tabela 8 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre a capacidade de fagocitose dos neutrófilos sanguíneos de machos avaliados no PND30. Os dados representam a média±SE

Grupos ¹	Índice	Porcentagem
C	4,49±0,69	58,40±5,46
EPN	3,72±1,52	47,21±5,96
Nal+EPN	4,61±0,40	59,02±4,31
Nal	4,34±0,59	55,94±5,41

Índice: quantas bactérias foram ingeridas pela população de neutrófilos. Expresso pela intensidade de fluorescência da população de neutrófilos. **Porcentagem:** quantos neutrófilos fagocitaram partículas de SAPI

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. n=8 animais/grupo

Os dados que virão a seguir referem-se ao estudo da atividade dos neutrófilos sanguíneos da prole de fêmeas, avaliadas também no PND30. A tabela 9 mostra os dados do *burst* oxidativo dos neutrófilos. Como pode ser observado, a naloxona aplicada 30 minutos antes do EPN reverteu o aumento do *burst* apresentado pela prole estressada após estímulo *in vitro* com SAPI ($F(3,28)=3,36$) e diminuiu o *burst* oxidativo estimulado pelo PMA em relação à prole controle ($F(3,28)=3,17$). Ainda, o tratamento com naloxona, seja sozinho ou em associação ao estresse, diminuiu o *burst* oxidativo basal em comparação ao grupo EPN ($F(3,28)=5,83$). A figura 7 ilustra estes efeitos.

Tabela 9 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos sanguíneos de fêmeas Swiss avaliadas no PND30. Os dados representam a média±SE

Grupos ¹	DCFH	DCFH + PMA	DCFH +SAPI
C	3,49±0,43	7,60±0,73	13,42±1,96
EPN	4,48±0,38	6,94±0,58	22,34±3,28*
Nal+EPN	2,78±0,45#	4,80±0,75*	12,90±1,73#
Nal	2,42±0,45#	5,25±0,90	19,85±2,95

*p<0,05 em relação aos grupos controle, #p<0,05 em relação ao grupo EPN. One-Way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona.. n = 8 animais/grupo

Figura 7 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com naloxona (1mg/kg) sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos sangüíneos de fêmeas Swiss, avaliados aos 30 dias de idade. **A** – *burst* basal, **B** – *burst* após estímulo *in vitro* com PMA, **C** - *burst* após estímulo *in vitro* com SAPI. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$ em relação ao grupo EPN, one-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. $n = 8$ animais/grupo

A tabela 10 mostra e a figura 8 ilustra os efeitos de um EPN e/ou do tratamento com naloxona do GD15 ao GD19 sobre a capacidade de fagocitose dos neutrófilos sangüíneos das fêmeas. Como pode ser observado, o tratamento com naloxona sozinho aumentou os dois parâmetros de fagocitose analisados ($F_{\text{índice fagocitose}}(3,28)=2,95$, $p=0,05$; $F_{\% \text{fagocitose}}(3,28)=4,42$, $p=0,01$).

Tabela 10- Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre a capacidade de fagocitose dos neutrófilos sanguíneos de fêmeas avaliadas no PND30. Os dados representam a média±SE

Grupos ¹	Índice	Porcentagem
C	3,69±0,19	45,53±2,56
EPN	4,93±0,40	60,24±3,48
Nal+EPN	3,55±0,51	52,12±3,64
Nal	6,46±1,24* ^{&}	69,00±7,54*

*p<0,05 em relação ao grupo controle, [&]p<0,05 em relação ao grupo Nal+EPN. One way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

Índice: quantas bactérias foram ingeridas pela população de neutrófilos. Expresso pela intensidade de fluorescência da população de neutrófilos. **Porcentagem:** quantos neutrófilos fagocitaram partículas de SAPI

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. n = 8 animais/grupo

Figura 8 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com naloxona (1mg/kg) sobre a capacidade de fagocitose de neutrófilos sanguíneos de fêmeas Swiss, avaliados aos 30 dias de idade. A – Índice de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. *p<0,05 em relação ao grupo controle, [&]p<0,05 em relação ao grupo Nal+EPN. One way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. n = 8 animais/grupo

6.3 EXPERIMENTO 3: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM NALOXONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE A ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS

A tabela 11 mostra os efeitos da naloxona e/ou estresse pré-natal aplicados no terço final de gestação sobre o *burst* oxidativo de macrófagos peritoneais de machos, avaliados no PND30. Nesta situação, não foi possível evidenciar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos; observou-se, apenas, uma tendência do grupo estressado em apresentar maiores níveis de *burst* espontâneo que os demais grupos ($F(3,28)=2,46$, $p=0,084$).

Tabela 11 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou da naloxona sobre o *burst* oxidativo de macrófagos peritoneais de machos Swiss avaliados no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ¹	DCFH	DCFH +PMA	DCFH +SAPI
C	22,58 $\pm$ 4,10	20,16 $\pm$ 5,17	10,94 $\pm$ 2,62
EPN	37,44 $\pm$ 5,44	25,50 $\pm$ 5,42	12,28 $\pm$ 2,08
Nal+EPN	22,04 $\pm$ 4,17	21,31 $\pm$ 3,30	14,61 $\pm$ 3,09
Nal	25,67 $\pm$ 4,50	21,77 $\pm$ 4,82	13,24 $\pm$ 1,23

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. n=8 animais/grupo

A tabela 12 mostra e a figura 9 ilustra os efeitos de um estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona do GD15 ao GD19 sobre a capacidade de fagocitose dos macrófagos peritoneais dos camundongos machos. Da mesma forma como já explicado para os neutrófilos sangüíneos, a fagocitose dos macrófagos peritoneais também foi medida através de dois parâmetros: o índice e a % de fagocitose. Como pode ser observado, houve uma diminuição significativa no índice de fagocitose do grupo EPN, fato que foi prevenido pela aplicação de naloxona antes do estresse

($F(3,28)=4,68$, $p=0,009$). Ainda, pode-se observar que o estresse *in utero* também diminuiu a porcentagem de fagocitose. Esta diminuição foi novamente prevenida pela aplicação de naloxona 30 minutos antes da exposição ao estresse. Finalmente, a tabela 12 mostra que o tratamento com naloxona, sozinho, diminuiu a porcentagem de neutrófilos que realizaram fagocitose ($F(3,28)=11,40$, $p<0,0001$)

Tabela 12 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre a capacidade de fagocitose dos macrófagos peritoneais de machos avaliados no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ¹	Índice	Porcentagem
C	5,53 $\pm$ 0,93	47,29 $\pm$ 6,69
EPN	2,14 $\pm$ 0,28*	13,34 $\pm$ 3,64*
Nal+EPN	4,66 $\pm$ 0,94#	42,62 $\pm$ 5,57#
Nal	3,13 $\pm$ 0,28	20,71 $\pm$ 2,55*&

* $p<0,05$ em relação ao grupo controle, # $p<0,05$ em relação ao grupo EPN, & $p<0,05$ em relação ao grupo Nal+EPN. One way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

Índice: quantas bactérias foram ingeridas pela população de neutrófilos. Expresso pela intensidade de fluorescência da população de neutrófilos. **Porcentagem:** quantos neutrófilos fagocitaram partículas de SAPI

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. n = 8 animais/grupo

Figura 9 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com naloxona (1mg/kg) sobre a capacidade de fagocitose de macrófagos peritoneais de machos Swiss, avaliados aos 30 dias de idade. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle, # $p<0,05$ em relação ao grupo EPN, & $p<0,05$ em relação ao grupo Nal+EPN. One way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. n = 8 animais/grupo

Os resultados da prole de fêmeas são descritos a seguir. Como pode ser observado na tabela 13, o *burst* espontâneo apresenta-se diminuído no grupo de fêmeas estressadas, fato este que foi prevenido pela aplicação de naloxona antes do estresse ($F(3,28)=3,57$, $p=0,03$). O *burst* induzido pelo PMA também estava diminuído no grupo EPN, de igual forma, o tratamento anterior com naloxona preveniu esse efeito ($F(3,28)=4,45$, $p=0,01$). Por fim, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes em relação ao *burst* oxidativo induzido pela SAPI ($F(3,28)=2,06$, $p=0,13$). A figura 10 ilustra os resultados do *burst* oxidativo dos macrófagos peritoneais das fêmeas.

Tabela 13 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre o *burst* oxidativo de macrófagos peritoneais de fêmeas avaliadas no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ¹	DCFH	DCFH +PMA	DCFH +SAPI
C	21,56 $\pm$ 3,12	20,67 $\pm$ 3,10	10,98 $\pm$ 1,53
EPN	10,67 $\pm$ 1,42*	8,53 $\pm$ 1,77*	6,82 $\pm$ 0,83
Nal+EPN	16,08 $\pm$ 1,58	19,88 $\pm$ 2,45#	9,47 $\pm$ 1,54
Nal	16,48 $\pm$ 2,83	16,44 $\pm$ 3,00#	7,26 $\pm$ 1,39

* $p<0,05$ em relação aos grupos controle, # $p<0,05$ em relação ao grupo EPN One way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. n = 8 animais/grupo

Figura 10 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com naloxona (1mg/kg) sobre o *burst* oxidativo de macrófagos peritoneais de fêmeas Swiss, avaliados aos 30 dias de idade. A – *burst* basal, B – *burst* após estímulo *in vitro* com PMA. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle, # $p<0,05$ em relação ao grupo EPN, one-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. n = 8 animais/grupo

A tabela 14 mostra e a figura 11 ilustra os efeitos de um EPN e/ou do tratamento com naloxona do GD15 ao GD19 sobre a capacidade de fagocitose de macrófagos das fêmeas. Como pode ser observado, o estresse pré-natal diminuiu o índice de fagocitose, enquanto o tratamento com naloxona sozinha aumentou (F(3,28)=5,23). Ainda, o tratamento com naloxona, seja associado ao estresse pré-natal ou sozinho, preveniu a diminuição da porcentagem de fagocitose apresentada pelo grupo EPN (F(3,28)=6,12).

Tabela 14 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre a capacidade de fagocitose dos macrófagos peritoneais de fêmeas Swiss avaliadas no PND30. Os dados representam a média±SE

Grupos ¹	Índice	Porcentagem
C	4,77±0,39	37,08±4,63
EPN	2,60±0,29*	18,51±2,64*
Nal+EPN	3,51±0,46	34,92±9,24#
Nal	5,03±0,73#	41,75±4,52#

*p<0,05 em relação ao grupo controle, #p<0,05 em relação ao grupo EPN. One way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

Índice: quantas bactérias foram ingeridas pela população de neutrófilos. Expresso pela intensidade de fluorescência da população de neutrófilos. **Porcentagem:** quantos neutrófilos fagocitaram partículas de SAPI

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. n = 8 animais/grupo

Figura 11 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com naloxona (1mg/kg) sobre a capacidade de fagocitose macrófagos de fêmeas Swiss, avaliada aos 30 dias de idade. *p<0,05 em relação ao grupo controle, #p<0,05 em relação ao grupo EPN. One way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. n = 8 animais/grupo

6.4 EXPERIMENTO 4: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM NALOXONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA E TESTOSTERONA DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS

A tabela 15 mostra os efeitos de um estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona no terço final de gestação sobre os níveis séricos de corticosterona dos machos e das fêmeas. Na prole de machos observamos que os animais estressados apresentaram uma diminuição dos níveis séricos de corticosterona basal em relação aos dos demais grupos. Ainda, a aplicação da naloxona, seja sozinha ou 30 minutos antes da exposição ao estresse *in utero*, aumentou significativamente os níveis séricos deste hormônio ($F(3,28)=29,37$). Por outro lado, não foi possível observar nenhum efeito das manipulações sobre os níveis séricos de corticosterona avaliados na prole das fêmeas. A figura 12 ilustra esses efeitos.

Tabela 15 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre os níveis séricos de corticosterona (ng/dl) dosados na prole de machos e fêmeas Swiss, avaliados no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ¹	Machos	Fêmeas
C	41,11 $\pm$ 4,07	34,28 $\pm$ 8,29
EPN	22,63 $\pm$ 4,37*	63,25 $\pm$ 11,15
Nal+EPN	74,96 $\pm$ 4,78*#	53,52 $\pm$ 10,26
Nal	84,23 $\pm$ 5,46*#	65,12 $\pm$ 10,10

* $p<0,05$ em relação ao grupo controle, # $p<0,05$ em relação ao grupo EPN. one-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. n = 8 animais/grupo

Figura 12 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com naloxona (1mg/kg) sobre os níveis séricos de corticosterona (ng/dl) de uma prole de machos (A) e fêmeas (B) Swiss, avaliados aos 30 dias de idade. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$ em relação ao grupo EPN. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. $n = 8$ animais/grupo

Os níveis séricos de testosterona estão descritos na tabela 16 e ilustrados pela figura 13. Na prole de machos observamos que os animais tratados com naloxona, sozinho ou em conjunto com o estresse, apresentaram aumento dos níveis séricos deste hormônio ($F(3,28)=4,70$, $p=0,09$). Por outro lado, a análise estatística dos níveis de testosterona da prole de fêmeas mostrou apenas uma tendência de aumento nos grupos tratados com naloxona (Nal+EPN e Nal), não significativa ($p=0,41$, $F(3,27)=0,99$).

Tabela 16 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre os níveis séricos de testosterona (ng/dl) dosados na prole de machos e fêmeas avaliadas no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ¹	Machos	Fêmeas
C	73,34 $\pm$ 26,22	8,80 $\pm$ 1,77
EPN	349,00 $\pm$ 161,83	7,48 $\pm$ 1,87
Nal+EPN	743,48 $\pm$ 232,50*	11,18 $\pm$ 2,82
Nal	779,54 $\pm$ 231,01*	12,69 $\pm$ 2,55

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. $n = 8$ animais/grupo, exceto Fêmea EPN – 7 animais

Figura 13 - Efeitos de um estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona (1mg/kg) sobre os níveis de testosterona sérica (ng/ml) de uma prole de machos (A) e fêmeas (B) Swiss, avaliados aos 30 dias de idade. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. $n = 8$ animais/grupo, exceto Fêmea EPN – 7 animais

6.5 EXPERIMENTO 5: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM NALOXONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE A NEUROQUÍMICA DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS

A tabela 17 mostra o efeito da naloxona e/ou do EPN aplicados do GD15 ao GD19 sobre as concentrações hipotalâmicas de noradrenalina, MHPG e sobre o *turnover* deste neurotransmissor (MHPG/Nor) dosado na prole de machos. A análise estatística dos dados revelou que o estresse pré-natal e a associação naloxona+estresse pré-natal aumentaram o *turnover* da noradrenalina no hipotálamo dos camundongos machos ($F(3,32)=4,26$, $p=0,01$), sem, no entanto, alterar as concentrações absolutas de noradrenalina ($F(3,32)=0,002$, $p=0,99$) e de MHPG ($F(3,32)=2,20$, $p=0,11$). A figura 14 ilustra esses resultados.

Tabela 17 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre as concentrações hipotalâmicas de Nor, MHPG e sobre o *turnover* de Nor na prole de machos Swiss avaliados no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ¹	n	Noradrenalina	MHPG	TURNOVER
C	9	2167,96 $\pm$ 131,50	1064,21 $\pm$ 532,93	0,52 $\pm$ 0,06
EPN	8	1601,02 $\pm$ 497,59	1228,59 $\pm$ 519,43	0,76 $\pm$ 0,06*
EPN+Nal	10	1264,57 $\pm$ 317,53	881,02 $\pm$ 151,11	0,73 $\pm$ 0,07*
Nal	9	1364,16 $\pm$ 276,99	795,29 $\pm$ 151,11	0,59 $\pm$ 0,03

* $p<0,05$ em relação ao grupo controle. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. n = número de animais

Figura 14 - Efeitos de um estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona (1mg/kg) sobre os níveis de noradrenalina (A), MHPG (B) e *turnover* (MHPG/Nor) de noradrenalina (C) no hipotálamo de uma prole de machos Swiss, avaliados aos 30 dias de idade. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. Número de animais está explícito na tabela 17

A tabela 18 mostra os mesmos dados, mas agora referentes à prole de fêmeas Swiss. Pode-se observar que a associação naloxona+estresse pré-natal aumentou a noradrenalina hipotalâmica das fêmeas em relação ao grupo que foi apenas estressado ($F(3,32)=3,49$, $p=0,027$). Em relação às concentrações absolutas do MHPG, a análise dos dados mostrou que o tratamento com naloxona, seja antes do estresse ou sozinho, aumentou os níveis de MHPG das fêmeas ($F(3,32)=24,28$, $p < 0,0001$). Finalmente, as fêmeas dos 3 grupos experimentais, EPN, Na+EPN e Nal, apresentaram *turnover* aumentado do neurotransmissor noradrenalina. A figura 15 ilustra estes dados.

Tabela 18 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre as concentrações hipotalâmicas de Nor, MHPG e sobre o *turnover* de Nor na prole de fêmeas Swiss avaliadas no PND30. Os dados representam a média±SE

Grupos ¹	n	Noradrenalina	MHPG	TURNOVER
C	8	1344,23±109,28	390,69±29,23	0,31±0,03
EPN	9	1098,27±110,94	452,01±38,34	0,42±0,02*
EPN+Nal	9	1755,63±211,04#	772,80±31,89*#	0,50±0,02*#
Nal	9	1340,14±116,81	718,10±48,88*#	0,54±0,02*#

*p<0,05 em relação ao grupo controle. #p<0,05 em relação ao grupo EPN. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. n = número de animais

Figura 15 - Efeitos de um estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona (1mg/kg) sobre os níveis de noradrenalina (A), MHPG (B) e *turnover* (MHPG/Nor) de noradrenalina (C) no hipotálamo de uma prole de fêmeas Swiss, avaliados aos 30 dias de idade. *p<0,05 em relação ao grupo controle, #p<0,05 em relação ao grupo EPN. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. Número de animais está na tabela 18

Complementando os dados de neuroquímica, apresentamos nas tabelas 19 e 20 os valores referentes às concentrações de dopamina, de seus metabólitos DOPAC e HVA e do seu *turnover* (DOPAC/dopamina e HVA/dopamina) encontrados no

estriado de machos e fêmeas, respectivamente. Os dados da prole de machos são os que seguem: o tratamento pré-natal da prole com naloxona, sozinho, diminuiu as concentrações estriatais de dopamina ($F(3,29)=22,11$, $p<0,0001$). Em relação às concentrações de DOPAC, a análise dos dados mostrou que a exposição da prole de machos ao estresse pré-natal diminuiu este metabólito ($F(3,29)=6,49$, $p=0,002$). As concentrações absolutas de HVA também estavam alteradas pelo tratamento pré-natal com naloxona. A aplicação de naloxona, seja antes do estresse ou sozinha, aumentou os níveis estriatais de HVA se comparada ao grupo estressado pré-natal ($F(3,29)=7,05$, $p=0,001$). O tratamento com naloxona sozinho aumentou o *turnover* da dopamina, seja medido pela relação com o metabólito DOPAC ou pela relação com o metabólito HVA ($F_{\text{DOPAC/dopamina}}(3,29)=18,90$, $p=0,001$, $F_{\text{HVA/dopamina}}=24,69$, $p<0,0001$).

Por outro lado, como pode ser comprovado na Tabela 20, não foi possível observar qualquer efeito estatisticamente significativo entre os dados de dopamina estriatal sobre a prole das camundongas fêmeas. A figura 16 ilustra os efeitos do EPN e/ou da naloxona, aplicados no terço final de gestação, sobre a concentração e o *turnover* de dopamina e metabólitos encontrados no estriado de machos.

Tabela 19 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre as concentrações de DA, DOPAC e sobre o *turnover* de DA (DOPAC/DA e HVA/DA) dosados no *stratum* da prole de machos Swiss, avaliados no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ¹	DA	DOPAC	HVA	DOPAC/DA	HVA/DA
C	1661,16 $\pm$ 187,51	1023,36 $\pm$ 115,07	898,68 $\pm$ 86,36	0,65 $\pm$ 0,08	0,57 $\pm$ 0,07
EPN	1338,62 $\pm$ 226,26	599,77 $\pm$ 101,96 ^{&}	630,11 $\pm$ 95,102	0,54 $\pm$ 0,10	0,56 $\pm$ 0,09
EPN+Nal	1336,00 $\pm$ 121,14	1256,80 $\pm$ 93,56	1200,71 $\pm$ 75,37 [#]	1,04 $\pm$ 0,16	0,98 $\pm$ 0,13
Nal	341,63 $\pm$ 78,36 ^{&}	1097,06 $\pm$ 154,78	1054,94 $\pm$ 128,21 [#]	4,20 $\pm$ 1,08 ^{&}	3,86 $\pm$ 0,84 ^{&}

[#] $p<0,05$ em relação ao grupo EPN, [&] $p<0,05$ em relação aos demais grupos. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. n - controle = 8; EPN = 9; EPN+Nal = 9; Nal = 7

Figura 16 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com naloxona (1mg/kg) sobre os níveis estriatais de dopamina (A), DOPAC (B), HVA (C), *turnover* DOPAC/dopamina (D) e *turnover* HVA/dopamina (E) de machos, avaliados no PND30. # $p < 0,05$ em relação ao grupo EPN, & $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. n - controle = 8; EPN = 9; EPN+Nal = 9; Nal = 7

Tabela 20 - Efeitos do estresse pré-natal e/ou do tratamento com naloxona sobre as concentrações de DA, DOPAC e sobre o *turnover* de DA (DOPAC/DA e HVA/DA) dosados no *stratum* da prole de fêmeas Swiss, avaliadas no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ¹	DA	DOPAC	HVA	DOPAC/DA	HVA/DA
C	756,50 $\pm$ 212,03	1357,69 $\pm$ 227,35	1110,94 $\pm$ 174,74	2,11 $\pm$ 0,27	1,77 $\pm$ 0,24
EPN	670,87 $\pm$ 60,88	1153,24 $\pm$ 146,69	981,33 $\pm$ 99,39	1,92 $\pm$ 0,38	1,62 $\pm$ 0,30
EPN+Nal	674,44 $\pm$ 111,47	1648,75 $\pm$ 222,01	1385,42 $\pm$ 160,01	2,89 $\pm$ 0,42	2,47 $\pm$ 0,35
Nal	492,98 $\pm$ 117,01	1246,25 $\pm$ 193,01	1036,13 $\pm$ 136,41	3,20 $\pm$ 0,57	2,71 $\pm$ 0,47

¹C – controle, EPN – estresse pré-natal, Nal+EPN – Naloxona+estresse pré-natal, Nal – Naloxona. n – controle = 8; EPN = 9; EPN+Nal = 9; Nal = 8

6.6 EXPERIMENTO 6: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM METIRAPONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE A ATIVIDADE GERAL E OS NÍVEIS DE ANSIEDADE DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS.

Assim como descrito anteriormente para os experimentos com a naloxona, as tabelas 21 e 22 mostram os parâmetros reprodutivos e gestacionais avaliados nas fêmeas e suas proles após aplicação do estresse pré-natal e o do tratamento com metirapona. Como pode ser observado, há uma diferença significativa entre os grupos Met+EPN e Met em relação ao grupo EPN no parâmetro número de partos a termo. Os acasalamentos foram sendo realizados até que se conseguisse um total de 10 partos por grupo.

Tabela 21 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre parâmetros reprodutivos das fêmeas

Grupos²	partos a termo (partos/total)	Duração gestação (med±SD)	n° de filhotes (med±SD)	Relação macho/fêmea (med±SD)
PPG 40%	10/10	19,86±0,38	10,62±1,77	1,60±1,86
EPN	10/10	19,86±1,07	8,50±3,12	1,14±0,82
Met+EPN	10/21*	19,14±0,69	8,63±2,07	1,08±0,99
Met	10/18*	19,86±1,21	9,38±2,56	1,55±1,14

*p<0,05 em relação ao grupo EPN. Teste Exato de Fisher

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. Obs: os partos que não vieram a termo correspondem às fêmeas que morreram durante os tratamentos pré-natais

A tabela 22 mostra o peso dos animais no PND1 (nascimento) e no PND21 (desmame) após o EPN e/ou o tratamento com metirapona. Como pode ser observado, no PND21 há uma diferença significativa entre os animais do grupo EPN

em relação aos demais grupos ($F(3,76)=7,02$, $p=0,0003$) e entre as fêmeas do grupo EPN e as fêmeas do grupo Met ($F(3,36)=5,07$; $p=0,005$).

Tabela 22 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre o peso da prole no PND1 e no PND21. Os dados representam a média $\pm$ desvio-padrão (SD)

Grupos ²	PND1 (g)	PND21(g)
PPG 40%	1,71 $\pm$ 0,22	22,6 $\pm$ 0,23
EPN	1,80 $\pm$ 0,21	21,1 $\pm$ 0,35 ^{&}
Met+EPN	1,83 $\pm$ 0,29	22,45 $\pm$ 0,29
Met	1,75 $\pm$ 0,35	23,15 $\pm$ 0,42

[&] $p<0,05$ em relação aos demais grupos One-Way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona

A Tabela 23 mostra o efeito do EPN e/ou do tratamento com metirapona aplicados no terço final de gestação sobre a atividade geral da prole de machos Swiss avaliada no campo aberto. A análise estatística dos resultados não mostrou diferenças significantes entre os grupos. O parâmetro tempo de imobilidade também não foi diferente ($F(3,30)=2,78$, $p=0,06$).

Tabela 23 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre a atividade geral em campo aberto de uma prole de machos Swiss avaliada no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE (erro-padrão da média)

Grupos ²	Lot (cm)	Loc (cm)	Lop (cm)	Lev (freqcia)
PPG 40%	1956,60 $\pm$ 141,62	151,70 $\pm$ 23,17	1400,80 $\pm$ 96,64	16,75 $\pm$ 3,26
EPN	2027,80 $\pm$ 137,53	160,54 $\pm$ 35,96	1510,10 $\pm$ 150,00	18,75 $\pm$ 2,83
Met+EPN	1774,60 $\pm$ 74,85	115,89 $\pm$ 12,43	1288,10 $\pm$ 56,16	20,12 $\pm$ 3,54
Met	1969,10 $\pm$ 171,78	211,35 $\pm$ 66,70	1675,50 $\pm$ 181,39	33,25 $\pm$ 6,88

Lot = locomoção total, Loc = locomoção central, Lop = locomoção periférica, Lev = levantar

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. n = 8-9 animais/grupo

A tabela 24 mostra o efeito do EPN e/ou da metirapona aplicados do GD15 ao GD19 sobre o nível de ansiedade da prole de machos, avaliada no labirinto em cruz elevado, 24 horas após a exposição dos animais ao campo aberto. Como pode ser observado, a manipulação pré-natal empregada, seja estresse, metirapona ou ambos, diminuiu a %entrada nos braços abertos (%EBA) do aparelho ($F(3,16)=8,96$, $p=0,001$) e aumentou a %entrada no braços fechados (%EBF) ($F(3,16)=15,47$, $p=0,0001$). Em relação ao parâmetro tempo de exploração dos braços do labirinto em cruz, observamos que tanto o estresse pré-natal com o tratamento com metirapona (grupo Met) foram importantes. Pode-se observar que os grupos EPN e Met apresentaram diminuição na %TBA ($F(3,16)=9,45$, $p=0,0008$) e aumento na %TBF ($F(3,16)=5,21$, $p=0,01$). Não foram observadas diferenças significantes no parâmetro locomoção total no aparelho ($F(3,16)=1,26$, $p=0,32$).

Tabela 24 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre os níveis de ansiedade avaliados no labirinto em cruz elevado de uma prole de machos Swiss avaliada no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos²	%EBA	%TBA	%EBF	%TBF
PPG 40%	41,54 $\pm$ 1,09	34,89 $\pm$ 1,89	53,20 $\pm$ 1,74	69,51 $\pm$ 3,68
EPN	25,43 $\pm$ 2,01*	11,11 $\pm$ 3,73*	74,57 $\pm$ 2,01*	88,89 $\pm$ 3,73*
Met+EPN	30,71 $\pm$ 1,81*	21,18 $\pm$ 3,73	69,50 $\pm$ 1,81*	78,77 $\pm$ 3,73
Met	30,77 $\pm$ 3,46*	13,68 $\pm$ 4,10*	69,23 $\pm$ 3,46*	86,32 $\pm$ 4,10*

* $p<0,05$ em relação ao grupo PPG 40%. One-Way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

EBA = entrada nos braços abertos, TBA = tempo de permanência nos braços abertos, EBF = entrada nos braços fechados, TBF = tempo de permanência nos braços fechados

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. n = 5 animais/grupo

Figura 17 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com metirapona (75mg/kg) sobre os níveis de ansiedade de machos Swiss, avaliados aos 30 dias de idade, observadas no labirinto em cruz elevado. Em **A**: % de exploração dos braços abertos, **B**: % de exploração dos braços fechados. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo PPG 40% One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. EBA = entrada nos braços abertos, TBA = tempo de permanência nos braços abertos, EBF = entrada nos braços fechados, TBF = tempo de permanência nos braços fechados. $n = 5$ animais/grupo

Os dados a seguir referem-se à atividade geral e nível de ansiedade avaliada na prole de fêmeas, submetidas aos diferentes tratamentos. Assim, pode-se verificar na tabela 25 que o grupo Met apresentou aumento da locomoção total em campo aberto comparado ao grupo EPN ($F(3,16)=2,59$, $p=0,089$). O tempo de imobilidade entre os grupos não foi diferente ($F(3,16)=2,15$, $p=0,13$).

Tabela 25 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre a atividade geral em campo aberto de uma prole de fêmeas Swiss avaliada no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ²	Lot (cm)	Loc (cm)	Lop (cm)	Lev (freqcia)
PPG 40%	1932,60 $\pm$ 117,24	256,28 $\pm$ 43,71	1249,70 $\pm$ 212,59	27,00 $\pm$ 4,92
EPN	1712,20 $\pm$ 39,713	152,33 $\pm$ 22,81	1146,00 $\pm$ 120,06	14,20 $\pm$ 2,35
Met+EPN	1804,20 $\pm$ 98,84	156,36 $\pm$ 20,87	1288,40 $\pm$ 114,74	24,20 $\pm$ 5,58
Met	2150,40 $\pm$ 82,69#	220,59 $\pm$ 33,251	1599,90 $\pm$ 108,26	21,00 $\pm$ 2,95

$p < 0,05$ em relação ao grupo EPN. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

Lot = locomoção total, Loc = locomoção central, Lop = locomoção periférica, Lev = levantar

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. $n = 5$ animais por grupo

A tabela 26 mostra e a figura 18 ilustra o efeito do EPN e/ou do tratamento com metirapona sobre a ansiedade das fêmeas, avaliada no labirinto em cruz elevado. A análise dos dados mostrou que a tanto o estresse pré-natal como a metirapona aplicada no terço final de gestação diminuíram a %EBA ($F(3,16)=16,75$, $p=0,0001$) e a %TBA ($F(3,16)=7,47$, $p=0,0001$). Ainda, estes mesmos tratamentos foram capazes de aumentar a %EBF ($F(3,16)=16,72$, $p=0,001$) e a %TBF ($F(3,16)=17,62$, $p=0,0001$). A associação metirapona+EPN reverteu todos esses efeitos. A locomoção total no aparelho não foi diferente entre os animais ($f(3,16)=1,04$, $p=0,40$).

Tabela 26 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre os níveis de ansiedade avaliados no labirinto em cruz elevado de uma prole de fêmeas Swiss avaliada no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos²	%EBA	%TBA	%EBF	%TBF
PPG 40%	36,98 $\pm$ 2,92	26,44 $\pm$ 2,49	63,02 $\pm$ 2,92	73,56 $\pm$ 2,49
EPN	21,06 $\pm$ 2,39*	6,91 $\pm$ 1,24*	78,94 $\pm$ 2,39*	93,09 $\pm$ 1,24*
Met+EPN	36,85 $\pm$ 2,57#	33,73 $\pm$ 5,43#	63,19 $\pm$ 2,57#	66,34 $\pm$ 5,43#
Met	16,38 $\pm$ 2,52*	6,70 $\pm$ 2,39*	83,62 $\pm$ 2,52*	93,30 $\pm$ 2,39*

* $p<0,05$ em relação ao grupo PPG 40%, # $p<0,05$ em relação ao grupo EPN. One-Way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

EBA = entrada nos braços abertos, TBA = tempo de permanência nos braços abertos, EBF = entrada nos braços fechados, TBF = tempo de permanência nos braços fechados

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. n = 5 animais/grupo

Figura 18 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com metirapona (75 mg/kg) sobre os níveis de ansiedade de fêmeas Swiss, aos 30 dias de idade, observadas no labirinto em cruz elevado. Em A: % de exploração dos braços abertos, B: % de exploração dos braços fechados. * $p < 0,05$ em relação grupo PPG40%, # $p < 0,05$ em relação ao grupo EPN e Met. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. $n = 5$ animais/grupo

6.7 EXPERIMENTO 7: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM METIRAPONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE A ATIVIDADE DE NEUTRÓFILOS SANGÜÍNEOS DE CAMUNUDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS

A tabela 27 e a figura 19 mostram os efeitos do EPN e/ou da metirapona (75mg/kg) aplicados no terço final de gestação sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos sangüíneos medido na prole de machos Swiss avaliados no PND30. Nestes animais pode-se observar que: **1.** o tratamento pré-natal com metirapona aumentou significativamente o *burst* oxidativo basal destas células em relação ao grupo PPG 40% ($F(3,20)=3,77$, $p=0,03$); **2.** a associação metirapona + EPN aumentou o *burst* oxidativo das células após estímulo *in vitro* com PMA ($F(3,20)=9,74$, $p=0,0004$;) e com SAPI ($F(3,20)=9,76$ $p=0,0004$). Observou-se também que os neutrófilos dos animais tratados com metirapona e estimulados com SAPI apresentaram diminuição do *burst* oxidativo em relação ao observado nos grupos EPN e Met+EPN.

Tabela 27 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos sanguíneos de machos Swiss avaliados no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ²	DCFH	DCFH +PMA	DCFH + SAPI
PPG 40%	9,04 $\pm$ 0,63	18,96 $\pm$ 1,63	16,53 $\pm$ 0,50
EPN	12,36 $\pm$ 1,48	23,74 $\pm$ 2,87	22,57 $\pm$ 2,73
Met+EPN	13,14 $\pm$ 1,16	33,00 $\pm$ 1,98 ^{&}	24,73 $\pm$ 2,83*
Met	14,15 $\pm$ 1,12*	19,09 $\pm$ 1,74	14,14 $\pm$ 0,80#

* $p<0,05$ em relação ao grupo PPG 40%; # $p<0,05$ em relação ao grupo EPN e Met+EPN, [&] $p<0,05$ em relação aos demais grupos. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. n = 6 animais/grupo

Figura 19 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com metirapona (75mg/kg) sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos sanguíneos de machos Swiss, avaliados aos 30 dias de idade. **A** – *burst* oxidativo basal, **B** – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA, **C** – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI. * $p < 0,05$ em relação ao grupo PPG 40%; # $p < 0,05$ em relação ao grupo EPN e Met+EPN, & $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. $n = 6$ animais/grupo

Outra função neutrofílica estudada foi a capacidade de fagocitose destas células. A tabela 28 mostra que a associação Met+estresse pré-natal diminuiu a porcentagem de fagocitose dos neutrófilos coletados da prole de machos ($F(3,16)=5,19$, $p=0,01$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no parâmetro índice de fagocitose apresentado pelos neutrófilos sanguíneos na prole de machos. A figura 20 ilustra estes resultados.

Tabela 28 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre a capacidade de fagocitose dos neutrófilos sanguíneos de machos Swiss avaliados no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ²	Índice	Porcentagem
PPG 40%	26,41 $\pm$ 2,27	66,11 $\pm$ 5,76
EPN	19,13 $\pm$ 1,01	47,52 $\pm$ 3,57
Met+EPN	19,40 $\pm$ 1,44	38,03 $\pm$ 2,68*
Met	21,08 $\pm$ 3,03	45,41 $\pm$ 7,53

. * $p < 0,05$ em relação ao grupo PPG 40% One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

Índice: quantas bactérias foram ingeridas pela população de neutrófilos. Expresso pela intensidade de fluorescência da população de neutrófilos. **Porcentagem:** quantos neutrófilos fagocitaram partículas de SAPI

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. $n = 5$ animais/grupo

Figura 20 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com metirapona (75mg/kg) sobre a capacidade de fagocitose de neutrófilos sanguíneos de machos Swiss, avaliados aos 30 dias de idade. A – índice de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. *p<0,05 em relação ao grupo PPG40%. One way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. n = 5 animais/grupo

Os resultados do *burst* oxidativo avaliado nos neutrófilos das fêmeas estão descritos na tabela 29. Como pode ser observado, o tratamento pré-natal com metirapona (grupo Met) aumentou o *burst* oxidativo dos neutrófilos após estímulo *in vitro* com SAPI ($F(3,16)=11,47$, $p=0,0005$).

Tabela 29 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre o *burst* oxidativo de neutrófilos sanguíneos de fêmeas Swiss avaliadas no PND30. Os dados representam a média±SE

Grupos ²	DCFH	DCFH + PMA	DCFH + SAPI
PPG 40%	16,57±0,83	24,92±3,65	27,84±2,76
EPN	17,29±1,32	17,47±1,19	24,60±3,59
Met+EPN	18,51±3,28	17,84±3,75	29,75±5,27
Met	13,37±1,84	15,32±3,26	52,23±3,54 ^{&}

[&]p<0,05 em relação aos demais grupos. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EM – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. n = 5 animais/grupo

Finalmente, a tabela 30 mostra e a figura 21 ilustra os efeitos de diferentes manipulações sobre a capacidade de fagocitose dos neutrófilos sanguíneos das fêmeas. Neste parâmetro, assim como anteriormente descrito para os dados de *burst* oxidativo (tabela 29), apenas os animais tratados com metirapona (grupo Met)

apresentaram alterações estatisticamente significantes. Como pode ser observado, o grupo Met apresentou aumento do índice ($F(3,16)=18,78$, $p<0,0001$) e da porcentagem de fagocitose ($F(3,16)=20,81$, $p<0,0001$) em relação aos demais grupos.

Tabela 30 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre a capacidade de fagocitose dos neutrófilos sanguíneos de fêmeas Swiss avaliadas no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ²	Índice	Porcentagem
PPG 40%	14,45 $\pm$ 0,59	4,64 $\pm$ 1,55
EPN	12,85 $\pm$ 0,25	3,76 $\pm$ 0,62
Met+EPN	14,62 $\pm$ 0,32	10,44 $\pm$ 2,82
Met	17,65 $\pm$ 0,85 ^{&}	66,19 $\pm$ 5,26 ^{&}

[&] $p<0,05$ em relação aos demais grupos One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

Índice: quantas bactérias foram ingeridas pela população de neutrófilos. Expresso pela intensidade de fluorescência da população de neutrófilos. **Porcentagem:** quantos neutrófilos fagocitaram partículas de SAPI

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. n = 5 animais/grupo

Figura 21 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com metirapona (75mg/kg) sobre a capacidade de fagocitose de neutrófilos sanguíneos de fêmeas Swiss, avaliados aos 30 dias de idade. A – índice de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose & $p<0,05$ em relação aos demais grupos. One way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. n = 5 animais/grupo

6.8 EXPERIMENTO 8: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM METIRAPONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE A ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS

A tabela 31 mostra e a figura 22 ilustra os efeitos do EPN e/ou do tratamento com metirapona aplicados no terço final de gestação sobre o *burst* oxidativo de macrófagos peritoneais de machos Swiss, estimulados ou não *in vitro* e avaliados no PND30. Pode-se verificar que o tratamento pré-natal com metirapona ou com estresse reduziu o *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI. O tratamento com metirapona reduziu também o *burst* estimulado pelo PMA.

Tabela 31 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre o *burst* oxidativo de macrófagos peritoneais de machos Swiss avaliados no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ²	DCFH	DCFH + PMA	DCFH + SAPI
PPG 40%	13,96 $\pm$ 3,52	14,25 $\pm$ 2,42	14,31 $\pm$ 3,28
EPN	12,38 $\pm$ 3,97	17,95 $\pm$ 4,43	4,56 $\pm$ 1,65*
Met+EPN	9,95 $\pm$ 3,87	12,97 $\pm$ 4,17	6,98 $\pm$ 1,91
Met	8,08 $\pm$ 2,21	5,47 $\pm$ 1,26#	4,41 $\pm$ 0,98*

*p<0,05 em relação ao grupo PPG 40%, #p<0,05 em relação ao grupo EPN One way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. n = 6 animais/grupo

Figura 22 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com naloxona (1mg/kg) sobre o *burst* oxidativo de macrófagos peritoneais de machos Swiss, avaliados aos 30 dias de idade. A – *burst* basal, B – *burst* após estímulo *in vitro* com PMA, C – *burst* após estímulo *in vitro* com SAPI. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$ em relação ao grupo EPN, one-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. $n = 6$ animais/grupo

A fagocitose dos macrófagos peritoneais da prole de machos está descrita na tabela 32. Não foi possível verificar nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os 4 grupos estudados.

Tabela 32 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre a capacidade de fagocitose dos macrófagos peritoneais de machos Swiss avaliados no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ²	Índice	Porcentagem
PPG 40%	14,21 $\pm$ 0,64	24,31 $\pm$ 3,68
EPN	12,87 $\pm$ 0,17	23,32 $\pm$ 4,32
Met+EPN	14,57 $\pm$ 0,80	29,84 $\pm$ 3,75
Met	14,10 $\pm$ 0,67	32,11 $\pm$ 4,42

Índice: quantas bactérias foram ingeridas pela população de neutrófilos. Expresso pela intensidade de fluorescência da população de neutrófilos. **Porcentagem:** quantos neutrófilos fagocitaram partículas de SAPI

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. $n = 5$ animais/grupo

A análise dos dados de *burst* oxidativo das fêmeas está na tabela 33. Não foi verificada nenhuma diferença entre os grupos neste parâmetro.

Tabela 33 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre o *burst* oxidativo de macrófagos peritoneais de fêmeas Swiss avaliadas no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ²	DCFH	DCFH + PMA	DCFH + SAPI
PPG 40%	12,86 $\pm$ 3,00	12,63 $\pm$ 3,34	10,82 $\pm$ 1,82
EPN	23,12 $\pm$ 7,74	24,26 $\pm$ 7,46	18,78 $\pm$ 3,45
Met+EPN	20,39 $\pm$ 7,06	25,12 $\pm$ 8,31	17,39 $\pm$ 2,68
Met	22,79 $\pm$ 7,10	26,67 $\pm$ 9,68	15,79 $\pm$ 3,71

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. n = 5 animais/grupo

Em relação à capacidade de fagocitose das fêmeas, observou-se que a exposição ao estresse pré-natal aumentou a porcentagem de fagocitose em relação ao grupo PPG 40% (F (3,15)=3,73, p=0,01) e que associação metirapona+estresse pré-natal aumentou a intensidade de fagocitose dos animais comparada ao grupo PPG 40%. (F (3,15)=5,76, p=0,01). Estes dados estão na tabela 34 e na figura 23

Tabela 34 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre a capacidade de fagocitose dos macrófagos peritoneais de fêmeas Swiss avaliadas no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ²	Índice	Porcentagem
PPG 40%	16,23 $\pm$ 1,34	34,62 $\pm$ 2,70
EPN	20,97 $\pm$ 0,77	17,01 $\pm$ 2,60 ^{&}
Met+EPN	23,72 $\pm$ 1,78*	46,14 $\pm$ 5,64
Met	19,59 $\pm$ 0,88	37,19 $\pm$ 8,31

*p<0,05 em relação ao grupo PPG 40%, [&]p<0,05 em relação aos demais grupos. One way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test

Índice: quantas bactérias foram ingeridas pela população de neutrófilos. Expresso pela intensidade de fluorescência da população de neutrófilos. **Porcentagem:** quantos neutrófilos fagocitaram partículas de SAPI

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. n = 4-5 animais/grupo

Figura 23 - Efeitos de um EPN e/ou do tratamento com metirapona (75mg/kg) sobre a capacidade de fagocitose macrófagos de fêmeas Swiss, avaliadas aos 30 dias de idade. * $p < 0,05$ em relação ao grupo PPG 40%. One way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Test. $n = 4-5$ animais/grupo

6.9 EXPERIMENTO 9: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM METIRAPONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA E TESTOSTERONA DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS

A tabela 35 mostra os efeitos de um estresse pré-natal e/ou do tratamento com metirapona no terço final de gestação sobre os níveis séricos de corticosterona dos machos e das fêmeas Swiss. Como pode ser observado, na prole de camundongos machos o bloqueio da síntese de glicocorticóides maternos durante o estresse *in utero* (grupo Met+EPN) reverteu o aumento dos níveis séricos de corticosterona apresentados pela prole estressada. Outro dado importante apreendido da análise da corticosterona da prole de machos adulta foi que o tratamento com metirapona, do GD15 ao GD19, foi capaz de aumentar os níveis séricos deste hormônio na prole adulta ($p < 0,0001$, $F(3,20) = 34,99$).

Por outro lado, na prole de fêmeas observamos apenas o efeito do estresse pré-natal. Nestes animais, a exposição a um estresse materno do GD15 ao GD19 aumentou os níveis séricos de corticosterona da prole adulta ($p = 0,003$, $F(3,20) = 6,47$). A figura 24 ilustra estes dados.

Tabela 35 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre os níveis séricos de corticosterona (ng/ml) dosados na prole de machos e fêmeas avaliados no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ²	Machos	Fêmeas
PPG 40%	40,23 $\pm$ 3,94	23,88 $\pm$ 4,74
EPN	20,63 $\pm$ 3,02*	87,99 $\pm$ 14,15 ^{&}
Met+EPN	13,00 $\pm$ 3,36*	50,15 $\pm$ 10,32
Met	109,70 $\pm$ 3,23 ^{&}	50,42 $\pm$ 10,05

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, [&] $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. One way ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls test

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. n = 6 animais/grupo

Figura 24 - Efeitos de um estresse pré-natal e/ou do tratamento com metirapona (75mg/kg) sobre os níveis de corticosterona sérica (ng/ml) de uma prole de machos (A) e fêmeas (B) Swiss, avaliada aos 30 dias de idade. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, & $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. Os dados representam as médias $\pm$ SE. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Test. $n = 6$ animais/grupo

Os níveis séricos de *testosterona* da prole de machos e fêmeas expostos ao estresse pré-natal e/ou tratados com metirapona estão apresentados na tabela 36. Como pode ser observado, não foi possível encontrar diferenças estatisticamente significantes entre as proles de machos ($F(3,28)=2,12$, $p=0,12$) ou de fêmeas ($F(3,28)=2,18$, $p=0,11$).

Tabela 36 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre os níveis séricos de *testosterona* (ng/ml) dosados na prole de machos e fêmeas avaliados no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ²	Machos	Fêmeas
PPG 40%	143,29 $\pm$ 62,95	15,75 $\pm$ 1,92
EPN	627,75 $\pm$ 267,88	16,46 $\pm$ 2,02
Met+EPN	328,03 $\pm$ 149,17	19,40 $\pm$ 2,94
Met	65,52 $\pm$ 12,19	22,62 $\pm$ 1,26

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. $n = 8$ animais/grupo

6.10 EXPERIMENTO 10: EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL E/OU DO TRATAMENTO COM METIRAPONA, APLICADOS DO GD15 AO GD19, SOBRE A NEUROQUÍMICA DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS SWISS

A tabela 37 mostra e a figura 25 ilustra os efeitos de um estresse pré-natal e/ou do tratamento com metirapona no terço final de gestação sobre as concentrações cerebrais de Nor e MHPG, bem como sobre o *turnover* da Nor na prole de machos. Como pode ser observado, a manipulação pré-natal empregada, seja estresse, administração de metirapona ou ambos, foi capaz de aumentar as concentrações de Nor no hipotálamo dos animais ($p=0,002$, $F(3,30)=6,50$). Por outro lado, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em relação às quantidades de MHPG ($p=0,30$, $F(3,30)=1,28$) ou ao *turnover* da Nor ($p=0,23$, $F(3,30)=1,46$) avaliados no hipotálamo.

Tabela 37 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre as concentrações hipotalâmicas de Nor, MHPG e sobre o *turnover* de Nor na prole de machos Swiss avaliados no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos²	N	Noradrenalina	MHPG	Turnover
PPG 40%	7	87,81 $\pm$ 10,86	14,90 $\pm$ 2,21	0,18 $\pm$ 0,03
EPN	9	192,43 $\pm$ 22,88*	25,44 $\pm$ 6,32	0,12 $\pm$ 0,02
Met+EPN	9	180,75 $\pm$ 14,26*	22,94 $\pm$ 6,29	0,12 $\pm$ 0,03
Met	9	194,05 $\pm$ 21,03*	34,76 $\pm$ 6,34	0,17 $\pm$ 0,03

* $p<0,05$ em relação ao grupo controle. One way ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls test

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. n = numero de animais

Figura 25 - Efeitos de um estresse pré-natal e/ou do tratamento com metirapona (75mg/kg) sobre as concentrações hipotalâmicas de Nor, MHPG e turnover da Nor em machos Swiss, avaliados aos 30 dias. A – Noradrenalina, B- MHPG, C - *Turnover* (MHPG/Nor). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Os dados representam as médias $\pm$ SE. One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls Test. $n = 9$ animais/grupo, exceto controle $n = 7$ animais

A tabela 38 mostra estes mesmos parâmetros avaliados na prole de fêmeas. Nestes animais não foi possível encontrar nenhuma diferença entre os grupo em relação às concentrações de Nor ($p=0,12$, $F(3,30)=2,12$), MHPG ($p=0,95$, $F(3,30)=0,12$) e *turnover* de Nor ($p=0,25$, $F(3,30)=1,46$).

Tabela 38 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre as concentrações hipotalâmicas de Nor, MHPG e sobre o *turnover* de Nor na prole de fêmeas Swiss avaliadas no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ²	N	Noradrenalina	MHPG	<i>Turnover</i> Nor
PPG 40%	8	155,76 $\pm$ 12,01	12,52 $\pm$ 0,92	0,08 $\pm$ 0,006
EPN	8	153,12 $\pm$ 8,24	12,63 $\pm$ 0,95	0,08 $\pm$ 0,01
Met+EPN	9	139,97 $\pm$ 11,82	11,73 $\pm$ 0,96	0,09 $\pm$ 0,008
Met	9	122,59 $\pm$ 9,17	12,37 $\pm$ 0,91	0,11 $\pm$ 0,01

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. n = numero de animais

Continuando a apresentação dos achados de neuroquímica, apresentaremos agora os dados referentes às concentrações de dopamina (DA), de seus metabólitos DOPAC e HVA e do *turnover* deste neurotransmissor. As quantidades de dopamina, metabólitos e *turnover* foram mensuradas no estriado das proles de machos e fêmeas. Como pode ser observado na tabela 39, o tratamento pré-natal com metirapona

aumentou as concentrações de DOPAC ($F(3,34)=4,53$, $p=0,01$) observada no estriado dos machos, bem como o *turnover* de DA, tanto em relação ao metabólito DOPAC ($F(3,34)=22,05$, $p<0,0001$) como ao metabólito HVA ($F(3,34)=5,23$, $p=0,0045$). Não foram observadas diferenças significantes nas concentrações absolutas de DA ou de HVA nos machos estudados. A figura 26 ilustra os dados que acabamos de apresentar.

Tabela 39 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre as concentrações de DA, DOPAC e sobre o *turnover* de DA (DOPAC/DA e HVA/DA) dosados no *stratum* da prole de machos Swiss, avaliados no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ²	N	DA	DOPAC	HVA	DOPAC/DA	HVA/DA
PPG 40%	8	443,75 $\pm$ 85,57	70,76 $\pm$ 13,68	86,90 $\pm$ 16,99	0,16 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,009
EPN	10	369,24 $\pm$ 42,21	69,29 $\pm$ 6,34	68,90 $\pm$ 7,07	0,20 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,01
Met+EPN	10	281,02 $\pm$ 35,51	74,93 $\pm$ 10,86	56,91 $\pm$ 7,40	0,27 $\pm$ 0,02 ^{*#}	0,20 $\pm$ 0,006
Met	10	299,70 $\pm$ 24,02	113,76 $\pm$ 9,59 ^{&}	71,92 $\pm$ 4,70	0,39 $\pm$ 0,03 ^{&}	0,25 $\pm$ 0,01 ^{&}

* $p<0,05$ em relação ao grupo controle, # $p<0,05$ em relação ao grupo EPN, & $p<0,05$ em relação aos demais grupos. One way ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls test

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. n = numero de animais

Figura 26 - Efeitos de um estresse pré-natal e/ou do tratamento com metirapona (75mg/kg) sobre as concentrações de DA, DOPAC, HVA e *turnover* da DA (DOPAC/DA e HVA/DA) em machos Swiss, avaliados aos 30 dias. A – Dopamina, B- DOPAC, C – HVA, D – DOPAC/DA, E – HVA/DA. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle, # $p<0,05$ em relação ao grupo EPN, & $p<0,05$ em relação aos demais grupos. One way ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls test. n = 10 animais/grupo, exceto controle com 8 animais

Por fim, apresentaremos os dados relativos à dopamina, metabólitos e *turnover* encontrado na prole das fêmeas, aos 30 dias de idade. A tabela 40 mostra que o tratamento com metirapona, seja sozinho ou associado ao estresse, aumentou os níveis de DOPAC ($F(3,28)=18,25$, $p<0,0001$). O *turnover* da DA também foi diferente entre os grupos. Assim, o *turnover* medido pela relação DOPAC/DA estava aumentado nos grupos EPN, MET+EPN e Met ($F(3,28)=114,45$, $p<0,0001$), assim como o medido pela relação HVA/DA estava aumentado nos grupos EPN e Met ($F(3,28)=48,05$, $p<0,0001$). Por outro lado, não foi possível verificar nenhuma diferença entre os grupos em relação às concentrações absolutas de dopamina ($F(3,28)=1,79$, $p=0,17$) e HVA ($F(3,28)=0,21$, $p=0,89$) no *striatum* das fêmeas. A figura 27 ilustra esses resultados.

Tabela 40 - Efeitos do tratamento com metirapona e/ou do estresse pré-natal sobre as concentrações de DA, DOPAC e sobre o *turnover* de DA (DOPAC/DA e HVA/DA) dosados no *stratum* da prole de fêmeas Swiss, avaliadas no PND30. Os dados representam a média $\pm$ SE

Grupos ²	DA	DOPAC	HVA	DOPAC/DA	HVA/DA
PPG 40%	405,13 $\pm$ 36,91	42,86 $\pm$ 5,54	69,98 $\pm$ 6,31	0,10 $\pm$ 0,006	0,17 $\pm$ 0,002
EPN	374,01 $\pm$ 43,62	56,84 $\pm$ 8,17	70,87 $\pm$ 8,20	0,15 $\pm$ 0,009*	0,20 $\pm$ 0,005*
Met+EPN	366,71 $\pm$ 34,71	75,73 $\pm$ 7,40*	65,25 $\pm$ 6,77	0,21 $\pm$ 0,008* [#]	0,18 $\pm$ 0,003 [#]
Met	292,45 $\pm$ 24,77	116,85 $\pm$ 8,62 ^{&}	64,82 $\pm$ 5,65	0,41 $\pm$ 0,026 ^{&}	0,23 $\pm$ 0,004 ^{&}

* $p<0,05$ em relação ao grupo controle, [#] $p<0,05$ em relação ao grupo EPN, [&] $p<0,05$ em relação aos demais grupos. One way ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls test

²PPG 40% - propilenoglicol 40%, EPN – estresse pré-natal, Met+EPN – metirapona+estresse pré-natal; Met – metirapona. n = 8 animais

Figura 27 - Efeitos de um estresse pré-natal e/ou do tratamento com metirapona (75mg/kg) sobre as concentrações de DA, DOPAC, HVA e turnover da DA (DOPAC/DA e HVA/DA) em fêmeas Swiss, avaliadas aos 30 dias. A – Dopamina, B- DOPAC, C – HVA, D – DOPAC/DA, E – HVA/DA. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$ em relação ao grupo EPN, & $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. One way ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls test. $n = 8$ animais

7 DISCUSSÃO

Tomados em conjunto, nossos resultados mostram que é possível modificar os efeitos produzidos por um estresse pré-natal através da manipulação materno/fetal do sistema opioide ou dos níveis de glicocorticóides. Os dados aqui apresentados também demonstram que os efeitos do estresse ou da manipulação farmacológica dependem do parâmetro analisado; o comportamento e a atividade imune inata mostraram diferentes suscetibilidades aos tratamentos empregados. Finalmente e de relevância, os resultados observados mostraram que os efeitos podem ser diferentes, dependendo do sexo dos animais estudados.

No contexto de experimentos peri-natais, é importante avaliar os possíveis efeitos tóxicos diretos da manipulação pré-natal empregada. Neste sentido, os parâmetros reprodutivos colhidos neste trabalho após a exposição das fêmeas ao estresse pré-natal e à naloxona parecem descartar a possibilidade de que os achados experimentais observados na prole sejam decorrentes de efeitos tóxicos diretos exercidos por eles sobre as mães. De fato, tanto as fêmeas como suas proles apresentavam à inspeção bom estado geral, boa elasticidade cutânea, pelagem homogênea, ausência de piloereção e presença de comportamento de auto-limpeza. Também não foram observados abortamentos, malformação fetal ou filhotes natimortos em nenhum dos grupos estudados. Da mesma forma, não foram verificadas diferenças significantes entre as fêmeas no que se refere à duração da gestação, número de partos a termo e relação macho:fêmea. Não só o estado geral dos filhotes foi idêntico entre os grupos como também o comportamento das mães. Neste sentido, embora não quantificado, observou-se que todas as camundongas formavam ninhos, colocavam os filhotes dentro dos mesmos e os amamentavam. Trabalhos anteriores realizados em nossos laboratórios após outras manipulações pré-natais relataram os mesmos resultados (FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO,

2002; PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001). Entretanto, os resultados observados após o uso de metirapona durante a gestação não permitem a exclusão de um possível efeito tóxico direto deste fármaco sobre a mãe. Neste sentido, por volta do 3º dia de tratamento com a metirapona, as mães apresentavam pêlos arrepiados, desidratação e apatia. O número de partos a termo também foi menor nas fêmeas tratadas com metirapona; de fato, várias fêmeas vieram a óbito por volta do 19º dia de gestação. Segundo Barlow, Morrison e Sullivan (1974), os níveis plasmáticos de corticosterona em camundongas chegam a aumentar em até 60 vezes do meio para o final da gestação mostrando a importância deste hormônio durante a fase gestacional. Provavelmente, o tratamento com metirapona realizado neste experimento impediu o aumento dos níveis de corticosterona, comprometendo a gestação.

Assim, sugerimos que os efeitos do estresse pré-natal e do tratamento com naloxona não sejam decorrência de interferências com a gestação; seguindo esta linha de raciocínio os resultados decorrentes destes tratamentos não estariam ligados a alterações na interação mãe/filhote durante a gestação ou no período pós-natal. Por outro lado, a análise dos dados após o uso da metirapona não permite descartar um efeito tóxico direto deste fármaco sobre a gestação; desta forma, este efeito deverá merecer maiores considerações.

Antes, porém, de continuar com a discussão dos resultados, é importante relembrar os mecanismos de resposta ao estresse. O PVN libera CRH e AVP, que estimulam a secreção de ACTH pela hipófise, que produz a liberação dos glicocorticóides. Estes hormônios atuam de volta na hipófise e no hipotálamo e regulam sua própria liberação. Os opióides endógenos inibem a liberação de CRH por uma ação direta em neurônios presentes no PVN ou por outra, indireta, que se faz via redução do efeito estimulatório da Nor nesta região (WEINSTOCK, 1997). Tendo em mente esta complexa inter-relação de sistemas, é importante perceber que é impossível isolar os efeitos produzidos por manipulação do sistema opióide daqueles

decorrentes da manipulação dos corticosteróides, isto é, do eixo HPA. Por isso, embora a discussão que se segue tenha sido feita, em um primeiro momento, em separado para cada uma das manifestações, em nenhum momento os efeitos da manipulação de um sistema exclui a participação do outro.

7.1 ESTRESSE PRÉ-NATAL

Nossos resultados mostraram, na prole de machos e de fêmeas avaliada as 30 dias de vida, que o estresse pré-natal: 1) aumentou a atividade geral dos animais avaliados em campo aberto; 2) aumentou os níveis de ansiedade dos camundongos como avaliado no labirinto em cruz elevado; 3) diminuiu a atividade dos macrófagos peritoneais e 4) aumentou o *turnover* de Nor hipotalâmica. Especialmente nos machos, o estresse pré-natal: 5) diminuiu os níveis séricos de corticosterona e 6) aumentou os níveis de Nor hipotalâmicas. Por outro lado, nas fêmeas, a exposição ao estresse intra-útero: 7) aumentou os níveis séricos de corticosterona. O estresse pré-natal, sozinho, não alterou nem os níveis nem o *turnover* de dopamina medidos no estriado dos machos e das fêmeas.

No contexto da presente discussão, é importante ressaltar que a avaliação comportamental dos animais foi realizada em uma sala fracamente iluminada e sem ruído, sendo os comportamentos captados por meio de uma câmera de vídeo instalada dentro dessa sala. Desta forma, a presença do observador não interferiu com a manifestação do comportamento dos animais. Assim, como as observações foram realizadas na vigência de baixos níveis de estimulação ambiental e por isso pode-se dizer que representam muito mais características do comportamento exploratório da prole do que as respostas emocionais comumente analisadas neste aparelho em

condições de à alta estimulação ambiental (PARE; GLAVIN; 1993). Neste sentido, infere-se a existência de níveis elevados de emocionalidade e/ou de ansiedade no campo aberto através do aumento do número de bolos fecais liberados pelos animais (HALL, 1934; KELLEY, 1993), pela preferência dos mesmos em mover-se na área externa ou tigmotática (próximo as paredes) do aparelho (BARNETT, 1958; GROSSEN; KELLEY, 1972) e/ou pela diminuição de atividade exploratória (LISTER, 1987).

Diversos trabalhos mostraram a influência de um estresse pré-natal nos níveis de ansiedade da prole observada no campo aberto ou no labirinto em cruz elevado (FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002; LEHMANN; STOHR; FELDON, 2000; PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001; SZURAN et al., 1991). Na maior parte destes experimentos, foi bem caracterizado o efeito ansiogênico resultante da exposição ao estresse *in utero*. No entanto, como trabalhamos com baixos níveis de estimulação ambiental e como observamos aumento de locomoção no campo aberto, quer nos parecer que outra explicação, que não a alteração dos níveis de ansiedade no aparelho, justifique nossos achados. Neste sentido, uma boa hipótese para explicar nossos resultados seria um aumento de atividade em sistemas catecolaminérgicos centrais. De fato, esses sistemas de neurotransmissão estão relacionados às manifestações motoras ligadas ao aumento de atividade geral ou de comportamento exploratório agora observado no aparelho. Esta hipótese parece viável visto que observamos aumento de *turnover* de Nor nos animais pré-natalmente estressados.

Sabe-se que tanto a noradrenalina como a dopamina presentes no SNC estão ligadas à atividade motora (FLORIO; SAKATE; PALERMO-NETO, 1993; PALERMO-NETO; FLORIO; SAKATE, 1994; PALERMO-NETO; SAKATE; FLORIO, 1997). Sabe-se, também, que a atividade destes sistemas está ligada à atividade exploratória e a transtornos comportamentais, como ansiedade e depressão (GROSSMAN; POTTER, 1999; HALLER, 2004; KICEY, 1974; POTTER; MANJI, 1994). De fato, situações estressantes ativam sistemas noradrenérgicos centrais e produzem aumento do

turnover de noradrenalina (CHARNEY; HENINGER, 1985; GLAVIN et al., 1983). Em particular, áreas da região límbica como o hipotálamo, a amígdala e o hipocampo apresentam aumentos rápidos e de significativa magnitude no *turnover* de noradrenalina em resposta a estressores como, por exemplo, contenção e choque nas patas (TANAKA et al., 1982). Em animais de laboratório, mostrou-se que o estresse aumentou a atividade de células do *locus coeruleus* (PAVCOVICH et al., 1990; SIMSON; WEISS, 1988). Neste sentido, mostrou-se que a exposição de um cão a um gato (estresse psicológico) produziu um aumento robusto e rápido da atividade nervosa medida no *locus coeruleus* do gato (LEVINE; LITTO; JACOBS, 1990).

De acordo com Abercrombie, Keller e Zigmond (1988; LEVINE; LITTO; JACOBS, 1990) o incremento do *turnover* de noradrenalina induzido pelo estresse seria consequência de um aumento na atividade da enzima tirosina hidroxilase, passo limitante para a conversão da noradrenalina. Neste sentido, e como já salientado, observamos que os machos e as fêmeas estressadas *in utero* apresentaram aumento do *turnover* da Nor, fato que sugere terem estes animais uma maior ativação dos circuitos neuronais noradrenérgicos. Este dado bioquímico, por sua vez, concorda não apenas com o aumento de atividade locomotora observada no campo aberto como com os maiores níveis de ansiedade medida neste trabalho, no labirinto em cruz elevado. Neste sentido, Kofman (2002) relatou ser freqüente a observação de um aumento da atividade locomotora em resposta ao estresse pré-natal em experimentos que o empregaram no terço final da gestação, como no presente trabalho.

No entanto, é possível que o aumento da atividade geral encontrado neste trabalho na prole de machos e de fêmeas possa também ser explicado por um avanço no desenvolvimento motor apresentado pela prole estressada intra-útero, conforme descrito por Fride e Weinstock (1984). De fato, a atividade geral/exploratória envolve um componente motor. Assim, é possível que nossos achados possam também refletir um adiantamento induzido pelo estresse pré-natal na ontogenia do sistema motor. Entretanto, embora factível, esta hipótese parece não se encaixar completamente em

nossos achados porque não encontramos diferenças no desenvolvimento físico e no peso da prole estressada durante a gestação.

O nível de ansiedade dos animais por nós observado foi operacionalmente inferido como proposto por Pellow et al. (1985), isto é, como uma resposta a uma situação na qual o comportamento é influenciado por duas forças motivacionais opostas – a curiosidade natural pela exploração de lugares novos e a aversão por locais abertos. Neste sentido, sabe-se que avaliações comportamentais realizadas no labirinto em cruz elevado, bem como análises bioquímicas dos níveis séricos de corticosterona são bons indicadores tanto da resposta ao estresse como dos níveis de ansiedade (FILE, 1985; LISTER, 1987; MCEWEEN et al., 1997). Neste sentido, mostrou-se que fármacos ansiolíticos, como os benzodiazepínicos, aumentavam a exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado; por outro lado, fármacos ansiogênicos como a cafeína, a ioimbina e o pentilenotetrazol a diminuíam (PELLOW et al., 1985). O labirinto em cruz elevado foi validado também pela presença de estímulos aversivos que fazem parte do repertório comportamental natural dos roedores, tais como à exposição única a um predador (ADAMEC; SHALLOW, 1993) e a resposta ao odor do gato (ZANGROSSI; FILE, 1992). Neste trabalho observamos que animais estressados durante a gestação apresentaram diminuição no número de entradas e no tempo gasto explorando os braços abertos do aparelho, indicando estes achados que animais expostos a um estresse no terço final de gestação apresentam aumento de ansiedade. Como já exposto, altos níveis de ativação noradrenérgica central, como o observado por nós neste trabalho, estão relacionados com aumento de ansiedade e poderiam explicar os dados comportamentais agora descritos.

Os efeitos de diferentes tipos de estresse pré-natal sobre os níveis de catecolaminas da prole já foram discutidos em outros trabalhos (FRIDE; WEINSTOCK, 1988; GERARDIN et al., 2005; HUTTUNEN; NISKANEN, 1978; TAKAHASHI; TURNER; KALIN, 1992; WEINSTOCK et al., 1998). Em especial, Takahashi, Turner e

Kalin (1992) demonstraram que animais estressados *in utero* e avaliados na idade adulta apresentavam aumento do *turnover* de Nor no córtex cerebral e no *locus ceruleus*. Em resposta a um estresse aplicado na idade adulta, as concentrações plasmáticas de Nor e MHPG estavam aumentadas em machos estressados durante gestação (WEINSTOCK et al., 1998), indicando este fato que o sistema nervoso autônomo simpático poderia, também, estar ativado nos animais submetidos ao estresse pré-natal. Estes achados concordam e reforçam a hipótese proposta nesta tese, de que o aumento da locomoção no campo aberto e da ansiedade no labirinto em cruz elevado observados neste trabalho nos animais pré-natalmente estressados estejam relacionados com uma maior ativação do sistema noradrenérgico central dos animais.

Além do aumento da atividade noradrenérgica central, outro indicador importante de aumento de ansiedade são os níveis séricos de corticosterona. Neste sentido, sabe-se que animais ansiosos apresentam aumento das concentrações de corticosterona circulantes, diminuição da atividade geral avaliada em campo aberto na presença de estimulação ambiental e diminuição da exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado (FILE, 1982; PELLOW et al., 1985; PELLOW; FILE, 1986). Os resultados por nós obtidos no labirinto em cruz elevado mostram que os animais (machos e fêmeas) das proles estressadas intra-útero são mais ansiosos que aqueles do grupo controle. Entretanto, o estresse pré-natal diminuiu os níveis séricos de corticosterona avaliado na prole de machos e a aumentou na prole de fêmeas. Como entender esta aparente discrepância de resultados?

Diversos trabalhos têm mostrado que os efeitos do estresse pré-natal sobre o funcionamento do eixo HPA são mais pronunciados após a exposição dos animais a um outro estresse na idade adulta (WEINSTOCK, 1997, 2001, 2002; WEINSTOCK et al., 1998). Assim, como no presente experimento os níveis de estimulação ambiental eram pequenos ou mínimos no campo aberto, não induziram, provavelmente, qualquer alteração na atividade do eixo HPA, isto é não representaram um estresse adicional.

Por outro lado, a situação vivenciada pelos animais no labirinto em cruz elevado, por ser mais ansiogênica, produziu modificações comportamentais indicativas de aumento dos níveis de ansiedade, isto é, diminuição de tempo e/ou frequência de exploração dos braços abertos do aparelho. Assim, a exposição dos animais ao estresse induzido no labirinto em cruz elevado pode ter aumentado a atividade do eixo HPA dos machos, traduzindo-se este fato por aumento dos níveis de corticosterona (FILE, 1982; FRIDE et al., 1986; PELLOW; FILE, 1986). No entanto, nesta tese de doutorado, as amostras de sangue coletadas para a análise de corticosterona não foram feitas nos mesmos animais que passaram pelo campo aberto e pelo labirinto em cruz elevado; elas foram realizadas em machos e em fêmeas de outras proles, submetidas apenas ao estresse pré-natal. Esta informação, em conjunto com aquela da literatura, permite sugerir que o dado agora descrito para os níveis séricos de corticosterona nos machos não reflete aquele que seria esperado durante a exposição dos animais estressados intra-útero estresse adicional dos aparelhos de observação comportamental. Assim, é possível que durante a exposição dos machos ao estresse ambiental do labirinto em cruz elevado, os camundongos pré-natalmente estressados tenham respondido à situação experimental não apenas comportamentalmente (com redução de exploração dos braços abertos), mas também com aumento da ativação do eixo HPA e dos níveis séricos de corticosterona. Neste sentido, na prole de fêmeas, onde os efeitos do estresse pré-natal sobre o funcionamento do eixo HPA foram mais pronunciados (WEINSTOCK et al., 1992), observamos não apenas aumento dos níveis séricos de corticosterona, avaliados em condições basais, mas também aumento da ansiedade no labirinto em cruz elevado.

Nossos resultados, em conjunto com aqueles da literatura, permitem, portanto, sugerir que o aumento de locomoção no campo aberto e de ansiedade no labirinto em cruz elevado observados nos animais estressados durante o terço final de gestação sejam reflexo de um aumento de atividade noradrenérgica central. Esta mesma

ativação teria resultado em aumento dos níveis de corticosterona, ao menos como agora verificado na prole de machos.

Ora, uma vez que foi demonstrado que os animais estressados pré-natalmente apresentavam aumento de atividade locomotora avaliada no campo aberto, dos níveis de ansiedade avaliados no labirinto em cruz elevado, da atividade noradrenérgica central e alteração dos níveis séricos de corticosterona basal (diminuição destes níveis nos machos e aumento nas fêmeas), investigamos se a exposição a este estresse seria capaz de modificar a atividade de algumas células ligadas ao sistema imune inato dos animais; este fato, se presente, mostraria a importância do eixo neuroimune para os resultados deste trabalho. Nossos achados mostraram, neste sentido, que a exposição ao estresse pré-natal não produziu muitos efeitos sobre a atividade dos neutrófilos sanguíneos; no entanto, diminuiu a atividade dos macrófagos peritoneais avaliada tanto pelo *burst* oxidativo como pela fagocitose.

Analisando-se estes resultados, as primeiras perguntas que surgem são: por que neutrófilos e macrófagos responderam de forma diferente ao estresse pré-natal empregado? Que diferença(s) entre estes dois tipos celulares poderiam explicar a discrepância destes resultados? Neste sentido, sabe-se que ambas as células têm função de fagocitose e compõem a primeira linha de defesa do sistema imune inato. Os neutrófilos estão presentes, na circulação sanguínea, já diferenciados, enquanto que os macrófagos só aparecem no tecido a partir da diferenciação do monócito presente na corrente sanguínea. A diferenciação dos monócitos em macrófagos altera a morfologia da célula e aumenta sua capacidade metabólica e fagocítica (GORDON, 1986, 1998). Talvez essa diferenciação de monócito em macrófago tenha tornado essas células mais vulneráveis às alterações do micro-ambiente em que se inserem, alterações estas induzidas pelo estresse pré-natal.

Outra hipótese que acreditamos seja importante para explicar a diferença de achados entre neutrófilos e macrófagos envolve a atividade da enzima

mieloperoxidase. Esta enzima está presente apenas nos neutrófilos e representa cerca de 25% do total de proteínas granulares do neutrófilo. A mieloperoxidase catalisa a transformação da H_2O_2 em um composto halogenado, o ácido hipocloroso, que tem capacidade microbicida muito superior a dos EROs (SEGAL, 2005). Ora, a técnica empregada neste trabalho é eficiente para medir a produção de EROs. Assim, a ausência de resultado nos neutrófilos seja, talvez, uma decorrência do fato de ter sido toda a ERO produzida convertida a ácido hipocloroso; neste sentido, a técnica que empregamos não era destinada à dosagem deste composto halogenado.

Mostramos, anteriormente, que a prole estressada intra-útero apresenta níveis elevados de ansiedade no labirinto em cruz elevado; naquela ocasião sugerimos ter sido este fato consequência de um aumento no *turnover* de noradrenalina no SNC. Diversos trabalhos têm mostrado que o aumento de ansiedade pode levar a prejuízos da resposta imune inata (BARTROP et al., 1977; HARBUZ, 2003; MCEWEN; SAPOLSKY, 1995), e, também, que os níveis de catecolaminas, em especial de noradrenalina, sejam relevantes para a adequação da imunidade inata (CARLSON et al., 1987; FELTEN, 1991; FREIRE-GARABAL et al., 1991; FRIEDMAN; IRWIN, 1997). Tanto a adrenalina, como a noradrenalina e a dexametasona inibem a produção de IL-12 por macrófagos (ELENKOV et al., 1996); neste sentido, sabe-se que a IL-12 é um potente estimulador da resposta imune celular (SANDERS, 1998). Já se descreveu uma diminuição na proliferação de linfócitos sanguíneos relacionada apenas aos sistemas catecolaminérgicos centrais e periféricos (KELLER et al.: 1988). Ortega et al. (2000) mostraram que diferentes concentrações de Nor aplicadas *in vitro* podem aumentar ou diminuir a produção de ânion superóxido por macrófagos peritoneais de ratos, na dependência da dose.

Neste sentido, é importante ressaltar que os leucócitos possuem em sua superfície diferentes subtipos de adrenocetores, cuja expressão é alterada pelo estado de ativação imunológica (SANDERS, 1998). Aparentemente todos os

leucócitos expressam receptores β -adrenérgicos em sua superfície com exceção dos clones Th2 (ELENKOV et al., 2000). A quantidade de receptores β presentes na superfície das células parece variar conforme o desenvolvimento do sistema imunológico e o grau de maturação das mesmas. Assim, por exemplo, os timócitos parecem ter menor número de β -adrenoceptores que os linfócitos T maduros. A presença de receptores α -adrenérgicos em leucócitos não é facilmente detectada em condições normais. Alguns autores sugerem seja sua expressão observada apenas em células mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos) de certos compartimentos (peritônio) ou, ainda, na presença de certas condições patológicas (ELLENKOV et al., 2000). Spengler et al., (1990), neste sentido, mostraram que macrófagos eliciados por LPS possuem receptores α -2-adrenérgicos em sua superfície.

As catecolaminas produzem vários efeitos imunomoduladores que podem ser tanto imunoestimulantes como supressores (ELLENKOV et al, 2000). A maioria dos trabalhos encontrados na literatura sobre este assunto centra-se nos efeitos sobre os linfócitos e indicam que as catecolaminas exercem importante papel nas respostas Th1 e Th2. A estimulação de células B leva a uma predominância das respostas Th2 com aumento da produção de anticorpos e de IL-4, o que se faz através de um aumento da expressão de moléculas acessórias provenientes das células B (KASPROWICZ et al., 2000). Por outro lado, quando as células T crescem em condições promotoras de padrão Th1, o tratamento com β agonistas leva a um aumento da liberação de IFN- γ e de IL-12 (SWANSON; LEE; SANDERS, 2001). De modo geral, a maioria dos trabalhos indica que as catecolaminas promovam uma diminuição de citocinas Th1 e um aumento de citocinas Th2. Assim, é possível sugerir que a alteração noradrenérgica central, descrita nos animais estressados pré-natalmente, reflita um aumento de atividade do sistema nervoso autônomo simpático. Neste contexto, recordamos que este sistema também se ativa na presença de estresse (CARRASCO; VAN DE KAR, 2003). Ora, uma ativação com esta tem,

sabidamente, repercussões na periferia, em especial sobre a atividade de macrófagos peritoneais. Assim, sugerimos que o aumento do *turnover* de Nor, medido no hipotálamo dos animais, reflita uma ativação do sistema nervoso autônomo simpático. De fato, como já salientado, a ativação de sistemas noradrenérgicos centrais está relacionada a um aumento de atividade do *locus ceruleus* e de áreas límbicas, como hipotálamo, hipocampo e amígdala (PAVCOVICH et al., 1990; SIMSON; WEISS, 1988; TANAKA et al., 1982), cuja estimulação reconhecidamente aumenta o tona simpático. Esta ativação simpática, por liberar Nor no final de terminações nervosas em íntima associação com células imunes como os leucócitos, teria favorecido a síntese de citocinas do tipo Th2, que inibem a resposta imune celular. Isto explicaria a diminuição da atividade dos macrófagos peritoneais observada nos animais submetidos a um estresse no terço final de gestação. Neste contexto, é possível que os efeitos agora propostos sejam relevantes para a diferenciação dos monócitos em macrófagos.

Outro fator a ser considerado na análise dos resultados de imunidade ora discutidos diz respeito aos níveis séricos de corticosterona da prole estressada. Como comentado anteriormente, observamos, nas fêmeas, que a exposição ao estresse *in utero* aumentou os níveis deste hormônio. É sabido que a corticosterona inibe a atividade imune celular (ELENKOV ET AL., 2000). Estes dados, em conjunto, permitem sugerir que a diminuição da atividade macrofágica possa também estar ligada ao aumento dos níveis séricos de corticosterona. Embora esta hipótese pareça atraente, ela deve ser avaliada com mais cuidado. De fato, os machos estressados também apresentaram diminuição da atividade dos macrófagos peritoneais, e neles os níveis de corticosterona avaliados estavam diminuídos. Embora este último achado aponte na direção de um efeito do sistema nervoso autônomo simpático, é possível que a sensibilidade dos macrófagos aos efeitos da corticosterona possa estar aumentada nesta condição.

Ao concluir a análise deste tópico, gostaríamos de sugerir a existência de uma relação neuroimune para os resultados aqui encontrados. Os dados permitem supor

que a aplicação de um estresse, no terço final de gestação, aumente a atividade geral e os níveis de ansiedade de camundongos machos e fêmeas, em decorrência de um aumento da atividade noradrenérgica central, caracterizada, neste trabalho, pelo aumento do *turnover* de Nor. O aumento dos níveis de ansiedade dos animais em conjunto ou em decorrência do aumento de atividade noradrenérgica central diminuiria a atividade dos macrófagos peritoneais da prole estressada. Neste contexto, o aumento da atividade noradrenérgica central estimularia o sistema nervoso autônomo simpático que, por sua vez, liberando Nor atuaria em receptores específicos presentes nos macrófagos, mudando o curso da resposta imune de Th1 para Th2, ocasionando a diminuição da atividade celular observada na prole de camundongos estressada. A ausência de efeitos nos neutrófilos pode ser explicada, como discutida anteriormente, pela ação da enzima mieloperoxidase sobre os radicais livres de oxigênio.

Além de estabelecer mecanismos pelos quais o estresse pré-natal altera o comportamento e a imunidade inata da prole, outro objetivo desta tese foi determinar qual a importância do sistema opioidérgico e daqueles mediado por glicocorticóides durante a aplicação deste estresse.

7.2 INTERAÇÃO DO SISTEMA OPIOIDÉRGICO COM O ESTRESSE PRÉ-NATAL

Nossos resultados mostraram, na prole de machos que: 1) a naloxona preveniu o aumento da locomoção total observada na prole estressada e 2) preveniu a diminuição da atividade observada nos macrófagos peritoneais da prole estressada. O tratamento com naloxona, sozinho ou 30 minutos antes do estresse pré-natal: 3) aumentou os níveis séricos de corticosterona, 4) diminuiu o *burst* oxidativo dos neutrófilos sanguíneos induzido por PMA ou SAPI e 5) diminuiu as concentrações

séricas de testosterona. A aplicação de naloxona, sozinha, do 15° ao 19° dia de gestação, 6) aumentou o *turnover* de dopamina estriatal. O tratamento com naloxona 7) não preveniu o aumento do turnover da Nor observado nos machos estressados.

Na prole de fêmeas, o tratamento prévio com naloxona, antes da aplicação do estresse: 1) preveniu o aumento da frequência de levantar e 2) preveniu a diminuição da atividade dos macrófagos peritoneais. O tratamento com naloxona, sozinho ou 30 minutos antes do estresse: 3) diminuiu o *burst* oxidativo espontâneo dos neutrófilos sanguíneos, 4) aumentou as concentrações hipotalâmicas de MHPG e 5) aumentou o turnover da Nor. A exposição pré-natal apenas à naloxona aumentou a capacidade de fagocitose dos neutrófilos sanguíneos. A associação naloxona+estresse: 6) aumentou a porcentagem de tempo gasto nos braços fechados do labirinto em cruz elevado e 7) diminuiu os *burst* oxidativo dos neutrófilos estimulados com PMA. O tratamento com naloxona potencializou o *turnover* de Nor observado nas fêmeas estressadas.

Os primeiros resultados experimentais a chamar a atenção na discussão deste tópico são aqueles que mostram a relevância do sistema opióide endógeno nos parâmetros comportamentais e imunológicos avaliados neste trabalho. Isso pode ser constatado através dos numerosos efeitos que a naloxona, sozinha ou associada ao estresse, produziu sobre a prole de camundongos machos e fêmeas. Neste contexto, vale ressaltar que a dose de naloxona empregada (1 mg/kg) e o tempo entre a aplicação da mesma e a exposição das fêmeas ao estresse (30 minutos), foram utilizados em outro contexto por Miranda-Paiva et al. (2001); estes autores que mostraram ser esta dose de naloxona capaz de bloquear os receptores opioidérgicos por, pelo menos, 90 minutos. Outros trabalhos realizados em nossos laboratórios utilizaram também 1 mg/kg de naloxona, aplicada 30 minutos antes da morfina (agonista opióide) obtendo um bom nível de bloqueio do receptor opióide (COSTA, 2004). A dose de 1 mg/kg foi, ainda, utilizada por Shepanek et al. (1995) para estudar

os efeitos do bloqueio pré-natal dos receptores opióides sobre o desenvolvimento da prole de ratos.

Muitos estudos têm mostrado a participação do sistema opioidérgico no desenvolvimento fetal (SCHINDLER et al., 2004; SHEPANEK et al., 1995; VATHY, 2002; ZAGON et al., 1998; ZAGON; TOBIAS; MCLAUGHLIN, 1997) e nos efeitos do estresse pré-natal (POLTYREV; WEINSTOCK, 1997; REZNIKOV; NOSENKO; TARASENKO, 1999, 2003, 2005; RIMANOCZY et al., 2003). McLaughlin et al (1997a; 1997b), em particular, mostraram que o bloqueio do receptor opióide com naltrexona durante toda a gestação resultou em adiantamento do desenvolvimento físico da prole. Com base nestes dados, os autores sugeriram que os opióides endógenos ativos durante a fase de ontogenia são fatores importantes para a inibição do crescimento. No presente trabalho, não encontramos diferenças significativas no desenvolvimento físico e no peso da prole em nenhuma das idades estudadas. Provavelmente isto se deva a diferenças metodológicas entre o nosso trabalho e o de McLaughlin (1997a; 1997b) como, por exemplo, na espécie animal estudada, na época da gestação em que o antagonista foi aplicado e na dose de antagonista empregada. No entanto, outro trabalho também mostrou inexistência de diferenças significantes no desenvolvimento da prole submetida ao tratamento com antagonistas opióides (KESHET; WEINSTOCK, 1995).

Há que verificar, em um primeiro momento, se o bloqueio opioidérgico realizado durante a aplicação do estresse preveniu as modificações por ele induzidas. De fato, este foi o achado que obtivemos na prole de machos em relação à locomoção total. Por outro lado, o tratamento com naloxona antes do estresse não reverteu o aumento da ansiedade observada no labirinto em cruz elevado na prole de fêmeas estressada *in utero* e nem preveniu o aumento da atividade noradrenérgica nestes animais; ao contrário, o potencializou. Assim, os resultados agora descritos para as fêmeas reforçam a nossa hipótese da existência de uma ligação entre o aumento de

ansiedade no labirinto em cruz elevado e aumento do *turnover* da Nor. Neste contexto, embora a naloxona aplicada antes do estresse tenha prevenido o aumento da locomoção total observada no campo aberto para os machos, não preveniu o aumento da atividade noradrenérgica nestes animais. Isto sugere que na prole de machos estressados, outros fatores, que não somente a noradrenalina, devam estar envolvidos no aumento da locomoção total avaliada em campo aberto. Neste contexto, estas alterações de locomoção não poderiam ser explicados de forma tão simples.

Vários sistemas estão envolvidos na ato de explorar o campo aberto; além da neurotransmissão noradrenérgica, a atividade dopaminérgica central e aquela do eixo HPA são muito importantes para a avaliação do comportamento dos animais neste aparelho (PARÉ; GLAVIN, 1993). Considerando-se que os efeitos descritos em nosso trabalho foram decorrentes de uma manipulação aplicada durante a gestação, qualquer explicação simplista seria impossível. Os tratamentos foram aplicados aos filhotes durante a fase de desenvolvimento fetal, portanto em uma época onde os sistemas orgânicos estavam em desenvolvimento e apresentavam alta taxa de replicação celular estando; por isso mesmo, mais sensíveis à manipulação (VOM SAAL; EVEN; QUADAGNO, 1991). Assim, é possível que o tratamento com naloxona tenha interferido com outro sistema relacionado à atividade motora e não avaliado por nós. Neste contexto, o aumento do *turnover* de dopamina observado neste trabalho na prole de machos surge como bom candidato. De fato, a dopamina esta diretamente envolvida com a atividade motora (FLORIO; SAKATE; PALERMO-NETO, 1993; PALERMO-NETO; FLORIO; SAKATE, 1994; PALERMO-NETO; SAKATE; FLORIO, 1997) e inúmeros trabalhos têm apontado aumento de locomoção no campo aberto na vigência de maior atividade dopaminérgica (FELICIO; PALERMO-NETO; NASELLO, 1989; NASELLO et al., 2003).

Outras duas hipóteses reforçam a idéia de que o sistema opioidérgico possa estar envolvido com os resultados que agora discutimos. Vathy, Etgen e Barfield (1985) mostraram que a aplicação pré-natal de morfina causava desmasculinização

dos machos, efeito este também descrito após a exposição a um estresse pré-natal (SLAMBEROVA; POMETLOVA; CHAROUSOVA, 2005; WARD; STEHM, 1991). Neste sentido, a administração de naltrexona 3 vezes por dia a mães estressadas reverteu esta alteração (REZNIKOV; NOSENKO; TARASENKO, 2005; WARD; MONAGHAN; WARD, 1986). Segundo Sapronov, Fedotova e Goncharov (2001) as fêmeas apresentam maior atividade geral avaliada em campo aberto do que os machos. Desta forma, nossos resultados permitem sugerir que o estresse pré-natal, via ativação do sistema opioidérgico, teria levado a uma desmasculinização dos machos; por isso, eles apresentariam maior atividade locomotora no campo aberto que os animais não estressados intra-útero. De fato, este efeito é dependente da ativação do sistema opioidérgico, o bloqueio desta ativação preveniria a desmasculinização, por isso a naloxona, aplicada antes do estresse, teria revertido o aumento da locomoção nos machos. Neste sentido, o efeito da desmasculinização relacionada aos opióides só poderia ter ocorrido nos machos (ORDYAN; PIVINA, 2003; SLAMBEROVA; POMETLOVA; CHAROUSOVA, 2005; WARD; STEHM, 1991), o que explicaria a ausência de efeitos da naloxona nas fêmeas. Entretanto, esta hipótese deve ser avaliada com cuidado, uma vez que mostramos que a prole de machos avaliada aos 30 dias de vida e tratada com naloxona do 15º ao 19º dia de gestação apresentava aumento dos níveis séricos de testosterona.

Finalmente, diversos trabalhos demonstraram que exposições repetidas à morfina aumentam a locomoção dos animais avaliados em campo aberto, fenômeno conhecido por *sensibilização comportamental* (KURIBARA, 1996). Estes resultados, em conjunto com os que ora apresentamos, permitem sugerir outra explicação para os achados deste trabalho após o tratamento com naloxona. De acordo com ela, o aumento da atividade locomotora da prole estressada poderia ter sido resultado de uma super estimulação do sistema opioidérgico da prole, o que causaria alterações semelhantes às observadas na sensibilização comportamental. O tratamento com naloxona antes do estresse seria capaz de reverter essa super estimulação.

Reforçando esta idéia, Deroche et al. (1995) relataram a existência de um fenômeno de sensibilização cruzada entre estresse e morfina, isto é, não só aplicações repetidas de morfina levavam à sensibilização comportamental, como também a exposição ao estresse. Neste contexto, é extremamente relevante lembrar que os fenômenos de sensibilização comportamental estão intimamente relacionados à atividade catecolaminérgica central, em especial com a dopamina (PIAZZA et al., 1990). Neste contexto, diversos trabalhos têm mostrado que animais submetidos ao estresse pré-natal são mais susceptíveis à auto administração por fármacos e apresentam sensibilização comportamental em resposta à anfetamina (DEMINIERE et al., 1992; DIAZ; FUXE; OGREN, 1997; HENRY et al., 1995) e ao estresse (RIMONDINI et al., 2003).

Os resultados agora apresentados e os da literatura permitem sugerir que o sistema opioide tenha uma participação relevante nas alterações comportamentais induzidas pelo estresse pré-natal nos machos, seja por induzir sensibilização comportamental seja por induzir desmasculinização. Em contra partida, os dados encontrados nas fêmeas sugerem que, pelo menos no que diz respeito às alterações comportamentais, o sistema opioide não seja tão importante.

Nossos dados mostram que os opióides endógenos são também relevantes para o desenvolvimento da função dos neutrófilos e macrófagos sanguíneos. Neste sentido, são poucos os trabalhos que analisaram os reflexos da manipulação opioide durante a gestação sobre o sistema imune como um todo e inato, em particular. Shavit et al. (1998) mostraram que a aplicação de morfina a ratas, do 12º ao 18º dia de gestação, resultou tanto em uma supressão da atividade citotóxica das células NK como em uma redução da febre induzida por LPS em ratos machos e adultos. Com base nestes resultados os autores sugeriram que o uso de morfina pré-natal poderia estimular ou inibir a liberação de citocinas, na dependência do tipo celular e da função avaliada (CHAO et al., 1993; DAS et al., 1995; KONG et al., 1997;

MAROTTI et al., 1994). De fato, observações deste trabalho sugerem que os opióides endógenos ora diminuem a atividade imunológica (como no caso do *burst* oxidativo avaliado nos machos) ora a aumentam (como no relativo à capacidade de fagocitose avaliada nas fêmeas). Sugerimos, então, que o tratamento pré-natal com opióides tenha modulado a secreção de citocinas pelas células imunes dos animais adultos. Desta forma, os opióides podem ter um efeito estimulatório ou inibitório, na dependência da célula, da citocina e da atividade imunológica avaliada.

Uma observação interessante, que também poderia explicar os dados a respeito dos neutrófilos, foi a observação de que o tratamento com naloxona aumentou os níveis séricos de corticosterona na prole dos machos. Neste sentido, já foram largamente descritos e discutidos os efeitos imunomodulatórios da corticosterona (DELRUE-PEROLLET; LI; NEVEU, 1995; HARBUZ, 2003; KLEIN et al., 1992; LI et al., 2000; MCEWEN et al., 1997; PRUETT et al., 2000). Particularmente, sabe-se que a corticosterona tem efeito imunossupressor sobre a imunidade inata (BLOTTA; DEKRUYFF; UMETSU, 1997; MCEWEN et al., 1997; MERLOT et al., 2004; SHAKHAR; BLUMENFELD, 2003). Assim, sugerimos que além do efeito sobre a liberação de citocinas, a manutenção dos níveis corretos de opióides durante o terço final de gestação seria importante para garantir o correto funcionamento do eixo HPA, e desta forma, assegurar níveis normais de atividade imune inata. Neste contexto, é importante lembrar, como já citado anteriormente, a inter-relação existente entre os sistemas opioide e noradrenérgico no controle do eixo HPA. Como salientado, os opióides endógenos inibem a ativação do eixo HPA ou por uma ação direta nos neurônios do PVN ou por reduzir o efeito estimulatório da Nor nesta região.

O próximo passo lógico será discutir a importância do sistema opioide para os efeitos observados sobre a atividade dos macrófagos. Os resultados mostraram que o tratamento com naloxona antes do estresse preveniu todas as alterações macrofágicas observadas anteriormente. Este resultado sugere que a

diminuição da atividade dos macrófagos peritoneais da prole de machos e de fêmeas estressada *in utero* possa ter sido consequência de uma ativação do sistema opioidérgico durante o estresse e que outros fatores, além da atividade noradrenérgica central, estariam envolvidos com este efeito. De fato, vale lembrar que o tratamento com naloxona não preveniu o aumento do *turnover* de noradrenalina nos machos e nas fêmeas estressadas. Desta forma, como já sugerido quando da discussão relativa à atividade dos neutrófilos sanguíneos, hipotetizamos um papel imunomodulatório para os opióides endógenos durante a gestação. Neste sentido, sabe-se que o tratamento de animais adultos ou de células imunes com morfina muda o perfil de secreção de citocinas de Th1 para Th2 (ROY et al., 2001; ROY et al., 2004). Sugerimos que o estresse pré-natal, via estimulação opioidérgica, tenha programado as células imunes para secreção de citocinas perfil Th2, que diminui a resposta imune. Quando se bloqueia a atividade opioidérgica com o uso da naloxona, a secreção de citocinas do tipo Th2 deixaria de ser o padrão das células imunes, e por isso o efeito do estresse pré-natal seria prevenido.

Tomando todos os resultados em seu conjunto, parece razoável propor que o aumento da atividade noradrenérgica observada na prole estressada parece não depender da atividade do sistema opioidérgico durante a gestação, uma vez que o tratamento com naloxona não foi capaz de preveni-lo. Por outro lado, mostramos que o bloqueio da atividade opioidérgica durante o estresse preveniu tanto o aumento da locomoção observada na prole de machos estressada como a diminuição da atividade dos macrófagos peritoneais observada nos machos e nas fêmeas. Esta observação mostra que é possível reverter alguns dos efeitos ligados ao estresse pré-natal com a manipulação do sistema opioidérgico. Provavelmente, com uso da naloxona, outros fatores, além da noradrenalina, passam a ter maior importância, como, por exemplo, a modulação exercida pelos opióides endógenos, durante a gestação, sobre a liberação

de citocinas e os níveis e a atividade da corticosterona. No próximo tópico discutiremos os achados experimentais que envolvem este hormônio.

7.3 INTERAÇÃO GLICOCORTICÓIDE COM ESTRESSE PRÉ-NATAL

Os achados comportamentais relativos à aplicação de metirapona, sozinha, foram idênticos àqueles descritos para o estresse pré-natal, isto é, os machos e as fêmeas estressadas ou os animais tratados com a metirapona no terço final de gestação apresentaram aumento da ansiedade avaliada no labirinto em cruz elevado. Curiosamente, quando a metirapona foi administrada 3 horas antes do estresse, este efeito foi prevenido. Em relação à atividade dos neutrófilos sanguíneos, observamos que a manutenção dos níveis de glicocorticóides durante a gestação é importante para o funcionamento destas células, tanto na prole de machos como na de fêmeas. A avaliação da atividade dos macrófagos peritoneais mostrou que a metirapona preveniu os efeitos do estresse pré-natal sobre estas células. Em relação aos níveis de corticosterona, observamos que a metirapona sozinha, aplicada do 15° ao 19° dia de gestação, aumentou os níveis deste hormônio avaliados na prole de machos. Na prole de fêmeas, observamos que o tratamento com metirapona 3 horas antes do estresse pré-natal preveniu o aumento dos níveis séricos de corticosterona avaliados nas fêmeas estressadas. Finalmente, a aplicação de metirapona sozinha foi capaz de aumentar as concentrações estriatais de dopamina, seus metabólitos e seu *turnover* na prole de machos e de fêmeas. O tratamento com metirapona diminuiu os níveis de Nor na prole de machos e não os alterou na prole de fêmeas.

Assim como anteriormente, o primeiro passo desta discussão buscará investigar a importância dos glicocorticóides liberados durante o estresse pré-natal

para o aumento da ansiedade avaliada na prole de machos e de fêmeas estressada. Observamos, de forma contundente e indubitável, que na prole de machos e de fêmeas o bloqueio da síntese de glicocorticóides durante o estresse materno foi eficiente em prevenir esta alteração comportamental. Entretanto, como descrito anteriormente para o tratamento com naloxona, a metirapona também não preveniu a alteração noradrenérgica observada na prole estressada, sugerindo este achado que outros fatores, além dos níveis centrais de noradrenalina, estejam envolvidos com os resultados de ansiedade.

Uma observação interessante neste sentido foi a constatação de um aumento dos níveis séricos de corticosterona na prole de fêmeas estressadas *in utero* e avaliadas aos 30 dias de idade. De fato, um aumento dos níveis de glicocorticóides acompanhou o aumento dos níveis de ansiedade em animais e humanos (BONILLA-JAIME et al., 2003; KALYNCHUK et al., 2004; SHEPARD; BARRON; MYERS, 2000; WINDLE et al., 1997), sendo este hormônio utilizado como um marcador de situações estressantes. Nossos dados, portanto, indicam presença de ansiedade na prole de fêmeas. Neste sentido, observamos que o tratamento com metirapona antes da aplicação do estresse preveniu tanto o aumento dos níveis de corticosterona como aquele de ansiedade. Vale lembrar que os efeitos da metirapona aplicada antes do estresse foram muito mais robustos nas fêmeas (onde foi melhor caracterizada a alteração de atividade do eixo HPA) que nos machos. Entretanto, conforme já explicado, nossos resultados não permitem descartar a hipótese de que, durante a exposição da prole de machos ao labirinto em cruz elevado, eles também apresentem aumento dos níveis de corticosterona quando comparados aos do grupo controle. Neste sentido, lembramos mais uma vez, que não avaliamos os níveis deste hormônio após a observação dos animais no labirinto em cruz elevado.

Alterações do funcionamento do eixo HPA nos animais estressados já foram descritas por vários autores (TAKAHASHI; KALIN, 1991; TAKAHASHI et al., 1988; WEINSTOCK, 1997, 2002, 2005; WEINSTOCK et al., 1992; WEINSTOCK et al.,

1998). Weinstock et al. (1992), em particular, mostraram que a aplicação de um estresse a ratas no terço final de gestação aumentou em até 6 vezes os níveis plasmáticos de corticosterona apenas nas fêmeas, visto que nos machos não foram observadas quaisquer diferenças entre os grupos controle e experimentais. O mecanismo responsável pelas anormalidades observadas no funcionamento do eixo HPA da prole estressada ainda não está totalmente esclarecido; no entanto, vários estudos mostraram que ratos adultos estressados *in utero* apresentavam menor número de receptores do tipo I (para mineralocorticóides) e do tipo II (para glicocorticóides) no hipocampo e em outras áreas cerebrais (HENRY et al., 1994; WEINSTOCK, 2001; WEINSTOCK et al., 1992). Cratty et al.(1995) trabalhando em um modelo *in vitro*, mostraram que a amígdala de ratos estressados no terço final de gestação liberava mais CRH que a amígdala de ratos de um grupo controle. Barbazanges et al.(1996) mostraram que a diminuição dos receptores para glicocorticóides no hipocampo da prole de ratos era dependente do aumento dos níveis de glicocorticóides observado quando da exposição a um estresse pré-natal.

Os fenômenos descritos acima permitem explicar porque nas fêmeas estressadas do presente trabalho observamos um aumento dos níveis de corticosterona sérica. Estas fêmeas apresentavam, provavelmente, menor número de receptores para glicocorticóides no hipocampo, e por isso apresentavam capacidade diminuída de auto-regulação por *feedback* do eixo HPA. Adicionalmente, em situações de medo ou ansiedade, a amígdala destes animais responderia liberando mais CRH, o que estimularia ainda mais o eixo HPA que, neste caso, já estaria com o *feedback* negativo prejudicado. Assim, além da sugestão de que o aumento da ansiedade da prole estressada esteja relacionado a alterações do sistema noradrenérgico central, nossos resultados indicam também que, ao menos para a prole de fêmeas, o outro fator que poderia estar envolvido com a alteração comportamental observada: seria a corticosterona sérica.

Mostramos, também na prole de fêmeas, que é possível prevenir o aumento dos níveis séricos de corticosterona e, conseqüentemente ou concomitantemente o aumento de ansiedade, através do bloqueio da síntese de corticosterona durante o estresse, fato este que ressalta a importância deste hormônio na sinalização dos efeitos do estresse pré-natal na prole de fêmeas. Entretanto, é importante avaliar estes resultados com maior cuidado. Observamos que, embora o tratamento com metirapona tenha prevenido as alterações comportamentais e endócrinas observadas na prole estressada, os machos e as fêmeas tratados com metirapona sozinha, isto é, sem a aplicação de um estresse 3 horas depois, apresentaram níveis de ansiedade no labirinto em cruz elevado idêntica àquela avaliada na prole estressada pré-natalmente. Este resultado, de alguma forma inesperado, dificulta a interpretação do papel dos glicocorticóides durante a gestação na instalação das alterações comportamentais observadas. De fato, se o estresse pré-natal, via liberação de glicocorticóides, aumenta a ansiedade da prole adulta (que é o que sugere a comparação dos grupos C, EPN e Met+EPN), é difícil acreditar que os animais tratados com metirapona, antagonista da síntese de glicocorticóide, apresentem igual comportamento que aqueles estressados. Neste sentido, relembramos novamente que qualquer experimento realizado durante o período pré-natal não pode ser discutido de forma simplista. É provável que as alterações que ocorrem na prole durante o período gestacional, em resposta à aplicação de metirapona, possam ter sido as mesmas, isto é, o organismo do feto reconheceria apenas a existência de uma alteração nos níveis de glicocorticóide, não importando se aumento ou diminuição. Esta hipótese, aparentemente controversa, precisa ser melhor investigada. Outra hipótese, também interessante, discutida nos parágrafos abaixo seria a sugestão de que os efeitos dos glicocorticóides sobre a prole dependa do micro-ambiente hormonal no qual se encontravam os fetos por ocasião do tratamento com a metirapona ou da exposição ao estresse.

Também para o tratamento com metirapona estabelecemos uma relação neuroimunológica entre os achados de comportamento e de imunidade inata. Assim, constatamos, após a utilização da metirapona, que os glicocorticóides endógenos são importantes para a função dos neutrófilos sanguíneos. De fato, os resultados observados apenas quando da associação metirapona + estresse pré-natal sugerem que o tratamento com a metirapona, em condições de estresse, possa interferir, direta ou indiretamente, com outros sistemas que não apenas o eixo HPA da mãe e do feto, criando um micro-ambiente hormonal diferente daquele que imaginamos (onde apenas a síntese de glicocorticóide estaria bloqueada). Um bom exemplo desta situação foi o resultado de *burst* oxidativo induzido por PMA e SAPI avaliado nos neutrófilos dos machos. Embora não tenhamos observado nenhum efeito do estresse ou da aplicação de metirapona, a associação metirapona+estresse aumentou a produção de radicais livres de oxigênio induzidos pelo PMA. Quando o estímulo foi a fagocitose da *S. aureus*, percebemos que o tratamento com metirapona diminuiu a produção de radicais livres; por outro lado, a associação metirapona+estresse a aumentou.

Estes resultados sugerem que os glicocorticóides endógenos sejam importantes para a atividade dos neutrófilos sanguíneos. Sugerimos ainda, que os efeitos dos glicocorticóides presentes no terço final da gestação sobre a imunidade inata da prole adulta dependam das condições hormonais em que se encontravam os fetos quando o fármaco foi administrado. Em situações de estresse, quando há uma alteração do micro-ambiente hormonal, o glicocorticóide apresentaria um efeito diferente daquele avaliado em condições onde a mãe grávida não teria sido submetida a nenhum estímulo aversivo.

Os resultados observados a partir da análise da atividade dos macrófagos peritoneais dos machos e das fêmeas permitem sugerir uma ligação direta entre a diminuição da atividade destas células e o aumento de ansiedade observada nos animais. Da mesma forma que o tratamento com metirapona preveniu o aumento da ansiedade, também preveniu o prejuízo da atividade dos macrófagos peritoneais de

machos e de fêmeas estressadas durante a gestação. A discussão a respeito dos níveis séricos de corticosterona observados da prole de fêmeas estressadas *in utero* também se encaixaria nesta explicação.

Observamos que as fêmeas estressadas apresentaram aumento dos níveis séricos de corticosterona quando avaliados aos 30 dias de vida. Conforme amplamente discutido neste trabalho, sabe-se que a corticosterona inibe a atividade imune celular. Isto permite sugerir que a diminuição da atividade macrofágica na prole de fêmeas estressadas possa estar ligada ao aumento dos níveis séricos de corticosterona. Reforçando esta idéia, observamos que o tratamento com metirapona preveniu tanto a alteração na atividade de macrófagos como a alteração do eixo HPA das fêmeas.

Assim, os resultados agora apresentados permitem sugerir que a redução da atividade dos macrófagos peritoneais observada na prole estressada intra-útero esteja relacionada aos altos níveis de ansiedade observada nestes animais e, conseqüentemente, ao aumento de atividade do eixo HPA. Reforça esta hipótese o fato de ter o tratamento prévio das fêmeas grávidas com metirapona revertido tanto a ansiedade como a alteração macrofágica. Assim, para a prole de fêmeas sugerimos a participação de outro fator nas alterações comportamentais e na imunes: a corticosterona.

Em vários resultados observamos que o tratamento com naloxona apresentou os mesmos resultados daqueles obtidos com metirapona; por exemplo, os achados de atividade de macrófagos. Esta observação confirma a hipótese levantada no começo desta discussão, de que os efeitos da manipulação opiodérgica não excluem os glicocorticóides e vice-versa. Apesar de termos apresentado em separado os achados após o tratamento com naloxona daqueles obtidos após o tratamento com metirapona não podemos excluir a participação de nenhum dos dois sistemas nos efeitos do estresse pré-natal. Vale lembrar que a liberação de glicocorticóides é controlada por

inúmeros sistemas, dentre os quais se encontra o opioide. Portanto, não podemos excluir os glicocorticóides dos efeitos resultantes da manipulação opioide. Por outro lado, os glicocorticóides liberados pela adrenal, ao inibir o funcionamento do eixo HPA, também inibem a ativação do sistema opioide.

Sem esquecer estas interações, nossos resultados mostram que a exposição a um estresse durante o terço final de gestação apresenta efeitos sobre o comportamento e sobre a atividade imune inata da prole de camundongos machos e fêmeas. Mostramos que a alteração comportamental mais importante foi o aumento de ansiedade observada nestes animais no labirinto em cruz elevado. Vale lembrar que este achado já foi relatado na literatura (FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002; FRIDE et al., 1986; FRIDE; WEINSTOCK, 1988; PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001). Sugerimos que o aumento de ansiedade observada por nós seja consequência de uma maior atividade do sistema noradrenérgico na prole estressada, alteração esta traduzida pelo aumento do *turnover* da Nor. Observamos, também, que animais os estressados *in utero* apresentaram diminuição da atividade dos macrófagos peritoneais. Sugerimos que a diminuição da atividade destas células seja consequência do aumento dos níveis de ansiedade e de uma ativação do eixo HPA.

O *link* neuroimunológico proposto neste trabalho é o que segue: A aplicação de um estresse no terço final de gestação aumentaria o *turnover* da Nor. Isto explicaria o aumento da atividade geral no campo aberto e de ansiedade no labirinto em cruz elevado observados nas proles de machos e de fêmeas submetidas ao estresse pré-natal. Ainda, o aumento da atividade noradrenérgica central poderia atuar em conjunto com um aumento de atividade do sistema nervoso autônomo simpático, que, por sua vez, poderia modificar o padrão de secreção de citocinas pelas células imunes, passando a resposta de um padrão Th1, celular, para um padrão Th2, humoral. A alteração do perfil de citocinas poderia explicar os efeitos inibitórios do estresse pré-natal sobre a atividade dos macrófagos peritoneais.

Sugerimos, também, alguns mecanismos intrínsecos ao estresse pré-natal que poderiam determinar tais alterações. Desta forma, nossos resultados mostraram que para o aumento da ansiedade no labirinto em cruz elevado parece ser importante o controle dos níveis de corticosterona durante a aplicação do estresse pré-natal.

Em relação à atividade dos neutrófilos sanguíneos, mostramos que o estresse pré-natal, sozinho, não produziu efeitos importantes. Por outro lado, observamos que a manipulação quer do sistema opióide quer dos níveis de glicocorticóides durante a gestação altera a atividade destas células. Sugerimos que os efeitos destas manipulações sejam mediados por mudanças no perfil de citocinas liberados pelas células imunes; assim sendo, o sentido deste efeito, estimulação ou inibição da resposta imunológica, dependeria do tipo de teste realizado com as células.

Os resultados obtidos com os macrófagos já haviam sido descritos por nós (FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002; PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001); isto é, já havíamos observado anteriormente que a exposição a um estresse pré-natal diminuía a atividade destas células. Neste trabalho, formulamos a hipótese de que a diminuição da atividade macrofágica da prole estressada seria dependente de opióides endógenos liberados durante o estresse pré-natal.

Concluindo, quer nos parecer tenha este trabalho conseguido estabelecer uma contextualização neuroimunológica para os efeitos do estresse pré-natal observados na prole. Mostramos, em particular, que os efeitos comportamentais e sobre a atividade imune inata são dependentes quer da atividade opioidérgica quer dos níveis de glicocorticóides durante a exposição ao estresse *in utero*.

8 CONCLUSÕES

A aplicação do estresse pré-natal resultou em aumento da ansiedade da prole de machos e fêmeas. O tratamento com naloxona preveniu este efeito apenas nos machos, enquanto a metirapona preveniu a ansiedade na prole de machos e fêmeas;

O estresse pré-natal não apresentou efeitos importantes na atividade dos neutrófilos sanguíneos. Por outro lado, o tratamento com naloxona modificou a atividade destas células. De igual forma, a metirapona também interferiu com os parâmetros observados nos neutrófilos dos machos e das fêmeas. O efeito da metirapona foi dependente da exposição ou não ao estresse pré-natal;

O estresse pré-natal diminuiu a atividade dos macrófagos peritoneais dos camundongos machos e fêmeas estressados. Este efeito foi prevenido pela administração previa de naloxona e de metirapona;

O estresse pré-natal diminuiu os níveis séricos de corticosterona da prole de machos. A naloxona sozinha ou junto com o estresse, aumentou. A metirapona não preveniu este efeito na prole de machos; este fármaco, administrado sozinho no terço final de gestação, aumentou os níveis deste hormônio apenas nos machos. Na prole de fêmeas, o estresse pré-natal aumentou os níveis de corticosterona, efeito prevenido pela administração anterior de metirapona;

A naloxona, sozinha ou em associação com o estresse pré-natal, aumentou os níveis séricos de testosterona;

O estresse pré-natal aumentou a atividade noradrenérgica central dos machos e das fêmeas estressadas, este efeito não foi revertido pelo tratamento com naloxona ou metirapona;

Os tratamentos com naloxona ou metirapona, sozinhos, aumentaram o *turnover* de dopamina

Estes resultados mostram que um estresse aplicado no terço final de gestação pode alterar o comportamento e a atividade imune inata da prole de machos e fêmeas adulta. Os achados sugerem que a alteração de imunidade pode estar relacionada à ansiedade encontrada nos animais, ao aumento da atividade noradrenérgica central, e aos níveis séricos de corticosterona. Concluimos também que é possível prevenir os efeitos do estresse pré-natal bloqueando o sistema opioidérgico ou a liberação de glicocorticóide durante a exposição das fêmeas grávidas ao estímulo estressor. Estes resultados são extremamente relevantes porque mostram que o ambiente pré-natal pode deixar marcas permanentes no funcionamento do sistema nervoso central e do sistema imune dos animais.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, p. 787-793, 1996.
- ABERCROMBIE, E. D.; KELLER, R. W., JR.; ZIGMOND, M. J. Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies. **Neuroscience**, v. 27, p. 897-904, 1988.
- ACKERMAN, K. D.; MADDEN, K. S.; LIVNAT, S.; FELTEN, S. Y.; FELTEN, D. L. Neonatal sympathetic denervation alters the development of in vitro spleen cell proliferation and differentiation. **Brain Behavior and Immunity**, v. 5, p. 235-261, 1991.
- ADAMEC, R. E.; SHALLOW, T. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. **Physiology and Behavior**, v. 54, p. 101-109, 1993.
- ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annual Review Immunology**, v. 2, p. 283-318, 1984.
- ADER, R. Presidential address--1980. Psychosomatic and psychoimmunologic research. **Psychosomatic Medicine**, v. 42, p. 307-321, 1980.
- ALONSO, S. J.; AREVALO, R.; AFONSO, D.; RODRIGUEZ, M. Effects of maternal stress during pregnancy on forced swimming test behavior of the offspring. **Physiology and Behavior**, v. 50, p. 511-517, 1991.
- ALONSO, S. J.; NAVARRO, E.; SANTANA, C.; RODRIGUEZ, M. Motor lateralization, behavioral despair and dopaminergic brain asymmetry after prenatal stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 58, p. 443-448, 1997.
- ANTELMAN, S. M.; EICHLER, A. J.; BLACK, C. A.; KOCAN, D. Interchangeability of stress and amphetamine in sensitization. **Science**, v. 207, p. 329-331, 1980.
- ATKINSON, H. C.; WADDELL, B. J. Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. **Endocrinology**, v. 138, p. 3842-3848, 1997.
- AXELROD, J.; REISINE, T. D. Stress hormones: their interaction and regulation. **Science**, v. 224, p. 452-459, 1984.
- BADWEY, J. A.; KARNOVSKY, M. L. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. **Annual Review Biochemistry**, v. 49, p. 695-726, 1980.
- BAKKER, J. M.; SCHMIDT, E. D.; KROES, H.; KAVELAARS, A.; HEIJNEN, C. J.; TILDERS, F. J.; VAN REES, E. P. Effects of short-term dexamethasone treatment during pregnancy on the development of the immune system and the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the rat. **Journal of Neuroimmunology**, v. 63, p. 183-191, 1995.
- BANKS, W. A.; KASTIN, A. J.; GUTIERREZ, E. G. Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. **Neuroscience Letters**, v. 179, p. 53-56, 1994.

- BARBAZANGES, A.; PIAZZA, P. V.; LE MOAL, M.; MACCARI, S. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. **Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 3943-3949, 1996.
- BARLOW, S. M.; MORRISON, P. J.; SULLIVAN, F. M. Plasma corticosterone levels during pregnancy in the mouse: the relative contributions of the adrenal glands and foeto-placental units. **Journal of Endocrinology**, v. 60, p. 473-483, 1974.
- BARNETT, S. A. Behaviour of wild rats in the laboratory. **Medicine and Biology Illustrate**, v. 6, p. 104-111, 1956.
- BARNETT, S. A. Exploratory behaviour. **British Journal of Psychology**, v. 49, p. 289-310, 1958.
- BARTROP, R. W.; LUCKHURST, E.; LAZARUS, L.; KILOH, L. G.; PENNY, R. Depressed lymphocyte function after bereavement. **Lancet**, v. 1, p. 834-836, 1977.
- BASSO, A. S.; COSTA-PINTO, F. A.; BRITTO, L. R.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Neural pathways involved in food allergy signaling in the mouse brain: role of capsaicin-sensitive afferents. **Brain Research**, v. 1009, p. 181-188, 2004.
- BASSO, A. S.; PINTO, F. A.; RUSSO, M.; BRITTO, L. R.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 140, p. 69-77, 2003.
- BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavioral Brain Research**, v. 125, p. 141-149, 2001.
- BENEDIKTSSON, R.; CALDER, A. A.; EDWARDS, C. R.; SECKL, J. R. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. **Clinical Endocrinology (Oxf)**, v. 46, p. 161-166, 1997.
- BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H.; GÓRNIK, S.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada á medicina veterinária**, São Paulo: Guanabara Koogan, 1996. p. 517-524.
- BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A. Neuroendocrine and metabolic responses induced by interleukin-1. **Journal of Neuroscience Research**, v. 18, p. 172-178, 1987.
- BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DINARELLO, C. A. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, v. 233, p. 652-654, 1986.
- BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; KELLER, M.; MULLER, J. Changes in blood hormone levels during the immune response. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 150, p. 466-470, 1975.
- BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocrinology Reviews**, v. 17, p. 64-102, 1996.
- BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. E.; SORKIN, E. Immune-neuroendocrine interactions. **Journal of Immunology**, v. 135, p. 750s-754s, 1985.
- BLALOCK, J. E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. **Physiology Review**, v. 69, p. 1-32, 1989.

BLATTEIS, C. M. Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. **Progress in Brain Research**, v. 91, p. 409-412, 1992.

BLOTTA, M. H.; DEKRUYFF, R. H.; UMETSU, D. T. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4⁺ lymphocytes. **Journal Immunology**, v. 158, p. 5589-5595, 1997.

BONILLA-JAIME, H.; RETANA-MARQUEZ, S.; VAZQUEZ-PALACIOS, G.; VELAZQUEZ-MOCTEZUMA, J. Corticosterone and testosterone levels after chronic stress in an animal model of depression. **Neuropsychobiology**, v. 48, p. 55-58, 2003.

BRIGGS, J. B.; ODA, Y.; GILBERT, J. H.; SCHAEFER, M. E.; MACHER, B. A. Peptides inhibit selectin-mediated cell adhesion in vitro, and neutrophil influx into inflammatory sites in vivo. **Glycobiology**, v. 5, p. 583-588, 1995.

BROOKS, W. H.; CROSS, R. J.; ROSZMAN, T. L.; MARKESBERY, W. R. Neuroimmunomodulation: neural anatomical basis for impairment and facilitation. **Annals of Neurology**, v. 12, p. 56-61, 1982.

BROWN, R. W.; DIAZ, R.; ROBSON, A. C.; KOTELEVTSSEV, Y. V.; MULLINS, J. J.; KAUFMAN, M. H.; SECKL, J. R. The ontogeny of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action in development. **Endocrinology**, v. 137, p. 794-797, 1996.

BUITELAAR, J. K.; HUIZINK, A. C.; MULDER, E. J.; DE MEDINA, P. G.; VISSER, G. H. Prenatal stress and cognitive development and temperament in infants. **Neurobiology of Aging**, v. 24 Suppl 1, p. S53-60; discussion S67-58, 2003.

CABRERA, R. J.; RODRIGUEZ-ECHANDIA, E. L.; JATUFF, A. S.; FOSCOLO, M. Effects of prenatal exposure to a mild chronic variable stress on body weight, preweaning mortality and rat behavior. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, v. 32, p. 1229-1237, 1999.

CADENAS, E.; SIES, H. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. **Advances Enzyme Regulation**, v. 23, p. 217-237, 1985.

CALVO, N.; MARTIJENA, I. D.; MOLINA, V. A.; VOLOSIN, M. Metyrapone pretreatment prevents the behavioral and neurochemical sequelae induced by stress. **Brain Research**, v. 800, p. 227-235, 1998.

CAMARERO, V. C.; JUNQUEIRA, V. B.; COLEPICCOLO, P.; KARNOVSKY, M. L.; MARIANO, M. Epithelial macrophages secrete a deactivating factor for superoxide release. **Journal of Cell Physiology**, v. 145, p. 481-487, 1990.

CARA, D. C.; CONDE, A. A.; VAZ, N. M. Immunological induction of flavor aversion in mice. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, v. 27, p. 1331-1341, 1994.

CARLSON, S. L.; FELTEN, D. L.; LIVNAT, S.; FELTEN, S. Y. Alterations of monoamines in specific central autonomic nuclei following immunization in mice. **Brain Behavior and Immunity**, v. 1, p. 52-63, 1987.

CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 235-272, 2003.

CHAO, C. C.; MOLITOR, T. W.; CLOSE, K.; HU, S.; PETERSON, P. K. Morphine inhibits the release of tumor necrosis factor in human peripheral blood mononuclear cell cultures. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 15, p. 447-453, 1993.

CHARNEY, D. S.; HENINGER, G. R. Noradrenergic function and the mechanism of action of antianxiety treatment. I. The effect of long-term alprazolam treatment. **Archives General Psychiatry**, v. 42, p. 458-467, 1985.

CHURCHILL, S.; BENGELE, H. H.; MELBY, J. C.; ALEXANDER, E. A. Role of aldosterone in sodium retention of pregnancy in the rat. **American Journal of Physiology**, v. 240, p. R175-181, 1981.

CINTRA, A.; SOLFRINI, V.; BUNNEMANN, B.; OKRET, S.; BORTOLOTTI, F.; GUSTAFSSON, J. A.; FUXE, K. Prenatal development of glucocorticoid receptor gene expression and immunoreactivity in the rat brain and pituitary gland: a combined in situ hybridization and immunocytochemical analysis. **Neuroendocrinology**, v. 57, p. 1133-1147, 1993.

CLARKE, A. S.; WITTEWER, D. J.; ABBOTT, D. H.; SCHNEIDER, M. L. Long-term effects of prenatal stress on HPA axis activity in juvenile rhesus monkeys. **Developmental Psychobiology**, v. 27, p. 257-269, 1994.

COE, C. L.; KRAMER, M.; KIRSCHBAUM, C.; NETTER, P.; FUCHS, E. Prenatal stress diminishes the cytokine response of leukocytes to endotoxin stimulation in juvenile rhesus monkeys. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, p. 675-681, 2002.

CONNOR, T. J.; SONG, C.; LEONARD, B. E.; MERALI, Z.; ANISMAN, H. An assessment of the effects of central interleukin-1beta, -2, -6, and tumor necrosis factor-alpha administration on some behavioural, neurochemical, endocrine and immune parameters in the rat. **Neuroscience**, v. 84, p. 923-933, 1998.

CORBIER, P.; DEHENNIN, L.; CASTANIER, M.; MEBAZAA, A.; EDWARDS, D. A.; ROFFI, J. Sex differences in serum luteinizing hormone and testosterone in the human neonate during the first few hours after birth. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 71, p. 1344-1348, 1990.

COSTA, E. C. R. **Neuroimunomodulação: efeitos da morfina sobre o Comportamento e a atividade de macrófagos**. 2004. 132f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Inflammation. In:_____. **Pathologic basis of disease**. 4th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1989, p. 39-63.

CRATTY, M. S.; WARD, H. E.; JOHNSON, E. A.; AZZARO, A. J.; BIRKLE, D. L. Prenatal stress increases corticotropin-releasing factor (CRF) content and release in rat amygdala minces. **Brain Research**, v. 675, p. 297-302, 1995.

DA SILVA, F. R.; LAZZARINI, R.; DE SA-ROCHA, L. C.; MORGULIS, M. S.; DE OLIVEIRA MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of acute and long-term diazepam administrations on neutrophil activity: a flow cytometric study. **European Journal of Pharmacology**, v. 478, p. 97-104, 2003.

DAS, K. P.; MCMILLIAN, M. K.; BING, G.; HONG, J. S. Modulatory effects of [Met5]-enkephalin on interleukin-1 beta secretion from microglia in mixed brain cell cultures. **Journal of Neuroimmunology**, v. 62, p. 9-17, 1995.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Annual Review of Neuroscience**, v. 15, p. 353-375, 1992.

DAY, J. C.; KOEHL, M.; DEROCHÉ, V.; LE MOAL, M.; MACCARI, S. Prenatal stress enhances stress- and corticotropin-releasing factor-induced stimulation of hippocampal acetylcholine release in adult rats. **Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 1886-1892, 1998.

DE VRY, J.; BENZ, U.; SCHREIBER, R.; TRABER, J. Shock-induced ultrasonic vocalization in young adult rats: a model for testing putative anti-anxiety drugs. **European Journal of Pharmacology**, v. 249, p. 331-339, 1993.

DELRUE-PEROLLET, C.; LI, K. S.; NEVEU, P. J. No change in plasma corticosterone and splenic norepinephrine during humoral and cellular immune responses to sheep erythrocytes in C3H mice. **Neuroimmunomodulation**, v. 2, p. 36-43, 1995.

DEKRUYFF, R. H.; FANG, Y.; UMETSU, D. T. Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 2231-2237, 1998.

DEMINIERE, J. M.; PIAZZA, P. V.; GUEGAN, G.; ABROUS, N.; MACCARI, S.; LE MOAL, M.; SIMON, H. Increased locomotor response to novelty and propensity to intravenous amphetamine self-administration in adult offspring of stressed mothers. **Brain Research**, v. 586, p. 135-139, 1992.

DEROCHÉ, V.; MARINELLI, M.; MACCARI, S.; LE MOAL, M.; SIMON, H.; PIAZZA, P. V. Stress-induced sensitization and glucocorticoids. I. Sensitization of dopamine-dependent locomotor effects of amphetamine and morphine depends on stress-induced corticosterone secretion. **Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 7181-7188, 1995.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. **Brain Behavior and Immunity**, v. 11, p. 286-306, 1997.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. **Proceedings of National Academy of Sciences U S A**, v. 96, p. 1059-1064, 1999.

DHABHAR, F. S.; SATOSKAR, A. R.; BLUETHMANN, H.; DAVID, J. R.; MCEWEN, B. S. Stress-induced enhancement of skin immune function: A role for gamma interferon. **Proceedings of National Academy of Sciences U S A**, v. 97, p. 2846-2851, 2000.

DIAZ, R.; FUXE, K.; OGREN, S. O. Prenatal corticosterone treatment induces long-term changes in spontaneous and apomorphine-mediated motor activity in male and female rats. **Neuroscience**, v. 81, p. 129-140, 1997.

DINARELLO, C. A.; SAVAGE, N. Interleukin-1 and its receptor. **Critical Reviews in Immunology**, v. 9, p. 1-20, 1989.

DORNER, G.; GOTZ, F.; DOCKE, W. D. Prevention of demasculinization and feminization of the brain in prenatally stressed male rats by perinatal androgen treatment. **Experimental Clinical Endocrinology**, v. 81, p. 88-90, 1983.

DUNN, A. J. Nervous system-immune system interactions: an overview. **Journal Receptor Research**, v. 8, p. 589-607, 1988.

DUNN, A. J.; ANTOON, M.; CHAPMAN, Y. Reduction of exploratory behavior by intraperitoneal injection of interleukin-1 involves brain corticotropin-releasing factor. **Brain Research Bulletin**, v. 26, p. 539-542, 1991.

ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P.; WILDER, R. L. Neuroendocrine regulation of IL-12 and TNF-alpha/IL-10 balance. Clinical implications. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 917, p. 94-105, 2000.

ELENKOV, I. J.; PAPANICOLAOU, D. A.; WILDER, R. L.; CHROUSOS, G. P. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. **Proceedings of the Association American Physicians**, v. 108, p. 374-381, 1996.

ELENKOV, I. J.; WILDER, R. L.; CHROUSOS, G. P.; VIZI, E. S. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacology Reviews**, v. 52, p. 595-638, 2000.

ERICSSON, A.; KOVACS, K. J.; SAWCHENKO, P. E. A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 897-913, 1994.

FELICIO, L. F.; PALERMO-NETO, J.; NASELLO, A. G. Perinatal bromopride treatment: effects on motor activity and stereotyped behavior of offspring. **Physiology and Behavior**, v. 45, p. 1081-1085, 1989.

FELSZEGRHY, K.; GASPARI, E.; NYAKAS, C. Long-term selective down-regulation of brain glucocorticoid receptors after neonatal dexamethasone treatment in rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 8, p. 493-499, 1996.

FELTEN, D. L. Neurotransmitter signaling of cells of the immune system: important progress, major gaps. **Brain Behavior and Immunity**, v. 5, p. 2-8, 1991.

FILE, S. E. Naloxone reduces social and exploratory activity in the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 71, p. 41-44, 1980.

FILE, S. E. The rat corticosterone response: habituation and modification by chlordiazepoxide. **Physiology and Behavior**, v. 29, p. 91-95, 1982.

FILE, S. E. Tolerance to the behavioral actions of benzodiazepines. **Neuroscience Biobehavior Reviews**, v. 9, n. 1, p. 113-121, 1985.

FLORIO, J. C.; SAKATE, M.; PALERMO-NETO, J. Effects of amitraz on motor function. **Pharmacology and Toxicology**, v. 73, p. 109-114, 1993.

- FONSECA, E. S.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. **Physiology and Behavior**, v. 77, p. 205-215, 2002.
- FREIRE-GARABAL, M.; BALBOA, J. L.; NUNEZ, M. J.; CASTANO, M. T.; LLOVO, J. B.; FERNANDEZ-RIAL, J. C.; BELMONTE, A. Effects of amphetamine on T-cell immune response in mice. **Life Sciences**, v. 49, p. PL107-112, 1991.
- FRIDE, E.; DAN, Y.; FELDON, J.; HALEVY, G.; WEINSTOCK, M. Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats. **Physiology and Behavior**, v. 37, p. 681-687, 1986.
- FRIDE, E.; DAN, Y.; GAVISH, M.; WEINSTOCK, M. Prenatal stress impairs maternal behavior in a conflict situation and reduces hippocampal benzodiazepine receptors. **Life Sciences**, v. 36, p. 2103-2109, 1985.
- FRIDE, E.; WEINSTOCK, M. The effects of prenatal exposure to predictable or unpredictable stress on early development in the rat. **Developmental Psychobiology**, v. 17, p. 651-660, 1984.
- FRIDE, E.; WEINSTOCK, M. Prenatal stress increases anxiety related behavior and alters cerebral lateralization of dopamine activity. **Life Sciences**, v. 42, p. 1059-1065, 1988.
- FRIEDMAN, A.; KAUFER, D.; SHEMER, J.; HENDLER, I.; SOREQ, H.; TUR-KASPA, I. Pyridostigmine brain penetration under stress enhances neuronal excitability and induces early immediate transcriptional response. **Nature Medicine**, v. 2, p. 1382-1385, 1996.
- FRIEDMAN, E. M.; IRWIN, M. R. Modulation of immune cell function by the autonomic nervous system. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 74, p. 27-38, 1997.
- FRIEDMAN, S. B.; GLASGOW, L. A.; ADER, R. Psychosocial factors modifying host resistance to experimental infections. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 164, p. 381-393, 1969.
- FUJIOKA, T.; SAKATA, Y.; YAMAGUCHI, K.; SHIBASAKI, T.; KATO, H.; NAKAMURA, S. The effects of prenatal stress on the development of hypothalamic paraventricular neurons in fetal rats. **Neuroscience**, v. 92, p. 1079-1088, 1999.
- GAILLARD, R. C.; SPINEDI, E. Sex- and stress-steroids interactions and the immune system: evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, p. 345-352, 1998.
- GLAVIN, G. B.; TANAKA, M.; TSUDA, A.; KOHNO, Y.; HOAKI, Y.; NAGASAKI, N. Regional rat brain noradrenaline turnover in response to restraint stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 19, p. 287-290, 1983.
- GERARDIN, D. C.; PEREIRA, O. C.; KEMPINAS, W. G.; FLORIO, J. C.; MOREIRA, E. G.; BERNARDI, M. M. Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. **Physiology and Behavior**, v. 84, p. 97-104, 2005.
- GORDON, S. Biology of the macrophage. **Journal of Cell Science Supplement**, v. 4, p. 267-286, 1986.

GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. **Research Immunology**, v. 149, p. 685-688, 1998.

GROSSEN, N. E.; KELLEY, M. J. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. **Journal of Comparative Physiology Psychology**, v. 81, p. 307-310, 1972.

GROSSMAN, F.; POTTER, W. Z. Catecholamines in depression: a cumulative study of urinary norepinephrine and its major metabolites in unipolar and bipolar depressed patients versus healthy volunteers at the NIMH. **Psychiatry Research**, v. 87, p. 21-27, 1999.

GUTIERREZ, E. G.; BANKS, W. A.; KASTIN, A. J. Blood-borne interleukin-1 receptor antagonist crosses the blood-brain barrier. **Journal of Neuroimmunology**, v. 55, p. 153-160, 1994.

HALL, C.S. Emotional behaviour in the rat. I - Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Psychology**, v. 18, p. 385-403, 1934

HALLER, C. A. St John's wort, depression, and catecholamines. **Clinical Pharmacology Therapeutics**, v. 76, p. 393-395, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon, 1989.

HAMMOND, B.; KONTOS, H. A.; HESS, M. L. Oxygen radicals in the adult respiratory distress syndrome, in myocardial ischemia and reperfusion injury, and in cerebral vascular damage. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, p. 173-187, 1985.

HARBOUR, D. V.; SMITH, E. M.; BLALOCK, J. E. Novel processing pathway for proopiomelanocortin in lymphocytes: endotoxin induction of a new prohormone-cleaving enzyme. **Journal of Neuroscience Research**, v. 18, p. 95-101, 1987a.

HARBOUR, D. V.; SMITH, E. M.; BLALOCK, J. E. Splenic lymphocyte production of an endorphin during endotoxic shock. **Brain Behavior and Immunity**, v. 1, p. 123-133, 1987b.

HARBUZ, M. Neuroendocrine-immune interactions. **Trends Endocrinology Metabolism**, v. 14, p. 51-52, 2003.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, p. 53-58, 1989.

HELLIWELL, P. G.; WILLIAMS, T. J. The neutrophil. In: **Immunopharmacology of Neutrophils**. New York: Academic Press., p. 1-4, 1994.

HENRY, C.; GUEGANT, G.; CADOR, M.; ARNAULD, E.; ARSAUT, J.; LE MOAL, M.; DEMOTES-MAINARD, J. Prenatal stress in rats facilitates amphetamine-induced sensitization and induces long-lasting changes in dopamine receptors in the nucleus accumbens. **Brain Research**, v. 685, p. 179-186, 1995.

HENRY, C.; KABBAJ, M.; SIMON, H.; LE MOAL, M.; MACCARI, S. Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 6, p. 341-345, 1994.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends Neuroscience**, v. 20, p. 78-84, 1997.

HEUSER, I.; LAMMERS, C. H. Stress and the brain. **Neurobiology of Aging**, v. 24 Suppl 1, p. S69-76; discussion S81-62, 2003.

HIMI, T.; SAITO, H.; NAKAJIMA, T. Spider toxin (JSTX-3) inhibits the memory retrieval of passive avoidance tests. **Journal of Neural Transmission General Section**, v. 80, p. 79-89, 1990.

HOPKINS, S. J.; ROTHWELL, N. J. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. **Trends of Neuroscience**, v. 18, p. 83-88, 1995.

HUTTUNEN, M. O.; NISKANEN, P. Prenatal loss of father and psychiatric disorders. **Archives of General Psychiatry**, v. 35, p. 429-431, 1978.

INSEL, T. R.; BATTAGLIA, G.; FAIRBANKS, D. W.; DE SOUZA, E. B. The ontogeny of brain receptors for corticotropin-releasing factor and the development of their functional association with adenylate cyclase. **Journal of Neuroscience**, v. 8, p. 4151-4158, 1988.

INSEL, T. R.; KINSLEY, C. H.; MANN, P. E.; BRIDGES, R. S. Prenatal stress has long-term effects on brain opiate receptors. **Brain Research**, v. 511, p. 93-97, 1990.

IWAKABE, K.; SHIMADA, M.; OHTA, A.; YAHATA, T.; OHMI, Y.; HABU, S.; NISHIMURA, T. The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2-dominant immunity in mice. **Immunology Letters**, v. 62, p. 39-43, 1998.

JACOBSON, L. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulation. **Endocrinology and Metabolism Clinical of North America**, v. 34, p. 271-292, vii, 2005.

JANKOVIC, B. D. Neuroimmunomodulation: facts and dilemmas. **Immunology Letters**, v. 21, p. 101-118, 1989.

JOSENS, P. G.; ROSSENEU, M.; DEVREESE, A. M.; BULT, H.; MARESCAU, B.; HERMAN, A. G. Diminished capacity to release metabolites of nitric oxide synthase in macrophages loaded with oxidized low-density lipoproteins. **European Journal of Pharmacology**, v. 212, p. 113-115, 1992.

KALYNCHUK, L. E.; GREGUS, A.; BOUDREAU, D.; PERROT-SINAL, T. S. Corticosterone increases depression-like behavior, with some effects on predator odor-induced defensive behavior, in male and female rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 118, p. 1365-1377, 2004.

KASPROWICZ, D. J.; KOHM, A. P.; BERTON, M. T.; CHRUSCINSKI, A. J.; SHARPE, A.; SANDERS, V. M. Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7-2), and the beta 2-adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell. **Journal Immunology**, v. 165, p. 680-690, 2000.

KASS, J. D.; FRIEDMAN, R.; LESERMAN, J.; CAUDILL, M.; ZUTTERMEISTER, P. C.; BENSON, H. An Inventory of Positive Psychological Attitudes with potential relevance to health outcomes: validation and preliminary testing. **Behavioral Medicine**, v. 17, p. 121-129, 1991.

KAY, G.; TARCIC, N.; POLTYREV, T.; WEINSTOCK, M. Prenatal stress depresses immune function in rats. **Physiology and Behavior**, v. 63, p. 397-402, 1998.

KELLER, S. E.; SCHLEIFER, S. J.; LIOTTA, A. S.; BOND, R. N.; FARHOODY, N.; STEIN, M. Stress-induced alterations of immunity in hypophysectomized rats. **Proceedings of National Academy of Sciences U S A**, v. 85, p. 9297-9301, 1988.

KELLER, S. E.; WEISS, J. M.; SCHLEIFER, S. J.; MILLER, N. E.; STEIN, M. Stress-induced suppression of immunity in adrenalectomized rats. **Science**, v. 221, p. 1301-1304, 1983.

KELLEY, A. E. Locomotor activity and exploration. In: **Methods in behavioral pharmacology**, edited by: VAN HAAREN, F. Elsevier Science Publishers, 1993, p.499-519.

KESHET, G. I.; WEINSTOCK, M. Maternal naltrexone prevents morphological and behavioral alterations induced in rats by prenatal stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 50, p. 413-419, 1995.

KICEY, C. A. Catecholamines and depression: a physiological theory of depression. **American Journal Nursery**, v. 74, p. 2018-2020, 1974.

KINSLEY, C. H.; MANN, P. E.; BRIDGES, R. S. Prenatal stress alters morphine- and stress-induced analgesia in male and female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 30, p. 123-128, 1988.

KLEIN, F.; LEMAIRE, V.; SANDI, C.; VITIELLO, S.; VAN DER LOGT, J.; LAURENT, P. E.; NEVEU, P.; LE MOAL, M.; MORMEDE, P. Prolonged increase of corticosterone secretion by chronic social stress does not necessarily impair immune functions. **Life Science**, v. 50, p. 723-731, 1992.

KLEIN, S. L.; RAGER, D. R. Prenatal stress alters immune function in the offspring of rats. **Developmental Psychobiology**, v. 28, p. 321-336, 1995.

KOEHL, M.; BARBAZANGES, A.; LE MOAL, M.; MACCARI, S. Prenatal stress induces a phase advance of circadian corticosterone rhythm in adult rats which is prevented by postnatal stress. **Brain Research**, v. 759, p. 317-320, 1997.

KOENIG, J. I.; KIRKPATRICK, B.; LEE, P. Glucocorticoid hormones and early brain development in schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 27, p. 309-318, 2002.

KOFMAN, O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. **Neuroscience Biobehavior Reviews**, v. 26, p. 457-470, 2002.

KONG, L. Y.; MCMILLIAN, M. K.; HUDSON, P. M.; JIN, L.; HONG, J. S. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide and cytokine production by ultralow concentrations of dynorphins in mixed glia cultures. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, p. 61-66, 1997.

KURIBARA, H. Effects of interdose interval on ambulatory sensitization to methamphetamine, cocaine and morphine in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 316, p. 1-5, 1996.

LANDFIELD, P. W.; APPELEGATE, M. D.; SCHMITZER-OSBORNE, S. E.; NAYLOR, C. E. Phosphate/calcium alterations in the first stages of Alzheimer's disease: implications for etiology and pathogenesis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 106, p. 221-229, 1991.

LAPIN, I. P. Anxiogenic effect of phenylethylamine and amphetamine in the elevated plus-maze in mice and its attenuation by ethanol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 44, p. 241-243, 1993.

LAWRENCE, D. A.; KIM, D. Central/peripheral nervous system and immune responses. **Toxicology**, v. 142, p. 189-201, 2000.

LEHMANN, J.; STOHR, T.; FELDON, J. Long-term effects of prenatal stress experiences and postnatal maternal separation on emotionality and attentional processes. **Behavioral Brain Research**, v. 107, p. 133-144, 2000.

LEHRER, R. I.; GANZ, T.; SELSTED, M. E.; BABIOR, B. M.; CURNUTTE, J. T. Neutrophils and host defense. **Annals of Internal Medicine**, v. 109, p. 127-142, 1988.

LEVINE, E. S.; LITTO, W. J.; JACOBS, B. L. Activity of cat locus coeruleus noradrenergic neurons during the defense reaction. **Brain Research**, v. 531, p. 189-195, 1990.

LEY, K.; ARFORS, K. E. Changes in macromolecular permeability by intravascular generation of oxygen-derived free radicals. **Microvascular Research**, v. 24, p. 25-33, 1982.

LI, K. S.; LIEGE, S.; MOZE, E.; NEVEU, P. J. Plasma corticosterone and immune reactivity in restrained female C3H mice. **Stress**, v. 3, p. 285-298, 2000.

LIGEIRO-OLIVEIRA, A. P.; FIALHO DE ARAUJO, A. M.; LAZZARINI, R.; SILVA, Z. L.; DE NUCCI, G.; MUSCARA, M. N.; TAVARES DE LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Effects of amphetamine on immune-mediated lung inflammatory response in rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, p. 181-190, 2004.

LIGHTMAN, S. L.; YOUNG, W. S., 3RD. Influence of steroids on the hypothalamic corticotropin-releasing factor and preproenkephalin mRNA responses to stress. **Proceedings of National Academy of Sciences U S A**, v. 86, p. 4306-4310, 1989.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, p. 180-185, 1987.

LIVNAT, S.; FELTEN, S. Y.; CARLSON, S. L.; BELLINGER, D. L.; FELTEN, D. L. Involvement of peripheral and central catecholamine systems in neural-immune interactions. **Journal of Neuroimmunology**, v. 10, p. 5-30, 1985.

LLORENTE, E.; BRITO, M. L.; MACHADO, P.; GONZALEZ, M. C. Effect of prenatal stress on the hormonal response to acute and chronic stress and on immune parameters in the offspring. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 58, p. 143-149, 2002.

LLOYD, A. R.; OPPENHEIM, J. J. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. **Immunology Today**, v. 13, p. 169-172, 1992.

LOLAIT, S. J.; CLEMENTS, J. A.; MARKWICK, A. J.; CHENG, C.; MCNALLY, M.; SMITH, A. I.; FUNDER, J. W. Pro-opiomelanocortin messenger ribonucleic acid and posttranslational processing of beta endorphin in spleen macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, v. 77, p. 1776-1779, 1986.

LOU, H. C.; HANSEN, D.; NORDENTOFT, M.; PRYDS, O.; JENSEN, F.; NIM, J.; HEMMINGSEN, R. Prenatal stressors of human life affect fetal brain development. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 36, p. 826-832, 1994.

LUPIEN, S. J.; MCEWEN, B. S. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. **Brain Research Brain Research Reviews**, v. 24, p. 1-27, 1997.

MACCARI, S.; PIAZZA, P. V.; KABBAJ, M.; BARBAZANGES, A.; SIMON, H.; LE MOAL, M. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. **Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 110-116, 1995.

MADDEN, K. S.; FELTEN, D. L. Experimental basis for neural-immune interactions. **Physiology Reviews**, v. 75, p. 77-106, 1995.

MAES, M.; BOSMANS, E.; CALABRESE, J.; SMITH, R.; MELTZER, H. Y. Interleukin-2 and interleukin-6 in schizophrenia and mania: effects of neuroleptics and mood stabilizers. **Journal of Psychiatry Research**, v. 29, p. 141-152, 1995.

MAIER, S. F.; LAUDENSLAGER, M. L. Inescapable shock, shock controllability, and mitogen stimulated lymphocyte proliferation. **Brain Behavior and Immunity**, v. 2, p. 87-91, 1988.

MAKINO, S.; GOLD, P. W.; SCHULKIN, J. Corticosterone effects on corticotropin-releasing hormone mRNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Brain Research**, v. 640, p. 105-112, 1994.

MAROTTI, T.; BUREK, B.; RABATIC, S.; BALOG, T.; HRSAK, I. Modulation of lipopolysaccharide-induced production of cytokines by methionine-enkephalin. **Immunology Letters**, v. 40, p. 43-47, 1994.

MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 95, p. 11-19, 2003.

MAZUR-KOLECKA, B.; KUBERA, M.; SKOWRON-CENDRZAK, A.; BASTA-KAIM, A.; SHANI, J. Effect of prenatal stress on ontogenesis of immunoregulatory cell maturation in mice. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 48, p. 621-625, 1996.

MCCORMICK, C. M.; SMYTHE, J. W.; SHARMA, S.; MEANEY, M. J. Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. **Brain Research Developmental Brain Research**, v. 84, p. 55-61, 1995.

MCEKEEVER, P. E.; SPICER, S.S. In: **The Reticuloendothelial System**. Editores: Carr, I. e Daems, W.T. vol. 1, Plenum Press, New York, 1980, p. 161

MCEWEN, B. S. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. **Annals of New York Academy of Science**, v. 840, p. 33-44, 1998.

MCEWEN, B. S.; BIRON, C. A.; BRUNSON, K. W.; BULLOCH, K.; CHAMBERS, W. H.; DHABHAR, F. S.; GOLDFARB, R. H.; KITSON, R. P.; MILLER, A. H.; SPENCER, R. L.; WEISS, J. M. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. **Brain Research Brain Research Reviews**, v. 23, p. 79-133, 1997.

MCEWEN, B. S.; SAPOLSKY, R. M. Stress and cognitive function. **Current Opinion Neurobiology**, v. 5, p. 205-216, 1995.

MCEWEN, B. S.; STELLAR, E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. **Archives of Internal Medicine**, v. 153, p. 2093-2101, 1993.

MCLAUGHLIN, P. J.; TOBIAS, S. W.; LANG, C. M.; ZAGON, I. S. Chronic exposure to the opioid antagonist naltrexone during pregnancy: maternal and offspring effects. **Physiology and Behavior**, v. 62, p. 501-508, 1997a.

MCLAUGHLIN, P. J.; TOBIAS, S. W.; LANG, C. M.; ZAGON, I. S. Opioid receptor blockade during prenatal life modifies postnatal behavioral development. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 58, p. 1075-1082, 1997b.

MEANEY, M. J.; AITKEN, D. H.; VIAU, V.; SHARMA, S.; SARRIEAU, A. Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 50, p. 597-604, 1989.

MERLOT, E.; MOZE, E.; DANTZER, R.; NEVEU, P. J. Cytokine production by spleen cells after social defeat in mice: activation of T cells and reduced inhibition by glucocorticoids. **Stress**, v. 7, p. 55-61, 2004.

METALNIKOV, S.; CHORINE, V. Rôle des reflexes conditionnels dans l'immunité. **Annals Institute Pasteur**, v. 40, p. 893-900, 1926.

METCHNIKOFF, E. **Immunity in infectious diseases**. Cambridge: Cambridge University Press, 1905. 60 p.

MILKOVIC, K.; PAUNOVIC, J.; KNIEWALD, Z.; MILKOVIC, S. Maintenance of the plasma corticosterone concentration of adrenalectomized rat by the fetal adrenal glands. **Endocrinology**, v. 93, p. 115-118, 1973.

MIRANDA-PAIVA, C. M.; NASELLO, A. G.; YIN, A. J.; FELICIO, L. F. Morphine pretreatment increases opioid inhibitory effects on maternal behavior. **Brain Research Bulletin**, v. 55, p. 501-505, 2001.

MORGADO, I. The psychobiology of learning and memory: fundamentals and recent advances. **Revista de Neurologia**, v. 40, p. 289-297, 2005.

MORGULIS, M. S.; STANKEVICIUS, D.; SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: consequences on behavior and on ehrlich tumor growth. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, p. 49-57, 2004.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**, v. 17, p. 138-146, 1996.

MULLER, N.; ACKENHEIL, M. Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biology Psychiatry**, v. 22, p. 1-33, 1998.

MUNCK, A.; GUYRE, P. M.; HOLBROOK, N. J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. **Endocrinology Reviews**, v. 5, p. 25-44, 1984.

MURASE, T. The effects of maternal stress on the aromatase activity in the perinatal rat brain. **Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi**, v. 70, p. 95-104, 1994.

NASELLO, A. G.; SASSATANI, A. S.; FERREIRA, F. S.; FELICIO, L. F.; TIEPPO, C. A. Modulation by sudden darkness of apomorphine-induced behavioral responses. **Physiology and Behavior**, v. 78, p. 521-528, 2003.

NEUMANN, I. D. Brain mechanisms underlying emotional alterations in the peripartum period in rats. **Depress Anxiety**, v. 17, p. 111-121, 2003.

NEWSHOLME, P.; CURI, R.; PITHON CURI, T. C.; MURPHY, C. J.; GARCIA, C.; PIRES DE MELO, M. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health and disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, p. 316-324, 1999.

NOGUEIRA, P. J.; FERREIRA, H. H.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, N. A. Chronic mild prenatal stress exacerbates the allergen-induced airway inflammation in rats. **Mediators Inflammation**, v. 8, p. 119-122, 1999.

OGAWA, T.; MIKUNI, M.; KURODA, Y.; MUNEOKA, K.; MORI, K. J.; TAKAHASHI, K. Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, p. 961-967, 1994.

OHKAWA, T.; ROHDE, W.; TAKESHITA, S.; DORNER, G.; ARAI, K.; OKINAGA, S. Effect of an acute maternal stress on the fetal hypothalamo-pituitary-adrenal system in late gestational life of the rat. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 98, p. 123-129, 1991.

ORDYAN, N. E.; PIVINA, S. G. Anxiety levels and neurosteroid synthesis in the brains of prenatally stressed male rats. **Neuroscience Behavior Physiology**, v. 33, p. 899-903, 2003.

ORTEGA, E.; GARCIA, J. J.; SAEZ, M. C.; DE LA FUENTE, M. Changes with aging in the modulation of macrophages by norepinephrine. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 118, p. 103-114, 2000.

OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; CASELGRANDI, E.; COSSARIZZA, A.; FRANCESCHI, C. Relationship between corticotropin-releasing factor and interleukin-2: evolutionary evidence. **FEBS Letters**, v. 351, p. 19-21, 1994.

OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; COSSARIZZA, A.; FRENCHESCHI, C. ACTH-like molecules in lymphocytes. A study in different vertebrate classes. **Neuropeptides**, v. 23, p. 215-219, 1992.

OTTERNESS, I. G.; SEYMOUR, P. A.; GOLDEN, H. W.; REYNOLDS, J. A.; DAUMY, G. O. The effects of continuous administration of murine interleukin-1 alpha in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 43, p. 797-804, 1988.

PALERMO-NETO, J.; DE OLIVEIRA MASSOCO, C.; ROBESPIERRE DE SOUZA, W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behavior and Immunity**, v. 17, p. 43-54, 2003.

PALERMO-NETO, J.; FLORIO, J. C.; SAKATE, M. Developmental and behavioral effects of prenatal amitraz exposure in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 16, p. 65-70, 1994.

PALERMO-NETO, J.; GUIMARAES, R. K. Pavlovian conditioning of lung anaphylactic response in rats. **Life Sciences**, v. 68, p. 611-623, 2000.

PALERMO NETO, J.; MASSOCO, C. O.; FAVARE, R. C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 23, p. 497-507, 2001.

PALERMO-NETO, J.; SAKATE, M.; FLORIO, J. C. Developmental and behavioral effects of postnatal amitraz exposure in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 989-997, 1997.

PARÉ, W. P.; GLAVIN, G. B. Animal Models of Stress in Pharmacology. In: **Methods in behavioral pharmacology**, edited by: VAN HAAREN, F. Elsevier Science Publishers, 1993, p.413-441.

PAVCOVICH, L. A.; CANCELA, L. M.; VOLOSIN, M.; MOLINA, V. A.; RAMIREZ, O. A. Chronic stress-induced changes in locus coeruleus neuronal activity. **Brain Research Bulletin**, v. 24, p. 293-296, 1990.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, p. 525-529, 1986.

PEREIRA, B.; ROSA, L. F.; SAFI, D. A.; BECHARA, E. J.; CURI, R. Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in rat macrophages. **Biochemistry and Pharmacology**, v. 50, p. 2093-2098, 1995.

PETERS, D. A. Prenatal stress: effects on brain biogenic amine and plasma corticosterone levels. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 17, p. 721-725, 1982.

PETERS, D. A. Maternal stress increases fetal brain and neonatal cerebral cortex 5-hydroxytryptamine synthesis in rats: a possible mechanism by which stress influences brain development. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 35, p. 943-947, 1990.

PIAZZA, P. V.; DEMINIERE, J. M.; LE MOAL, M.; SIMON, H. Stress- and pharmacologically-induced behavioral sensitization increases vulnerability to acquisition of amphetamine self-administration. **Brain Research**, v. 514, p. 22-26, 1990.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunology Methods**, v. 46, p. 211-226, 1981.

PLOTSKY, P. M. Opioid inhibition of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion into the hypophysial-portal circulation of rats. **Regulatory Peptides**, v. 16, p. 235-242, 1986.

PLOTSKY, P. M.; CUNNINGHAM, E. T., JR.; WIDMAIER, E. P. Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. **Endocrinology Reviews**, v. 10, p. 437-458, 1989.

POLTYREV, T.; KESHET, G. I.; KAY, G.; WEINSTOCK, M. Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats. **Developmental Psychobiology**, v. 29, p. 453-462, 1996.

POLTYREV, T.; WEINSTOCK, M. Effect of prenatal stress on opioid component of exploration in different experimental situations. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 58, p. 387-393, 1997.

POTTER, W. Z.; MANJI, H. K. Catecholamines in depression: an update. **Clinical Chemistry**, v. 40, p. 279-287, 1994.

PRUETT, S. B.; FAN, R.; MYERS, L. P.; WU, W. J.; COLLIER, S. Quantitative analysis of the neuroendocrine-immune axis: linear modeling of the effects of exogenous corticosterone and restraint stress on lymphocyte subpopulations in the spleen and thymus in female B6C3F1 mice. **Brain Behavior and Immunity**, v. 14, p. 270-287, 2000.

REZNIKOV, A. G.; NOSENKO, N. D. Catecholamines in steroid-dependent brain development. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 53, p. 349-353, 1995.

REZNIKOV, A. G.; NOSENKO, N. D.; TARASENKO, L. V. Opioids are responsible for neurochemical feminization of the brain in prenatally stressed male rats. **Neuro Endocrinology Letters**, v. 26, p. 35-38, 2005.

REZNIKOV, A. G.; NOSENKO, N. D.; TARASENKO, L. V. Participation of endogenous opioids in pathogenesis of early neuroendocrine manifestations of prenatal stress syndrome. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 135, p. 421-423, 2003.

REZNIKOV, A. G.; NOSENKO, N. D.; TARASENKO, L. V. Prenatal stress and glucocorticoid effects on the developing gender-related brain. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, p. 109-115, 1999.

RIMANOCZY, A.; SLAMBEROVA, R.; RILEY, M. A.; VATHY, I. Adrenocorticotropin stress response but not glucocorticoid-negative feedback is altered by prenatal morphine exposure in adult male rats. **Neuroendocrinology**, v. 78, p. 312-320, 2003.

RIMONDINI, R.; AGREN, G.; BORJESSON, S.; SOMMER, W.; HEILIG, M. Persistent behavioral and autonomic supersensitivity to stress following prenatal stress exposure in rats. **Behavioral and Brain Research**, v. 140, p. 75-80, 2003.

ROOZENDAAL, B. 1999 Curt P. Richter award. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 25, p. 213-238, 2000.

ROTHWELL, N. J.; HOPKINS, S. J. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. **Trends Neuroscience**, v. 18, p. 130-136, 1995.

ROY, S.; BALASUBRAMANIAN, S.; SUMANDEEP, S.; CHARBONEAU, R.; WANG, J.; MELNYK, D.; BEILMAN, G. J.; VATASSERY, R.; BARKE, R. A. Morphine directs T cells toward T(H2) differentiation. **Surgery**, v. 130, p. 304-309, 2001.

ROY, S.; WANG, J.; GUPTA, S.; CHARBONEAU, R.; LOH, H. H.; BARKE, R. A. Chronic morphine treatment differentiates T helper cells to Th2 effector cells by modulating transcription factors GATA 3 and T-bet. **Journal of Neuroimmunology**, v. 147, p. 78-81, 2004.

SALZET, M.; VIEAU, D.; DAY, R. Crosstalk between nervous and immune systems through the animal kingdom: focus on opioids. **Trends Neuroscience**, v. 23, p. 550-555, 2000.

SANCHEZ, M. D.; MILANES, M. V.; PAZOS, A.; DIAZ, A.; LAORDEN, M. L. Autoradiographic evidence of mu-opioid receptors down-regulation after prenatal stress in offspring rat brain. **Brain Research Developmental Brain Research**, v. 94, p. 14-21, 1996.

SANDERS, V. M. The role of norepinephrine and beta-2-adrenergic receptor stimulation in the modulation of Th1, Th2, and B lymphocyte function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 437, p. 269-278, 1998.

SANDMAN, C. A.; KASTIN, A. J. The influence of fragments of the LPH chains on learning, memory and attention in animals and man. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 13, p. 39-60, 1981.

SAPRONOV, N. S.; FEDOTOVA IU, O.; GONCHAROV, N. P. Sex hormones and behavioral reactions. **Vestn Ross Akad Med Nauk**, v. 12., p. 29-34, 2001.

SCHINDLER, S. D.; ORTNER, R.; PETERNELL, A.; EDER, H.; OPGENOORTH, E.; FISCHER, G. Maintenance therapy with synthetic opioids and driving aptitude. **European Addiction Research**, v. 10, p. 80-87, 2004.

SCHLEIFER, S. J.; KELLER, S. E.; STEIN, M. Conjugal bereavement and immunity. **Israel Journal of Psychiatry Related Sciences**, v. 24, p. 111-123, 1987.

SECKL, J. R. Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 185, p. 61-71, 2001.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents **Nature**, v. 138, p. 32, 1936.

SHAKHAR, G.; BLUMENFELD, B. Glucocorticoid involvement in suppression of NK activity following surgery in rats. **Journal of Neuroimmunology**, v. 138, p. 83-91, 2003.

SHAVIT, Y.; COHEN, E.; GAGIN, R.; AVITSUR, R.; POLLAK, Y.; CHAIKIN, G.; WOLF, G.; YIRMIYA, R. Effects of prenatal morphine exposure on NK cytotoxicity and responsiveness to LPS in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 59, p. 835-841, 1998.

SHAVIT, Y.; LEWIS, J. W.; TERMAN, G. W.; GALE, R. P.; LIEBESKIND, J. C. Opioid peptides mediate the suppressive effect of stress on natural killer cell cytotoxicity. **Science**, v. 223, p. 188-190, 1984.

SHEPANEK, N. A.; SMITH, R. F.; ANDERSON, L. A.; MEDICI, C. N. Behavioral and developmental changes associated with prenatal opiate receptor blockade. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 50, p. 313-319, 1995.

SHEPARD, J. D.; BARRON, K. W.; MYERS, D. A. Corticosterone delivery to the amygdala increases corticotropin-releasing factor mRNA in the central amygdaloid nucleus and anxiety-like behavior. **Brain Research**, v. 861, p. 288-295, 2000.

SHEVACH, E. M. Elimination of specific immunoreactive T lymphocytes with 5-bromodeoxyuridine and light. **Methods in Enzymology**, v. 108, p. 262-270, 1984.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291-295, 1997.

SIGOLA, L. B.; ZINYAMA, R. B. Adrenaline inhibits macrophage nitric oxide production through beta1 and beta2 adrenergic receptors. **Immunology**, v. 100, p. 359-363, 2000.

SIMSON, P. E.; WEISS, J. M. Altered activity of the locus coeruleus in an animal model of depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 1, p. 287-295, 1988.

SLAMBEROVA, R.; POMETLOVA, M.; CHAROUSOVA, P. Postnatal development of rat pups is altered by prenatal methamphetamine exposure. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 18., p., 2005.

SMITH, E. M.; BLALOCK, J. E. Human lymphocyte production of corticotropin and endorphin-like substances: association with leukocyte interferon. **Proceedings of National Academy of Sciences U S A**, v. 78, p. 7530-7534, 1981.

SMITH, R. S.; MAES, M. The macrophage-T-lymphocyte theory of schizophrenia: additional evidence. **Medical Hypotheses**, v. 45, p. 135-141, 1995.

SOBRIAN, S. K.; VAUGHN, V. T.; ASHE, W. K.; MARKOVIC, B.; DJURIC, V.; JANKOVIC, B. D. Gestational exposure to loud noise alters the development and postnatal responsiveness of humoral and cellular components of the immune system in offspring. **Environmental Research**, v. 73, p. 227-241, 1997.

SOBRIAN, S. K.; VAUGHN, V. T.; BLOCH, E. F.; BURTON, L. E. Influence of prenatal maternal stress on the immunocompetence of the offspring. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 43, p. 537-547, 1992.

SOLIVEN, B.; ALBERT, J. Tumor necrosis factor modulates the inactivation of catecholamine secretion in cultured sympathetic neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 58, p. 1073-1078, 1992.

- SONTAG, L. W. The significance of fetal environmental differences. **American Journal of Obstetric and Gynecology**, v. 42, p. 996-1003, 1941.
- SPECTOR, N. H. Neuroimmunomodulation: a brief review. Can conditioning of natural killer cell activity reverse cancer and/or aging? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 24, p. S32-38, 1996.
- SPENGLER, R. N.; ALLEN, R. M.; REMICK, D. G.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. **Journal Immunology**, v. 145, p. 1430-1434, 1990.
- STERNBERG, E. M. Neural-immune interactions in health and disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 2641-2647, 1997.
- STITES, D. P.; TERR, A.L. In: **Basic human immunology**. Ed. Prentice Hall, 1991.
- STOHR, T.; SCHULTE WERMELING, D.; SZURAN, T.; PLISKA, V.; DOMENEY, A.; WELZL, H.; WEINER, I.; FELDON, J. Differential effects of prenatal stress in two inbred strains of rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 59, p. 799-805, 1998.
- SUTTON, R. E.; KOOB, G. F.; LE MOAL, M.; RIVIER, J.; VALE, W. Corticotropin releasing factor produces behavioural activation in rats. **Nature**, v. 297, p. 331-333, 1982.
- SWANSON, L. W.; SIMMONS, D. M. Differential steroid hormone and neural influences on peptide mRNA levels in CRH cells of the paraventricular nucleus: a hybridization histochemical study in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 285, p. 413-435, 1989.
- SWANSON, M. A.; LEE, W. T.; SANDERS, V. M. IFN-gamma production by Th1 cells generated from naive CD4+ T cells exposed to norepinephrine. **Journal Immunology**, v. 166, p. 232-240, 2001.
- SZURAN, T.; ZIMMERMAN, E.; PLISKA, V.; PFISTER, H. P.; WELZL, H. Prenatal stress effects on exploratory activity and stress-induced analgesia in rats. **Developmental Psychobiology**, v. 24, p. 361-372, 1991.
- SZURAN, T. F.; PLISKA, V.; POKORNY, J.; WELZL, H. Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. **Physiology and Behavior**, v. 71, p. 353-362, 2000.
- SZURO-SUDOL, A.; MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Suppression of macrophage antimicrobial activity by a tumor cell product. **Journal of Immunology**, v. 131, p. 384-387, 1983.
- TAGAY, S.; HERPERTZ, S.; LANGKAFEL, M.; SENF, W. Posttraumatic stress disorder in a psychosomatic outpatient clinic Gender effects, psychosocial functioning, sense of coherence, and service utilization. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 58, p. 439-446, 2005.
- TAKAHASHI, L. K.; BAKER, E. W.; KALIN, N. H. Ontogeny of behavioral and hormonal responses to stress in prenatally stressed male rat pups. **Physiology and Behavior**, v. 47, p. 357-364, 1990.

TAKAHASHI, L. K.; KALIN, N. H. Early developmental and temporal characteristics of stress-induced secretion of pituitary-adrenal hormones in prenatally stressed rat pups. **Brain Research**, v. 558, p. 75-78, 1991.

TAKAHASHI, L. K.; KALIN, N. H.; BARKSDALE, C. M.; VANDEN BURGT, J. A.; BROWNFIELD, M. S. Stressor controllability during pregnancy influences pituitary-adrenal hormone concentrations and analgesic responsiveness in offspring. **Physiology and Behavior**, v. 42, p. 323-329, 1988.

TAKAHASHI, L. K.; TURNER, J. G.; KALIN, N. H. Prenatal stress alters brain catecholaminergic activity and potentiates stress-induced behavior in adult rats. **Brain Research**, v. 574, p. 131-137, 1992.

TANAKA, M.; KOHNO, Y.; NAKAGAWA, R.; IDA, Y.; TAKEDA, S.; NAGASAKI, N. Time-related differences in noradrenaline turnover in rat brain regions by stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 16, p. 315-319, 1982.

TRINCHIERI, G.; KUBIN, M.; BELLONE, G.; CASSATELLA, M. A. Cytokine cross-talk between phagocytic cells and lymphocytes: relevance for differentiation/activation of phagocytic cells and regulation of adaptive immunity. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 53, p. 301-308, 1993.

TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions. **Research in Immunology**, v. 146, p. 423-431, 1995.

TUCHSCHERER, M.; KANITZ, E.; OTTEN, W.; TUCHSCHERER, A. Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 86, p. 195-203, 2002.

URSIN, H. The psychology in psychoneuroendocrinology. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, p. 555-570, 1998.

VALLEE, M.; MACCARI, S.; DELLU, F.; SIMON, H.; LE MOAL, M.; MAYO, W. Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 2906-2916, 1999.

VALLEE, M.; MAYO, W.; DELLU, F.; LE MOAL, M.; SIMON, H.; MACCARI, S. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. **Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 2626-2636, 1997.

VALLEE, M.; MAYO, W.; MACCARI, S.; LE MOAL, M.; SIMON, H. Long-term effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters: relationship to corticosterone secretion response. **Brain Research**, v. 712, p. 287-292, 1996.

VATHY, I. Prenatal opiate exposure: long-term CNS consequences in the stress system of the offspring. **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, p. 273-283, 2002.

VATHY, I. U.; ETGEN, A. M.; BARFIELD, R. J. Effects of prenatal exposure to morphine on the development of sexual behavior in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 22, p. 227-232, 1985.

VLAJKOVIC, S.; DUGANDZIJA-NOVAKOVIC, S.; MILANOVIC, S.; JANKOVIC, B. D. Brain self-stimulation and immunity: effect on humoral and cell-mediated immune responses. **International Journal of Neuroscience**, v. 69, p. 235-250, 1993.

VOM SAAL, F. S.; EVEN, M. D.; QUADAGNO, D. M. Effects of maternal stress on puberty, fertility and aggressive behavior of female mice from different intrauterine positions. **Physiology and Behavior**, v. 49, p. 1073-1078, 1991.

VON HERTZEN, L. C. Maternal stress and T-cell differentiation of the developing immune system: possible implications for the development of asthma and atopy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, p. 923-928, 2002.

WAAGE, A.; BRANDTZAEG, P.; ESPEVIK, T.; HALSTENSEN, A. Current understanding of the pathogenesis of gram-negative shock. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 5, p. 781-791, 1991.

WARD, H. E.; JOHNSON, E. A.; SALM, A. K.; BIRKLE, D. L. Effects of prenatal stress on defensive withdrawal behavior and corticotropin releasing factor systems in rat brain. **Physiology and Behavior**, v. 70, p. 359-366, 2000.

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

WARD, I. L.; WEISZ, J. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. **Endocrinology**, v. 114, p. 1635-1644, 1984.

WARD, O. B.; MONAGHAN, E. P.; WARD, I. L. Naltrexone blocks the effects of prenatal stress on sexual behavior differentiation in male rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 25, p. 573-576, 1986.

WATSON, J. B.; MEDNICK, S. A.; HUTTUNEN, M.; WANG, X. Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. **Developmental Psychopathology**, v. 11, p. 457-466, 1999.

WEINSTOCK, M. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? **Neuroscience Biobehavior Reviews**, v. 21, p. 1-10, 1997.

WEINSTOCK, M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. **Progress in Neurobiology**, v. 65, p. 427-451, 2001.

WEINSTOCK, M. Can the behaviour abnormalities induced by gestational stress in rats be prevented or reversed? **Stress**, v. 5, p. 167-176, 2002.

WEINSTOCK, M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. **Brain Behavior and Immunity**, v. 19, p. 296-308, 2005.

WEINSTOCK, M.; MATLINA, E.; MAOR, G. I.; ROSEN, H.; MCEWEN, B. S. Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in the female rat. **Brain Research**, v. 595, p. 195-200, 1992.

WEINSTOCK, M.; POLTYREV, T.; SCHORER-APELBAUM, D.; MEN, D.; MCCARTY, R. Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats. **Physiology and Behavior**, v. 64, p. 439-444, 1998.

WELBERG, L. A.; SECKL, J. R.; HOLMES, M. C. Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 1047-1054, 2000.

WILLIAMS, M. T.; DAVIS, H. N.; MCCREA, A. E.; LONG, S. J.; HENNESSY, M. B. Changes in the hormonal concentrations of pregnant rats and their fetuses following multiple exposures to a stressor during the third trimester. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 21, p. 403-414, 1999.

WINDLE, R. J.; SHANKS, N.; LIGHTMAN, S. L.; INGRAM, C. D. Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. **Endocrinology**, v. 138, p. 2829-2834, 1997.

YI, S. J.; BARAM, T. Z. Corticotropin-releasing hormone mediates the response to cold stress in the neonatal rat without compensatory enhancement of the peptide's gene expression. **Endocrinology**, v. 135, p. 2364-2368, 1994.

YI, S. J.; MASTERS, J. N.; BARAM, T. Z. Effects of a specific glucocorticoid receptor antagonist on corticotropin releasing hormone gene expression in the paraventricular nucleus of the neonatal rat. **Brain Research Developmental Brain Research**, v. 73, p. 253-259, 1993.

YOUNG, W. S., 3RD; MEZEY, E.; SIEGEL, R. E. Quantitative in situ hybridization histochemistry reveals increased levels of corticotropin-releasing factor mRNA after adrenalectomy in rats. **Neuroscience Letters**, v. 70, p. 198-203, 1986.

ZAGON, I. S.; TOBIAS, S. W.; HYTREK, S. D.; MCLAUGHLIN, P. J. Opioid receptor blockade throughout prenatal life confers long-term insensitivity to morphine and alters mu opioid receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 59, p. 201-207, 1998.

ZAGON, I. S.; TOBIAS, S. W.; MCLAUGHLIN, P. J. Endogenous opioids and prenatal determinants of neuroplasticity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 429, p. 289-303, 1997.

ZALCMAN, S.; SHANKS, N.; ANISMAN, H. Time-dependent variations of central norepinephrine and dopamine following antigen administration. **Brain Research**, v. 557, p. 69-76, 1991.

ZANGROSSI, H., JR.; FILE, S. E. Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. **Brain Research Bulletin**, v. 29, p. 381-388, 1992.

ZARROW, M. X.; PHILPOTT, J. E.; DENENBERG, V. H. Passage of 14C-4-corticosterone from the rat mother to the foetus and neonate. **Nature**, v. 226, p. 1058-1059, 1970.

ZIMMERBERG, B.; BLASKEY, L. G. Prenatal stress effects are partially ameliorated by prenatal administration of the neurosteroid allopregnanolone. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 59, p. 819-827, 1998.