THIAGO BERTI KIRSTEN

Lipopolissacarídeo no início do período pré-natal como modelo experimental de autismo e prejuízos dopaminérgicos estriatais

São Paulo

2012

THIAGO BERTI KIRSTEN

Lipopolissacarídeo no início do período pré-natal como modelo experimental de autismo e prejuízos dopaminérgicos estriatais

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

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi

São Paulo

2012

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2607
FMVZ

Kirsten, Thiago Berti

Lipopolissacarídeo no início do período pré-natal como modelo experimental de
autismo e prejuízos dopaminérgicos estriatais / Thiago Berti Kirsten. -- 2012.
195 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.

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

Orientador: Profa. Dra. Maria Martha Bernardi.

1. Modelo animal. 2. Efeitos tipo autismo. 3. LPS. 4. Gestação.
5. Comportamento animal. 6. Dopamina. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos comportamentais, imunes e moleculares da administração pré-natal de lipopolissacarídeo na prole masculina de ratas", protocolado sob o nº1398/2008, utilizando 30 (trinta) ratos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Martha Bernardi, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Beharioval, immunological and molecular effects of LPS prenatal administration on offspring male rats", protocol number 1398/2008, utilizing 30 (thirty) rats, under the responsibility Profa. Dra. Maria Martha Bernardi, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting).

São Paulo, 27 de maio de 2008

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: KIRSTEN, Thiago Berti

Título: Lipopolissacarídeo no início do período pré-natal como modelo experimental de autismo e prejuízos dopaminérgicos estriatais

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Esta tese foi realizada no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com bolsa de doutorado concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo número 2008/53861-5) de 10/2008 a 07/2012, além de apoio financeiro do projeto temático FAPESP (número 2009/51886-3) e auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

Albert Einstein (1879-1955)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Martha Bernardi, simplesmente a responsável pela minha introdução ao mundo da pesquisa e entrada na USP. Ao longo desses anos, formamos uma excelente relação que superou os limites da relação aluno-orientador. Esse convívio me propiciou conhecimento e desenvolvimento, e, mais do que isso, ela foi a responsável por me apaixonar pela ciência. Obrigado pela confiança, e espero que nossa parceria continue para sempre.

À Gabriela, grande companheira de todas as horas. Uma das poucas mulheres dos dias de hoje que consegue ser ótima como esposa, dona de casa e também profissional, e além de tudo continua linda. Obrigado pela paciência. Ao seu lado a vida é mais bela.

Aos meus pais, Maria Carolina e José, exemplos raros de seres humanos bons e honestos, responsáveis pela minha excelente criação. Obrigado por sempre terem apoiado incondicionalmente todas as minhas decisões, mesmo aquelas não tão convencionais para os pais, como a de ser Biólogo. Graças à ótima educação provida por eles, pude ter condições de me desenvolver para alcançar meus sonhos, inclusive o de ser doutor formado pela USP.

Aos meus familiares, Zezo, Ana, Patrícia, Fabio, Leonardo, Gabizinha e Carolzinha, pelo apoio sempre que necessário e pelos ótimos momentos compartilhados. Eles fazem valer a expressão “nos momentos bons e ruins da vida, eles sempre estão ao seu lado”.

Aos melhores amigos do Homem – Thiago: Lex, Theo e Darwin, companheiros que estão sempre à disposição para ouvir e alegrar.

À FAPESP pelo apoio financeiro, obviamente de fundamental importância para o desenrolar deste projeto, fora da importância financeiro-psicológica para o aluno.

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto, que me acolheu em seu grupo de Neuroimunomodulação, permitindo conhecer e trabalhar com essa interessantíssima área interdisciplinar de estudo e pesquisa. Obrigado pela parceria e ensinamentos, fundamentais para a minha evolução profissional.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ – USP) e ao Departamento de Patologia (VPT), onde desenvolvi a grande maioria deste projeto. Locais com ótima infraestrutura, que me possibilitou desenvolver com tranquilidade minhas tarefas.

A todos os professores do VPT, pelos ensinamentos e convívio. Em especial a Profa. Dra. Maria L. Z. Dagli, por disponibilizar seu laboratório (Laboratório de Oncologia Experimental – VPT) e equipamentos para as técnicas de biologia molecular desenvolvidas neste projeto (PCR em tempo real), ao Prof. Dr. Luciano Freitas Felício e a Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa.

Aos professores do Instituto de Ciências Biológicas (ICB – USP) Dr. Luiz R. G. Britto do Laboratório de Neurobiologia Celular, Dra. Andrea S. Torráo do Laboratório de Comunicação Neuronal e Dra. Estela M. A. F. Bevilacqua do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, que disponibilizaram seus laboratórios e equipamentos para as técnicas de imunohistoquímica, *immunoblotting* e avaliação do tecido placentário, desenvolvidas neste projeto.

Ao Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal (VRA – FMVZ – USP), em especial ao Prof. Dr. Claudio Alvarenga e a Dra. Priscila Viau Furtado, pelas dosagens de corticosterona.

A todos os funcionários da FMVZ, pela ótima convivência, em especial aqueles do VPT, incluindo os responsáveis pelo biotério: Cláudia, Idalina, Rosiris, Nelson, Mauro e Luciana, pelo profissionalismo e cuidados dispensados aos animais utilizados nos experimentos. Também aos funcionários do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do VPT: Ricardo (Jiboia), Vagner, Herculano e Priscila, pelos auxílios nos experimentos. Bem como aos funcionários do Laboratório de Histopatologia do VPT: Luciano e Cláudio, pela confecção das lâminas estudadas neste projeto. Além das secretárias do VPT, da pós-graduação da FMVZ e da pós-graduação do VPT: Adriana, Milena, Cláudia, Daura e Cristina, pelo auxílio sempre que solicitado. E a todos os funcionários da biblioteca da FMVZ, pelo auxílio sempre que necessário.

Aos ratos, por meio dos quais se puderam obter os dados deste trabalho. Eles permitiram que a ciência pudesse avançar mais um degrau no conhecimento.

A todos os colegas pós-graduandos que contribuíram efetivamente com alguma prática experimental, ou em discussões que enriqueceram meus conhecimentos, em especial aqueles colaboradores coautores de trabalhos ligados a este projeto que já foram publicados: Gabriela Chaves-Kirsten, Lucas Chaible, Ana Cristina Silva, Daniel Martins, Mácio Trindade e Marina Taricano. Não posso esquecer-me de citar outros colegas que também contribuíram efetivamente com a minha formação teórica e prática neste doutorado, além da ótima convivência: Adriano, Alison, Daniel Cohn, Esther, Luciana Lippi, Moniquinha, Sayuri, Thaísa e Thiago Marinho. Estendo também o agradecimento a todos os outros colegas da pós-graduação do VPT e do grupo de Neuroimunomodulação, especialmente a Adriana Tiemi, Aline Melo, Ana Paula, Andréa, Beatriz, Camila, Carolina, Denise, Eduardo Hamasato, Eduardo Zarzana, Fernando, Gláucie, João, Luciana Cunha, Luciana Vismari, Milena, Poliana, Renato, Rodrigo Vieira, Thalita, Viviane e Wanderley.

A todos os parentes e amigos que tornam a minha vida mais agradável e a todos aqueles que, apesar de não terem sido mencionados individualmente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

KIRSTEN, T. B. **Lipopolissacarídeo no início do período pré-natal como modelo experimental de autismo e prejuízos dopaminérgicos estriatais.** [Early prenatal lipopolysaccharide as a rat model of autism and striatal dopaminergic impairments]. 2012. 195 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O transtorno do espectro autista atinge uma em cada 150 crianças. Sua etiologia ainda é desconhecida, apesar de fortes evidências de fatores genéticos e recentes achados de interferências ambientais, particularmente a ativação imune materna durante a gestação. Em nossos estudos prévios expusemos ratas Wistar no início da gestação ao lipopolissacarídeo (LPS), que mimetiza uma infecção bacteriana (100 µg/kg, intraperitoneal [i.p.], no dia gestacional [GD] 9,5) e observamos prejuízos no comportamento de brincar da prole masculina. Sabendo que esse teste é classicamente usado para avaliação de modelos animais de autismo e da ligação do autismo com fatores ambientais, propusemos que nosso modelo seria um modelo animal de autismo. Para avaliar essa possibilidade, foi objetivo do presente trabalho estudar se nosso modelo de LPS pré-natal (100 µg/kg, i.p., no GD 9,5) causaria os outros sintomas típicos de autistas: anormalidades na comunicação (avaliado pelo teste da vocalização ultrassônica), comportamentos repetitivos e inflexibilidade cognitiva (teste de alternância espontânea no labirinto em T), ausência de demonstração de medo em situações potencialmente perigosas (estímulo olfativo aversivo do odor de gato) e hiperatividade (atividade geral em campo aberto). Visto que alguns autistas apresentam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e cortisol, bem como neuroinflamação, foram quantificados os níveis de IL-1 β , TNF- α e corticosterona séricos, e estudado os astrócitos e micróglia do estriado e bulbo olfatório. Outro objetivo deste trabalho foi estudar os mecanismos centrais associados ao LPS pré-natal, especialmente o sistema dopaminérgico (expressão gênica e proteica de tirosina hidroxilase e receptores dopaminérgicos D1a e D2) do estriado e bulbo olfatório, baseado nos nossos achados prévios de redução de dopamina nessas regiões cerebrais. Também foram avaliados os níveis séricos de corticosterona, o desempenho reprodutivo e o tecido placentário nas mães expostas ao LPS durante a gestação. Por fim, sabendo que o autismo é mais prevalente em homens do que em mulheres, foram avaliadas também as fêmeas expostas pré-natalmente ao LPS: comportamento de brincar, interação social adulta e níveis séricos de corticosterona. A exposição pré-natal ao LPS prejudicou a comunicação, a cognição, a demonstração de medo em situações potencialmente perigosas, além de induzir comportamentos repetitivos/restritos e elevação dos níveis de IL-1 β na prole

masculina de ratas; as fêmeas não apresentaram os prejuízos observados nos machos. Esses achados sugerem fortemente que nosso modelo de LPS pré-natal induziu comportamentos do tipo autismo em ratos, corroborando com a hipótese dos fatores ambientais no autismo. Acrescenta de maneira inédita um modelo que mimetiza uma infecção bacteriana no início da gestação como indutor do autismo. Mais ainda, a redução da expressão proteica de tirosina hidroxilase estriatal causada pelo LPS pré-natal inclui a hipoatividade do sistema dopaminérgico estriatal como um possível aspecto para explicar o autismo. A elevação nos níveis de corticosterona, prejuízo no desempenho reprodutivo e danos no tecido placentário das ratas ajudaram no entendimento da gênese dos prejuízos na prole. O estabelecimento do modelo experimental de autismo com o LPS pré-natal significa um passo importante para o entendimento dessa desordem e pode auxiliar também na busca por eventuais tratamentos, baseados nas alterações neuroimunes encontradas.

Palavras-chave: Modelo animal. Efeitos tipo autismo. LPS. Gestação. Comportamento animal.

ABSTRACT

KIRSTEN, T. B. **Early prenatal lipopolysaccharide as a rat model of autism and striatal dopaminergic impairments.** [Lipopolissacarídeo no início do período pré-natal como modelo experimental de autismo e prejuízos dopaminérgicos estriatais]. 2012. 195 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

One child in about 150 children has autism spectrum disorder. Despite strong evidence of genetic factors and recent findings of environmental interferences, particularly maternal immune activation during pregnancy, autism etiology is still unknown. In our previous study, we exposed Wistar rats in the beginning of the gestation to lipopolysaccharide (LPS, 100 µg/kg, intraperitoneally [i.p.], on gestational day [GD] 9.5), which mimics a bacterial infection and observed impairments in the play behavior of male offspring. Knowing that play behavior is classically used to evaluate autism animal models and the link between autism and environmental factors, we proposed that our model would be an autism animal model. To evaluate this possibility, the aim of this study was to know whether our prenatal LPS model (100 µg/kg, i.p., on GD 9.5) causes other autism typical symptoms: communication abnormalities (evaluated by the ultrasonic vocalization test), repetitive behavior and cognitive inflexibility (T-maze spontaneous alternation test), absence of fear demonstration in potentially dangerous situations (aversive exposure to cat odor test) and hyperactivity (open field general activity). Because some autistic patients presents high levels of proinflammatory cytokines and cortisol as well as neuroinflammation, we quantified IL-1 β , TNF- α and corticosterone serum levels, and studied astrocytes and microglia of striatum and olfactory bulb. Another objective was to study the central mechanisms associated with prenatal LPS, particularly the dopaminergic system (gene and protein expression of tyrosine hydroxylase and dopamine D1a and D2 receptors) of striatum and olfactory bulb, based on our previous findings of reduced dopamine in these brain regions. We also evaluated the corticosterone serum levels, the reproductive performance and the placental tissue of mothers exposed to LPS during pregnancy. Finally, because autism is more prevalent in men than in women, we also evaluated females prenatally exposed to LPS: play behavior, social interaction and adult corticosterone serum levels. Prenatal LPS exposure impaired communication, cognition, fear demonstration of potentially dangerous situations, induced repetitive/restricted behaviors and elevated IL-1 β levels of male offspring; females did not present the impairments observed in males. These findings strongly suggest that our model of prenatal LPS induced autism like behaviors in rats, corroborating the hypothesis of environmental factors in autism. It adds an

unprecedented way a model that mimics a bacterial infection in early pregnancy as an inducer of autism. Moreover, the striatal tyrosine hydroxylase protein expression reduction caused by prenatal LPS includes hypoactivity of the striatal dopaminergic system as a possible aspect to explain autism. The increase in the corticosterone levels, impairment of reproductive performance and placental tissue injuries of dams helped in understanding the genesis of the offspring impairments. The importance of establishing an experimental model of autism with prenatal LPS is an extra step to better understand this disorder and may also help in the search for possible treatments, based on the observed neuroimmune changes.

Key words: Animal model. Autistic-like effects. LPS. Gestation. Animal behavior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Possíveis comportamentos de crianças autistas, segundo a Associação Americana de Autismo (<i>Autism Society of America</i> , adaptado de autismoinfantil.com.br).....	26
Figura 2 -	LPS da parede celular de bactérias gram-negativas (adaptado de BROOKS et al., 2000).....	33
Figura 3 -	Mecanismo de ação simplificado do LPS em um macrófago, culminando com a liberação de citocinas pró-inflamatórias (KIRSTEN, T. B., 2012).....	35
Figura 4 -	Lavado vaginal positivo de ratas contendo espermatozoides, observado ao microscópio óptico em aumento de (A) 20x e (B) 40x.....	49
Figura 5 -	Aparato utilizado para avaliação da vocalização ultrassônica, constituindo de microfone ultrassônico, gaiola de polipropileno onde cada filhote foi acondicionado e notebook para gravação e análise dos arquivos digitais.....	53
Figura 6 -	Aparato utilizado para o teste do estímulo olfativo aversivo, onde dois animais foram avaliados individualmente e simultaneamente em gaiolas-moradia separadas, contando com (T) um tecido impregnado com ou sem o odor de gato e (A) um abrigo no lado oposto.....	55
Figura 7 -	Arena de campo aberto utilizada para a observação da atividade geral individual dos ratos adultos por uma sessão de 5 minutos.....	57
Figura 8 -	Sistema para observação indireta da atividade geral em campo aberto, com mensuração automatizada (EthoVision®): (A) arena de campo aberto; (B) sistema computadorizado para rastreamento e análise dos dados; e (C) câmera para captação das imagens.....	58
Figura 9 -	Labirinto em T com barreiras que separam a área de partida e dois braços: (A) área de partida; (E) braço esquerdo; e (D) braço direito.....	60
Figura 10 -	Ilustração de um corte sagital de um encéfalo de rato esquematizando as diferentes regiões, incluindo o estriado (ou caudado putâmen – <i>caudate-putamen</i>) e o bulbo olfatório (<i>olfactory bulb</i>) que foram avaliados neste estudo (Figura retirada do site gensat.org).....	66
Figura 11 -	Ilustração do <i>pinning</i> , ou comportamento de brincar propriamente dito, realizado entre dois filhotes jovens (KIRSTEN, T. B., 2012).....	73
Figura 12 -	Delineamento dos experimentos realizados, desde a determinação do dia zero de gestação (GD 0) das ratas, passando pelo tratamento com LPS ou salina, experimentos nas gestantes, nascimento da prole no dia de vida pós-natal (PND) 1 e experimentos na prole jovem ou adulta, machos ou fêmeas, lembrando que cada experimento foi realizado com animais diferentes.....	76
Figura 13 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no número de vocalizações ultrassônicas da prole masculina infante de ratas no PND 11. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Teste <i>t</i> de Student). Os valores são representados como média ± EP. $n = 10$ para ambos os grupos.....	80

- Figura 14 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no tempo em contato com tecido impregnado com odor de gato (estímulo olfativo aversivo) na prole masculina adulta de ratas no PND 60. Neutro = animais naive expostos a um tecido sem odor de gato; SAL = salina pré-natal, expostos a um tecido com odor de gato; LPS = LPS pré-natal, expostos a um tecido com odor de gato. ** $p < 0,01$ comparado com o grupo neutro (ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey). Os valores são representados como média $\pm$ EP. $n = 8$ para ambos os grupos..... 82
- Figura 15 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na atividade geral em campo aberto da prole masculina adulta de ratas no PND 60 após desafio com LPS. SAL = salina pré-natal ($n = 9$), LPS = LPS pré-natal ($n = 9$), SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS ($n = 8$), LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS ($n = 8$). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ comparado com o grupo SAL; # $p < 0,05$ e ### $p < 0,0001$ comparado com o grupo LPS; \$ $p < 0,05$ e \$\$ $p < 0,01$ comparado com o grupo SAL+LPS (ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey). Os valores são representados como média $\pm$ EP..... 85
- Figura 16 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no número de acertos no teste de alternância espontânea no labirinto em T para avaliação da memória espacial e comportamento repetitivo/restrito na prole masculina adulta de ratas no PND 60-67 após desafio com LPS. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal, SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS, LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS. Barras pretas = acertos; Barras cinza = erros. * $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ## $p < 0,01$ comparado com o grupo LPS (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn). Os valores são representados como porcentagem de acertos e erros. $n = 8$ para ambos os grupos..... 88
- Figura 17 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis séricos da citocina pró-inflamatória IL-1 β avaliados por ELISA da prole masculina adulta de ratas no PND 60-67 após desafio com LPS. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal, SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS, LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS. * $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL+LPS (Teste t de Student). Os valores são representados como média $\pm$ EP. $n = 7$ para ambos os grupos..... 90
- Figura 18 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio da prole masculina adulta de ratas no PND 60-67 após desafio com LPS. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal, SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS, LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS. * $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL e # $p < 0,05$ comparado com o grupo LPS (ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey). Os valores são representados como média $\pm$ EP. $n = 10$ para ambos os grupos..... 92
- Figura 19 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na expressão proteica avaliada por imunohistoquímica do sistema dopaminérgico (TH = tirosina hidroxilase; D1a = receptor dopaminérgico D1a; e D2 = receptor dopaminérgico D2) e células gliais (GFAP = proteína glial fibrilar ácida, marcador de astrócito; e OX-42 = marcador de micróglia) no estriado da prole masculina adulta de ratas no PND 60. Imagens digitais de cortes coronais. Notar que não existem aparentes diferenças na expressão e na morfologia dessas proteínas entre os grupos..... 94

Figura 20 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na expressão proteica (média da razão da densidade óptica em relação à β-actina) avaliada por <i>immunoblotting</i> do sistema dopaminérgico (TH = tirosina hidroxilase; D1a = receptor dopaminérgico D1a; e D2 = receptor dopaminérgico D2) e células gliais (GFAP = proteína glial fibrilar ácida, marcador de astrócito; e OX-42 = marcador de micróglia) no estriado da prole masculina adulta de ratas no PND 60. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal. *** $p < 0,001$ comparado com o grupo SAL (Teste <i>t</i> de Student). Os valores são representados como média ± EP. $n = 6-8$ para ambos os grupos.....	97
Figura 21 -	Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio nas ratas expostas a esta endotoxina durante a gestação. Coleta do sangue 90 minutos após a exposição ao LPS ($n = 9$) ou a salina (SAL, $n = 8$). *** $p < 0,0001$ comparado com o grupo SAL (Teste <i>t</i> de Student). Os valores são representados como média ± EP.....	101
Figura 22 -	Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no desempenho reprodutivo das ratas expostas a esta endotoxina durante a gestação. Cirurgias realizadas no GD 16. SAL = grupo controle tratado com salina; LPS = grupo exposto ao LPS. * $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL (Teste U de Mann-Whitney). Os valores são representados como mediana e distribuição dos valores individuais do grupo. $n = 6$ para ambos os grupos.....	105
Figura 23 -	Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no tecido placentário das ratas expostas a esta endotoxina durante a gestação. Cirurgias realizadas no GD 16. Fotomicrografia do corte histológico do tecido placentário de ratas do grupo controle (SAL). HE; (A) 100x; (B, D e E) 200x; (C e F) 400x. pc: placa coriônica; ZL: zona labiríntica; ZJ: zona juncional; gl: células de glicogênio; g: células trofoblásticas gigantes; D: decídua; —: barreira materno-fetal; sm: sangue materno; *: hemácias maternas; cf: capilar fetal; t: camadas de células trofoblásticas; vm: vasos maternos; et: espongiotrofoblasto; ponta da seta: fagossomos.....	106
Figura 24 -	Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no tecido placentário das ratas expostas a esta endotoxina durante a gestação. Cirurgias realizadas no GD 16. Fotomicrografia do corte histológico da zona juncional do tecido placentário de ratas do grupo LPS. HE; (A) 100x; (C, E e G) 200x; (B, D, F e H) 400x. ZJ: zona juncional; L: labirinto; gl: células de glicogênio; g: células trofoblásticas gigantes; D: decídua; et: espongiotrofoblasto; ponta da seta: fagossomos; **: sangue materno extravasado; seta interrompida: infiltrado leucocitário; *: cistos de material amorfo.....	107
Figura 25 -	Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no tecido placentário das ratas expostas a esta endotoxina durante a gestação. Cirurgias realizadas no GD 16. Fotomicrografia do corte histológico da zona do labirinto do tecido placentário de ratas do grupo LPS. HE; (A) 100x; (C, E e G) 200x; (B, D, F e H) 400x. *: sangue materno extravasado; ponta da seta: leucócitos; —: barreira materno-fetal; sm: sangue materno; cf: capilar fetal; g: células trofoblásticas gigantes.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nas vocalizações ultrassônicas da prole masculina infante de ratas no PND 11. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal. Os valores são representados como média ± EP. <i>n</i> = 10 para ambos os grupos.....	80
Tabela 2 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) sob um estímulo olfativo aversivo na prole masculina adulta de ratas no PND 60. Neutro = animais naive expostos a um tecido sem odor de gato; SAL = salina pré-natal, expostos a um tecido com odor de gato; LPS = LPS pré-natal, expostos a um tecido com odor de gato. Os valores são representados como média ± EP. <i>n</i> = 8 para ambos os grupos.....	82
Tabela 3 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na atividade geral em campo aberto da prole masculina adulta de ratas no PND 60 após desafio com LPS. SAL = salina pré-natal (<i>n</i> = 9), LPS = LPS pré-natal (<i>n</i> = 9), SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS (<i>n</i> = 8), LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS (<i>n</i> = 8). Os valores são representados como média ± EP.....	84
Tabela 4 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na memória espacial e comportamento repetitivo/restrito avaliados no teste de alternância espontânea no labirinto em T na prole masculina adulta de ratas no PND 60-67 após desafio com LPS. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal, SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS, LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS. Os valores são representados como mediana (mínimo e máximo) para o escore e média ± EP para a frequência. <i>n</i> = 8 para ambos os grupos.....	87
Tabela 5 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α avaliados por ELISA da prole masculina adulta de ratas no PND 60-67 após desafio com LPS. SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS, LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS. Os valores são representados como média ± EP. <i>n</i> = 7 para ambos os grupos.....	90
Tabela 6 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio da prole masculina adulta de ratas no PND 60-67 após desafio com LPS. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal, SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS, LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS. Os valores são representados como média ± EP. <i>n</i> = 10 para ambos os grupos.	92
Tabela 7 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na expressão proteica (média da razão da densidade óptica em relação à β-actina) avaliada por <i>immunoblotting</i> do sistema dopaminérgico (TH = tirosina hidroxilase; D1a = receptor dopaminérgico D1a; e D2 = receptor dopaminérgico D2) e células gliais (GFAP = proteína glial fibrilar ácida, marcador de astrócito; e OX-42 = marcador de micrógliia) no estriado e bulbo olfatório da prole masculina adulta de ratas no PND 60. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal. Os valores são representados como média ± EP. <i>n</i> = 6-8 para ambos os grupos.....	96

Tabela 8 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na expressão gênica (razões normalizadas) avaliada por PCR em tempo real do sistema dopaminérgico (TH = tirosina hidroxilase; D1a = receptor dopaminérgico D1a; e D2 = receptor dopaminérgico D2) no estriado e bulbo olfatório da prole masculina adulta de ratas no PND 60. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal. Os valores são representados como média ± EP. <i>n</i> = 6-7 para ambos os grupos.....	99
Tabela 9 -	Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio nas ratas expostas a esta endotoxina durante a gestação. Coleta do sangue 90 minutos após a exposição ao LPS (<i>n</i> = 9) ou a salina (SAL, <i>n</i> = 8). Os valores são representados como média ± EP.....	101
Tabela 10 -	Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no desempenho reprodutivo das ratas expostas a esta endotoxina durante a gestação. Cirurgias realizadas no GD 16. SAL = grupo controle tratado com salina; LPS = grupo exposto ao LPS. Os valores são representados como mediana (mínimo e máximo). <i>n</i> = 6 para ambos os grupos.....	104
Tabela 11 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no comportamento de brincar da prole feminina jovem de ratas no PND 30. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal. Os valores são representados como média ± EP. <i>n</i> = 12 para ambos os grupos.....	109
Tabela 12 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na interação social da prole feminina adulta de ratas no PND 60-65. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal. Os valores são representados como média ± EP. <i>n</i> = 12 para ambos os grupos.....	110
Tabela 13 -	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio da prole feminina adulta de ratas no PND 60. Coleta do sangue 90 minutos após o desafio com LPS. SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS, LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS. Os valores são representados como média ± EP. <i>n</i> = 10 para ambos os grupos.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹²⁵ I-LPS	lipopolissacarídeo radiomarcado com iodo
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CL	corpos lúteos
COX	ciclooxigenase
DO	densidade óptica
DSM-IV	Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais IV
EDTA	ácido dissódico etilenodiaminotetracético
EP	erro padrão
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FV	fetos vivos
GABA	ácido gama-aminobutírico
GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GD	dia de gestação
GFAP	proteína glial fibrilar ácida
HE	hematoxilina-eosina
HPA	hipotálamo-pituitária-adrenal
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-1Ra	antagonista do receptor para IL-1
IL-6	interleucina 6
IM	implantações
i.p.	intraperitoneal
I ¹²⁵	iodo radioativo
LBP	proteína ligadora de lipopolissacarídeo
LPS	lipopolissacarídeo
LPS+LPS	LPS pré-natal e desafio com LPS na idade adulta
NaCl	cloreto de sódio
OX-42	marcador de micróglia
PB	tampão fosfato
PBS	salina tamponada

PCR	reação em cadeia da polimerase
PMSF	<i>ammonium persulfate</i>
PND	dia de vida pós natal
polyI:C	ácido polirriboinosínico-polirribocitidílico
SAL	salina
SAL+LPS	salina pré-natal e desafio com LPS na idade adulta
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SNC	sistema nervoso central
SNC	substancia negra compacta
TEA	transtorno do espectro autista
TH	tirosina hidroxilase
TLR	receptor semelhante ao Toll
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TTBS	salina tamponada contendo Tween 20
USP	Universidade de São Paulo
VPT	Departamento de Patologia
VRA	Departamento de Reprodução Animal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Autismo.....	25
1.2 Interferências ambientais no cérebro em desenvolvimento.....	29
1.3 Modelos animais para o estudo de distúrbios neuropsiquiátricos.....	30
1.4 Lipopolissacarídeo (LPS).....	32
1.5 Mecanismo de ação do LPS.....	34
1.6 Citocinas.....	37
1.7 Mecanismo de ação do LPS na infecção pré-natal.....	39
1.8 Justificativa.....	40
2 OBJETIVOS.....	44
2.1 Objetivo geral.....	44
2.2 Objetivos específicos.....	44
2.2.1 <i>Bloco I: LPS pré-natal como modelo experimental de autismo na prole masculina de ratas.....</i>	<i>44</i>
2.2.2 <i>Bloco II: Mecanismos centrais associados ao LPS pré-natal na prole masculina de ratas.....</i>	<i>45</i>
2.2.3 <i>Bloco III: Alterações maternas induzidas pelo LPS pré-natal.....</i>	<i>45</i>
2.2.4 <i>Bloco IV: Efeitos induzidos pelo LPS pré-natal na prole feminina de ratas.....</i>	<i>46</i>
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1 Animais.....	48
3.2 Acasalamento.....	48
3.3 Drogas e soluções.....	49
3.4 Tratamento.....	50
3.5 Padronização da ninhada para os testes pós-natais.....	50
3.6 Bloco I: LPS pré-natal como modelo experimental de autismo na prole masculina de ratas.....	51
3.6.1 <i>Avaliação da comunicação da prole masculina infante de ratas expostas ao LPS pré-natal por meio da vocalização ultrassônica.....</i>	<i>52</i>
3.6.2 <i>Avaliação da resposta da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal frente a um estímulo olfativo aversivo.....</i>	<i>53</i>
3.6.3 <i>Avaliação da atividade geral em campo aberto da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS.....</i>	<i>56</i>
3.6.4 <i>Avaliação da memória espacial e comportamento repetitivo/restrito no teste de alternância espontânea no labirinto em T da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS.....</i>	<i>59</i>
3.6.5 <i>Quantificação de citocinas pró-inflamatórias séricas avaliadas por ELISA da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS.....</i>	<i>62</i>

3.6.6 Dosagem dos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS.....	63
3.7 Bloco II: Mecanismos centrais associados ao LPS pré-natal na prole masculina de ratas.....	64
3.7.1 Avaliação da expressão proteica por imunohistoquímica do sistema dopaminérgico e células gliais no estriado da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal.....	65
3.7.2 Avaliação da expressão proteica por immunoblotting do sistema dopaminérgico e células gliais no estriado e bulbo olfatório da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal.....	66
3.7.3 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real do sistema dopaminérgico no estriado e bulbo olfatório da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal.....	68
3.8 Bloco III: Alterações maternas induzidas pelo LPS pré-natal.....	69
3.8.1 Dosagem dos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio de ratas expostas ao LPS durante a gestação.....	70
3.8.2 Desempenho reprodutivo e avaliação do tecido placentário de ratas expostas ao LPS durante a gestação.....	70
3.9 Bloco IV: Efeitos induzidos pelo LPS pré-natal na prole feminina de ratas.....	71
3.9.1 Avaliação do comportamento de brincar da prole feminina jovem de ratas expostas ao LPS pré-natal.....	71
3.9.2 Avaliação da interação social da prole feminina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal.....	74
3.9.3 Dosagem dos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio da prole feminina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS.....	74
3.10 Delineamento experimental.....	75
3.11 Análise estatística.....	77
4 RESULTADOS.....	79
4.1 Bloco I: LPS pré-natal como modelo experimental de autismo na prole masculina de ratas.....	79
4.1.1 Avaliação da comunicação da prole masculina infante de ratas expostas ao LPS pré-natal por meio da vocalização ultrassônica.....	79
4.1.2 Avaliação da resposta da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal frente a um estímulo olfativo aversivo.....	81
4.1.3 Avaliação da atividade geral em campo aberto da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS.....	83
4.1.4 Avaliação da memória espacial e comportamento repetitivo/restrito no teste de alternância espontânea no labirinto em T da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS.....	86
4.1.5 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias séricas avaliadas por ELISA da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS.....	89

4.1.6 Dosagem dos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS.....	91
4.2 Bloco II: Mecanismos centrais associados ao LPS pré-natal na prole masculina de ratas.....	93
4.2.1 Avaliação da expressão proteica por imunohistoquímica do sistema dopaminérgico e células gliais no estriado da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal.....	93
4.2.2 Avaliação da expressão proteica por imunoblotting do sistema dopaminérgico e células gliais no estriado e bulbo olfatório da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal.....	95
4.2.3 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real do sistema dopaminérgico no estriado e bulbo olfatório da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal.....	98
4.3 Bloco III: Alterações maternas induzidas pelo LPS pré-natal.....	100
4.3.1 Dosagem dos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio de ratas expostas ao LPS durante a gestação.....	100
4.3.2 Desempenho reprodutivo e avaliação do tecido placentário de ratas expostas ao LPS durante a gestação.....	102
4.4 Bloco IV: Efeitos induzidos pelo LPS pré-natal na prole feminina de ratas.....	109
4.4.1 Avaliação do comportamento de brincar da prole feminina jovem de ratas expostas ao LPS pré-natal.....	109
4.4.2 Avaliação da interação social da prole feminina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal.....	110
4.4.3 Dosagem dos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio da prole feminina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS.....	111
5 DISCUSSÃO.....	113
6 CONCLUSÕES.....	129
REFERÊNCIAS.....	132
APÊNDICES.....	151

Introdução

5

1 INTRODUÇÃO

1.1 Autismo

O autismo é um distúrbio do desenvolvimento que foi descrito pela primeira vez há relativamente pouco tempo atrás; em 1943, por Leo Kanner (KANNER, 1943). Existe uma ampla gama de sintomas usados para o diagnóstico, incluindo deficiências sociais, anormalidades na comunicação, comportamentos repetitivos e inflexibilidade cognitiva (LANDRIGAN, 2010). A figura 1 ilustra os possíveis comportamentos de crianças autistas, segundo a Associação Americana de Autismo (*Autism Society of America*). Para detalhes dos sintomas, consultar as definições do Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais (*Diagnostical and Statistical Manual for Mental Disorder*, ou DSM-IV), de autoria da Associação dos Psiquiatras Americanos (DSM-IV, 1994). A grande variabilidade nas manifestações sintomáticas que ocorrem em autistas levou à criação do termo “transtorno do espectro autista” (TEA), ou “transtornos invasivos do desenvolvimento”, que incluem ainda a síndrome de Asperger, o transtorno invasivo do desenvolvimento sem outra especificação, o transtorno desintegrativo e o transtorno de Rett (DSM-IV, 1994).

A detecção do distúrbio pode ocorrer geralmente antes dos três anos de idade, sendo alguns sintomas perceptíveis já aos seis meses de idade (FOMBONNE, 2005). Com relação à prevalência entre os sexos, o autismo é mais prevalente em homens, com uma razão de prevalência homem:mulher de 4,2:1 (FOMBONNE, 2009).

Desde sua identificação, o número de pacientes diagnosticados com autismo vem crescendo, sendo que, por exemplo, antes de 1980 a prevalência era de 4/10.000, e dados atuais reportam 60 – 90/10.000, ou seja, acredita-se que uma em cada 150 crianças apresenta o TEA (FOMBONNE, 2009; THEOHARIDES; KEMPURAJ; REDWOOD, 2009). Aliás, alguns estudos têm reportado proporções de prevalência ainda maiores, isto é, duas ou três vezes maiores (BAIRD et al., 2006; KAWAMURA; TAKAHASHI; ISHII, 2008). É importante destacar ainda que este distúrbio ocupa o terceiro lugar entre os distúrbios do desenvolvimento, na frente das malformações congênitas e da síndrome de Down (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004).

Figura 1 - Possíveis comportamentos de crianças autistas, segundo a Associação Americana de Autismo (*Autism Society of America*)

Fonte: adaptado de autismoinfantil.com.br

Somado ao fato de ser um distúrbio de alta prevalência, até hoje não existe um tratamento eficaz para o autismo, bem como não existe consenso para o tipo de medicação a se receitar (MCPHEETERS et al., 2011). Existem pouquíssimos medicamentos aprovados pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) para o uso nestes pacientes, que ainda assim apresentam eficácia limitada, tratando apenas parte dos sintomas e desencadeando diversos

efeitos colaterais. Deles, por exemplo, cabe destacar a risperidona, um antipsicótico atípico, usado para o tratamento de comportamentos repetitivos, que pode acarretar em sedação e aumento do ganho de peso nas crianças (THEOHARIDES; KEMPURAJ; REDWOOD, 2009; WINK et al., 2010; MCPHEETERS et al., 2011).

O provável motivo de não existirem medicamentos eficazes deve-se ao fato de até hoje não se conhecer a exata etiologia do autismo. Pesquisas apontam para anormalidades em uma ampla gama de monoaminas e neuropeptídeos, inúmeros possíveis *loci* de suscetibilidade genética e intrigantes descobertas imunológicas (WINK et al., 2010). Porém, todos esses achados ainda estão no campo especulativo. Dessa forma, há vários indícios de ser um distúrbio de causas multifatoriais.

Existe um grande número de estudos que relacionam o autismo a determinadas interferências genéticas. Sabe-se do risco aumentado de recorrência de autismo de aproximadamente 3 a 8% em famílias com uma criança autista (SHAO et al., 2002). A porcentagem de concordância para o diagnóstico de autismo em gêmeos monozigóticos é de pelo menos 60% se forem usados critérios estritos para autismo (DSM-IV, 1994), de 71% para o TEA e de até 92% com um espectro mais amplo (FOLSTEIN; PIVEN, 1991; GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004). Vários cromossomos e genes têm sido correlacionados com sua expressão fenotípica. Por exemplo, estudos em todo o genoma têm encontrado os sinais positivos de correlação nos cromossomos 2, 7, 15, 1 e 17 (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004; LANDRIGAN, 2010). Além disso, o modelo genético atual considera que a interação de 10-100 genes de pequeno efeito deve gerar a expressão fenotípica do autismo (MUHLE; TRENTACOSTE; RAPIN, 2004; JAMES, 2008). Entretanto, muitos pacientes autistas não exibem alterações nesses cromossomos e genes, e esses achados não foram replicados em outros estudos experimentais. Esses resultados conflitantes sugerem que alterações genéticas não explicam totalmente o autismo.

Além da proposta de base genética para o autismo, fatores ambientais como neuroinflamação, presença de estresse oxidativo, disfunção mitocondrial (poluição do ar, metais pesados, etc), desordens bioquímicas, fatores da dieta materna, contaminantes nos alimentos e infecções pré-natais virais foram apontados como capazes de prejudicar o cérebro em desenvolvimento, levando a desordens neuropsiquiátricas (WING; POTTER, 2002; LARSSON et al., 2005; BOKSA, 2010; HERBERT, 2010; BAMBINI-JUNIOR et al., 2011). Particularmente, a resposta inflamatória fetal a infecções intrauterinas parece contribuir para injúrias no cérebro de neonatos e na sua subsequente incapacidade neurológica (MEYER;

FELDON; DAMMANN, 2011). Nesse sentido, estudos epidemiológicos indicam uma associação entre a presença de infecção materna durante a gestação e o risco aumentado de ocorrência de desordens no sistema nervoso central (SNC) da prole, incluindo-se aqui esquizofrenia, autismo e paralisia cerebral (MEYER; FELDON; FATEMI, 2009; BOKSA, 2010). Assim, fatores ambientais devem desempenhar papel importante no início e estabelecimento dos sintomas autistas (MEYER; FELDON; FATEMI, 2009).

A esse respeito, existe um crescente número de publicações que relacionam alterações imunes, especialmente durante a gestação, ao autismo. A exposição pré-natal/neonatal a inúmeros patógenos, incluindo rubéola, sarampo e citomegalovírus tem sido implicada na etiologia do autismo, sugerindo que o risco associado da infecção ao autismo não deve ser específica a um patógeno (MEYER; FELDON; DAMMANN, 2011). Essa hipótese é apoiada por estudos em hospitais que sugerem que a exposição materna a diversas infecções virais e bacterianas aumentam significativamente o risco de desenvolvimento do transtorno do espectro autista em crianças, efeito que parece não estar relacionado à hospitalização *per se* (ATLADOTTIR et al., 2010). Assim, a neuroinflamação fetal aguda, associada com seus efeitos nos processos do desenvolvimento encefálico iniciais deve facilitar o desenvolvimento de fenótipos psicopatológicos e neuropatológicos do autismo (MEYER; FELDON; DAMMANN, 2011).

Estudos com grupos de pacientes autistas reportam aumento dos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no soro e líquido cerebrospinal e maior concentração de monócitos circulantes, comparado aos dados de pessoas não diagnosticadas com autismo (SWEETEN; POSEY; MCDUGLE, 2003; CHEZ et al., 2007). Além disso, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, ativação da micróglia e astrócitos e neuroinflamação foram encontrados em algumas regiões cerebrais como cerebelo, córtex frontal e substância branca de alguns pacientes autistas (PARDO; VARGAS; ZIMMERMAN, 2005; VARGAS et al., 2005). Mais ainda, outros estudos constataram que citocinas apresentam-se altamente elevadas em diversas regiões cerebrais e no líquido cefalorraquidiano de autistas entre 4 e 45 anos de idade (PARDO; VARGAS; ZIMMERMAN, 2005; DEVERMAN; PATTERSON, 2009). É possível que a ativação microglial presente no cérebro de autistas possa refletir no desenvolvimento anormal das vias fetais em resposta a fatores genéticos ou ambientais, como insultos intrauterinos, porém, ainda não se sabe se um desequilíbrio de uma citocina embrionária desencadeia tais desregulações

imunes no cérebro adulto e como esse estado imune alterado é estabelecido (PARDO; VARGAS; ZIMMERMAN, 2005).

Pacientes autistas podem também apresentar maior atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), uma vez que foi encontrada maior concentração de cortisol na saliva de algumas crianças autistas (JANSEN et al., 2003) e níveis elevados de hormônio adrenocorticotrópico em adultos com a síndrome de Asperger (TANI et al., 2005).

Considerar processos infecciosos pré-natais como possíveis indutores do autismo, sem ignorar o claro aspecto genético que ocorre em muitos casos, ajuda a entender o motivo da alta incidência de casos diagnosticados, já que qualquer indivíduo está constantemente exposto a infecções ao longo da vida, especialmente as gestantes, que apresentam modificações temporárias em seus sistemas imunológicos considerados por muitos como uma imunossupressão, e, portanto, são mais suscetíveis a infecções (WEINBERG, 1984; SARGENT, 1993). Aliás, a possibilidade de processos infecciosos perinatais poderem ser responsáveis por desordens neuropsiquiátricas como o autismo é um assunto que ganha muito espaço nas publicações recentes, como diversos achados tanto por meio de levantamentos epidemiológicos ou de estudos em modelos animais. Alguns exemplos foram publicados pelos grupos de Meyer, Patterson e Boksa (MEYER; FELDON; FATEMI, 2009; PATTERSON, 2009; BOKSA, 2010; MEYER; FELDON; DAMMANN, 2011).

1.2 Interferências ambientais no cérebro em desenvolvimento

O cérebro em desenvolvimento é susceptível a interferências ambientais que podem resultar em danos em longo prazo (MEYER et al., 2008). Pelo fato dessas interferências ambientais poderem muitas vezes ativar células do sistema imune secretando mediadores imunológicos, como as citocinas, recentemente, muitos trabalhos focam nas conexões entre o sistema imune e sistema nervoso, ou seja, na neuroimunomodulação, para entender a gênese dessas alterações (PONZIO et al., 2007; TANG; HO, 2007).

Dentre os diversos fatores ambientais supracitados, podem-se destacar as infecções pré-natais bacterianas e virais (BOKSA, 2010). Essas infecções maternas podem induzir inúmeros danos neurológicos e comportamentais em humanos e outros mamíferos, os quais podem perdurar por toda a vida do indivíduo (GOLAN et al., 2005).

Todos os tipos celulares neurais e não neurais que fazem parte do SNC em desenvolvimento, como micróglia e células endoteliais, usam citocinas para sinalizações parácrinas e autócrinas, e, pelo fato de muitas dessas mesmas citocinas também servirem como moduladores imunes, processos de desenvolvimento normais mediados por citocinas podem ser susceptíveis a distúrbios por desregulação imune, como, por exemplo, a partir de infecções maternas (DEVERMAN; PATTERSON, 2009). As citocinas poderiam ser diretamente produzidas no cérebro fetal, ou acessar o SNC atravessando a barreira hematoencefálica imatura. Essas citocinas podem alterar o desenvolvimento do cérebro (MUNOZ-FERNANDEZ; FRESNO, 1998).

Durante a gestação, a exposição a agentes infecciosos pode causar inúmeros problemas tanto no animal prenhe como em sua prole, podendo esses danos ser irreversíveis. Incluem-se dentre eles: inibição da implantação do blastócito, partos prematuros, necrose placentária, aborto espontâneo, natimortos, restrição de crescimento intrauterino, redução da chegada de oxigênio e nutrientes para o feto, danos nos órgãos fetais (sistema hematopoiético, adrenais, coração, cérebro, pulmões, pele e possivelmente outros), retardo no desenvolvimento do esqueleto, retardo mental, desordens neuropsiquiátricas (como esquizofrenia e autismo), dentre outros (COLLINS et al., 1994; DANTZER, 2005; GOLAN et al., 2005; HARJU et al., 2005; ASHDOWN et al., 2006; BROWN, 2006; HAVA et al., 2006; WANG et al., 2006; XU et al., 2006; FORTIER; LUHESHI; BOKSA, 2007; ROMERO, R. et al., 2007).

1.3 Modelos animais para o estudo de desordens neuropsiquiátricas

Atualmente existe uma ampla gama de modelos experimentais propostos para o estudo de desordens neuropsiquiátricas, incluindo o estudo do autismo. Para uma revisão completa, ler Bernardi et al. (2012).

As principais substâncias administradas para mimetizar infecções perinatais ligadas a desordens neuropsiquiátricas são o ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico (polyI:C, um análogo sintético de RNA viral) e o vírus influenza humano, ambos para mimetizar infecções virais, e o lipopolissacarídeo (LPS), quando o intuito é mimetizar uma infecção bacteriana, (MEYER; FELDON; FATEMI, 2009). As principais vias de

administração são a intraperitoneal (i.p.), intravenosa, subcutânea e intranasal. O número de administrações durante a gestação, o período da gestação e a dose desses agentes infecciosos precisam sempre ser levados em conta, pois podem resultar em achados bastante heterogêneos (BOKSA, 2010).

Citando alguns exemplos, um estudo interessante avaliou experimentalmente um sintoma típico de autistas, o prejuízo nas interações sociais das crianças, em um modelo animal por meio da observação do comportamento de brincar. Ratos foram tratados neonatalmente com o vírus Borna e apresentaram diminuição do comportamento de brincar, além de lesões cerebelares, discutidas como sintomas tipo autismo (PLETNIKOV et al., 1999).

O comportamento repetitivo e estereotipado, que também é presente em pacientes autistas, foi experimentalmente avaliado por meio da investigação da tarefa exploratória na prancha com furos (*hole-board*) em camundongos em meio a pistas olfativas (MOY et al., 2008a). Neste caso, camundongos com expressão reduzida do gene *Grin1*, que leva a hipofunção do receptor NMDA, apresentaram comportamentos repetitivos, com menor interferência de pistas olfativas, comparados aos seus controles. Esses achados apontam para resistência a mudanças e interesses restritos, similar ao que ocorre em autistas.

Outro exemplo interessante, agora utilizando medicamentos, é da administração do ácido valpróico no meio da gestação de ratos, antes do fechamento do tubo neural. O medicamento resulta em anormalidades similares ao autismo, como menor número de células de Purkinje no *vermis* cerebelar e redução dos hemisférios cerebrais (INGRAM et al., 2000). Tal modelo de exposição poderia ser resultado da administração de medicação anticonvulsivante em mães gestantes.

Achados epidemiológicos e experimentais demonstram que infecções associadas a eventos imunológicos nos estágios fetais iniciais/medianos (por exemplo, no dia gestacional [GD] 8–10 em ratos e camundongos) resultam em grande impacto no desenvolvimento cerebral, em relação a infecções de ocorrência em estágios mais tardios da gestação. A ativação imune materna durante a gestação inicial/mediana pode interferir com a proliferação celular, com a diferenciação, migração e seleção de alvos e com a maturação sináptica, eventualmente desencadeando múltiplas anormalidades no encéfalo e no comportamento dos adultos (SHI et al., 2003; MEYER et al., 2006b; SAMUELSSON et al., 2006; MEYER; YEE; FELDON, 2007).

Quando da comparação cronológica dos modelos animais com o ser humano, o desenvolvimento neurológico não ocorre na mesma proporção. Nos ratos e em camundongos, principais animais empregados na pesquisa, o período gestacional completo corresponde apenas ao primeiro e segundo trimestre da gestação humana (CLANCY; DARLINGTON; FINLAY, 2001; CLANCY et al., 2007). Nesses roedores, o terceiro trimestre da gestação humana corresponde ao início da vida *ex utero*, na primeira semana pós-natal (MEYER; FELDON; FATEMI, 2009). Mais especificamente, o desenvolvimento fetal em geral ocorre dois dias depois nos ratos, comparados aos camundongos (MEYER; FELDON; FATEMI, 2009). Isso explica o motivo de muitos estudos incluírem infecções neonatais nos roedores, mimetizando infecções no final da gestação de humanos, como, por exemplo, nos experimentos de Pletnikov et al. (1999) e Spencer et al. (2007) que tratam os filhotes respectivamente nas primeiras 24 horas e 3, 7 ou 14 dias após o nascimento dos ratos.

Com o intuito de mimetizar uma infecção bacteriana pré-natal para o estudo de comportamentos do tipo autista, o presente trabalho expôs ratas gestantes ao LPS. A seguir, será explicado com mais detalhes o que é, e qual é o mecanismo de ação do LPS.

1.4 Lipopolissacarídeo (LPS)

O LPS é uma endotoxina originária da parede celular de bactérias gram-negativas. Consiste num lipídio complexo, denominado lipídio A, ao qual está ligado um polissacarídeo constituído de um núcleo (ou *core*) e de uma série terminal de unidades repetidas (Figura 2). O lipídio A consiste em unidades dissacarídicas de glicosamina fosforilada as quais estão ligadas a vários ácidos graxos de cadeia longa (podendo variar de acordo com a espécie bacteriana). O núcleo do polissacarídeo é semelhante em todas as espécies gram-negativas que possuem LPS, todavia, cada espécie contém uma unidade de repetição particular. Em geral, as unidades de repetição consistem em trissacarídeos lineares ou em tetra ou pentassacarídeos ramificados (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

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

Figura 2 - LPS da parede celular de bactérias gram-negativas

Fonte: adaptado de BROOKS et al., 2000

O LPS é sintetizado na membrana citoplasmática e transportado para sua posição exterior final. É ligado à superfície celular, liberado apenas quando as células são lisadas. Quando o LPS é clivado em lipídio A e em polissacarídeo, toda a interação imune está associada ao lipídio A. A especificidade antigênica é conferida pelas unidades terminais de repetição, que circundam a célula, formando uma camada de polissacarídeos hidrofílicos (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

A presença do LPS é necessária para a função de muitas proteínas da membrana externa das bactérias (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000). Porém, o LPS pode ser extremamente tóxico para animais. Administrações em doses menores que 1 nM já são

capazes de ativar o sistema imune do animal (ADEREM; ULEVITCH, 2000). Os efeitos fisiopatológicos do LPS são semelhantes, independente de sua origem bacteriana (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

Dentro da área médica e veterinária, o LPS é muito utilizado nas mais diferentes linhas de pesquisa, pelo seu efeito de estímulo do sistema imunológico. É muito empregado em animais de laboratório, como roedores, por exemplo. Comercialmente, para estudos toxicológicos, neuroimunológicos, dentre outros, uma das principais fontes de LPS é a partir da bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, através de um processo de extração fenólica (MIMS et al., 1999).

1.5 Mecanismo de ação do LPS

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

Tomando com exemplo o mecanismo de ação por meio do macrófago, inicialmente, o LPS que se encontra no plasma liga-se a uma proteína de fase aguda do hospedeiro, o LBP (proteína ligadora de LPS, ou *lipopolysaccharide binding protein*), produzida no fígado do animal. A partir deste passo, é formado um complexo chamado de LPS:LBP. O complexo transfere o LPS para a proteína de membrana periférica CD14 na superfície dos macrófagos, iniciando a ativação celular (FENTON; GOLENBOCK, 1998; ADEREM; ULEVITCH, 2000; MIYAKE, 2003; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). A figura 3 ilustra o mecanismo de ação simplificado do LPS no macrófago.

O novo complexo formado, chamado de LPS:CD14, ativa a sinalização do receptor semelhante ao Toll (ou *toll-like receptor*, TLR)-4, ao qual é complexada à proteína MD-2. Neste momento é iniciada a geração do sinal transmembranar para o núcleo. Dentro do macrófago ocorre uma série de reações em cascata, incluindo a atuação de MyD88, IRAK, TRAF6, TAK-1, quinase I κ B, AP-1, dentre outras (algumas ainda não elucidadas), até a ativação do fator de transcrição NF- κ B, que ativa os genes que codificam as proteínas

envolvidas na defesa contra a infecção, que são as citocinas pró-inflamatórias (ADEREM; ULEVITCH, 2000; HARJU et al., 2005; ROMERO R. et al., 2007; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

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

O LPS é capaz de ativar principalmente a resposta imune inata (inespecífica) com a participação dos macrófagos. Atua também na resposta imune adquirida (ou adaptativa), referente a respostas de linfócitos que reconhecem antígenos microbianos específicos (com atuação dos TLR-4, na ativação de membros da família B7, que ativam células T *naive*) (ADEREM; ULEVITCH, 2000; LEVITON; DAMMANN; DURUM, 2005).

Figura 3 - Mecanismo de ação simplificado do LPS em um macrófago, culminando com a liberação de citocinas pró-inflamatórias

Fonte: KIRSTEN, T. B., 2012

Em condições normais, o LPS e as citocinas não são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica em quantidades significantes (ASHDOWN et al., 2006; DUNN, 2006).

Apesar disso, as citocinas liberadas por meio do LPS podem atuar no SNC do animal, onde interferem com sua homeostasia. As vias pelas quais as citocinas modulam a ação do SNC são:

- Através do nervo vago (que é a principal via aferente da cavidade abdominal para o cérebro): as citocinas liberadas podem entrar em contato com terminações de ramificações vagais periféricas, as quais possuem receptores para citocinas. A ativação desses receptores inicia a transmissão de um impulso nervoso pelo nervo vago aferente até sua ligação no encéfalo (no núcleo vagal). A importância dessa via é demonstrada por meio da vagotomia em roedores, e posterior injeção i.p. de IL-1, resultando na ausência do comportamento doentio nestes animais (DANTZER et al., 1998).
- Outra via envolve os órgãos circunventriculares – regiões desprovidas da barreira hematoencefálica: as citocinas liberadas chegam até a circulação sanguínea e assim acessam o encéfalo do animal, onde são barradas pela barreira hematoencefálica. Para adentrar o cérebro, elas acessam os órgãos circunventriculares. É possível confirmar a importância desta via, pois são detectados níveis elevados de certas citocinas pró-inflamatórias após infecção nos órgãos circunventriculares como a área postrema, eminência mediana e órgão vascular da lâmina terminal, comparados a outras áreas do cérebro (DUNN, 2006).
- Atuam ainda a partir do contato com células endoteliais do organismo: o LPS e as citocinas, em contato com os receptores das células endoteliais, induzem a ativação da enzima ciclooxigenase (COX), iniciando uma resposta no organismo, que leva à produção de eicosanóides (mediadores inflamatórios de origem lipídica), como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Esses eicosanóides têm propriedades físico-químicas que os possibilitam, via corrente sanguínea, acessar o cérebro, atravessando a barreira hematoencefálica, podendo assim induzir processos patológicos. Para mostrar a relevância desta via, trabalhos utilizam inibidores de eicosanóides, como por exemplo, inibidores da enzima COX-2, resultando na supressão do

comportamento doentio (CALDER, 2004; SALUK-JUSZCZAK; WACHOWICZ, 2005; DUNN, 2006; ROCHE et al., 2006; XU et al., 2006).

- Outras vias também podem contribuir para a atuação das citocinas no cérebro, como quando as citocinas cruzam a barreira hematoencefálica usando sistemas de captura específicos, porém, especialistas consideram a capacidade desses sistemas relativamente baixa (DUNN, 2006).
- Finalmente, o LPS é ainda capaz de produzir a enzima óxido nítrico sintase, que leva a produção do óxido nítrico, que é um importante mediador inflamatório, com ação vasodilatadora, podendo agir também no SNC (ROCHE et al., 2006; MURATORE et al., 2009).

Provavelmente, esses distintos mecanismos atuam simultaneamente, de forma integrada, quando da liberação de citocinas (DUNN, 2006).

Diversas regiões do cérebro expressam receptores para diversas citocinas (incluindo IL-1 β , TNF- α e IL-6) tanto na glia quanto nos neurônios (AVITSUR; YIRMIYA, 1999). Aventa-se que a micróglia em contato com as citocinas liberadas pelo LPS, estimula a produção de novas citocinas no próprio cérebro, potencializando o seu efeito. Neste sentido, a micróglia é considerada um análogo dos macrófagos e “órgão imune” do cérebro, com função de combater infecções e a inflamação (LENT, 2001; MEYER et al., 2005; HAVA et al., 2006; XU et al., 2006).

1.6 Citocinas

Normalmente, as citocinas atuam no organismo a fim de combater diversos patógenos. No sistema imune elas reconhecem partículas invasoras, bem como participam de respostas adaptativas ou reações homeostáticas (AVITSUR; YIRMIYA, 1999; ADEREM; ULEVITCH, 2000). Dentre outras funções, as citocinas pró-inflamatórias funcionam como sinalizadores moleculares do sistema imune para informar o cérebro sobre inflamação periférica (PAVLOV; TRACEY, 2004).

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

liberação excessiva de mediadores pró-inflamatórios, que desencadeiam respostas exacerbadas, tornando-se prejudiciais, levando à inflamação sistêmica associada com o desenvolvimento de sérias complicações, podendo até mesmo levar ao choque séptico e morte do indivíduo (PAVLOV; TRACEY, 2004).

No SNC as citocinas podem modular neurotransmissores centrais como dopamina, serotonina, noradrenalina, ácido gama-aminobutírico (GABA), acetilcolina, neuropeptídeos, dentre outros. Atuam ainda na diferenciação e crescimento neuronal, na migração dos neurônios para seus alvos e na modificação da plasticidade sináptica. Portanto, em níveis fisiológicos, as citocinas desempenham importantes papéis no cérebro, como, por exemplo, na neurogênese, neuromodulação, na memória e no sono (LORTON et al., 2006; MCAFOOSE; BAUNE, 2009).

Porém, as citocinas podem causar morte celular durante o desenvolvimento cerebral (DANTZER, 2005; GOLAN et al., 2005; DUNN, 2006; HAVA et al., 2006). As citocinas podem também ativar o eixo HPA com a liberação do fator liberador de corticotrofina do hipotálamo, que secreta o hormônio adrenocorticotrópico da glândula pituitária, resultando em aumento de glicocorticóides na corrente sanguínea periférica. Esses glicocorticóides têm função básica de frear a ativação do sistema imune. Em níveis elevados no SNC e em exposições crônicas são prejudiciais ao indivíduo, sendo conhecido como o hormônio do estresse, podendo causar danos, como por exemplo, a morte de neurônios (SAPOLSKY, 2000).

Além disso, as citocinas podem inibir o eixo hipotálamo-pituitária-gonadal, por reduzir a secreção de hormônios sexuais (hormônio gonadotrófico, hormônio luteinizante, hormônio folículo estimulante e esteróides ovarianos), interferindo na modulação do comportamento reprodutivo (AVITSUR; POLLAK; YIRMIYA, 1997; MEYER et al., 2005).

Em resposta a infecções periféricas, células imunes inatas produzem citocinas pró-inflamatórias que agem no cérebro produzindo uma série de alterações comportamentais que se enquadram e podem ser definidas como o comportamento doentio (DANTZER et al., 1998; AVITSUR; YIRMIYA, 1999; DANTZER, 2004). O comportamento doentio é geralmente acompanhado pela diminuição da atividade exploratória, da interação social, do comportamento sexual, perda de apetite, anedonia e prejuízos cognitivos e no aprendizado (LARSON; DUNN, 2001). Essa série de alterações comportamentais é uma estratégia comportamental adaptativa do organismo, visando o combate ao microrganismo invasor e a cura rápida (HART, 1988; KENT et al., 1992).

1.7 Mecanismo de ação do LPS na infecção pré-natal

LPS *per se* normalmente não é capaz de chegar até o feto. Após a administração de LPS radiomarcado com iodo (^{125}I -LPS) em ratas prenhes, ele foi detectado no sangue, fígado, rins e placenta desses animais em um período de 1-8h, porém nada foi encontrado no feto. Apesar disso, observou-se a indução de citocinas em um período de 2-8h no plasma materno. Este fato, somado à presença de LPS na placenta, sugere que o LPS deve agir diretamente nas células placentárias para induzir a expressão de mediadores inflamatórios. Portanto, as alterações encontradas na prole não são produzidas diretamente pela endotoxina, pois o LPS parece não sofrer passagem transplacentária (ASHDOWN et al., 2006).

Foram encontrados níveis elevados de citocinas na placenta, no fluido amniótico, no sangue fetal e no cérebro fetal (inclusive com a indução de genes de citocinas pró-inflamatórias no cérebro fetal após administração de LPS na mãe), bem como a ocorrência de inflamação de membranas fetais, após infecções e a inflamação materna. Sabe-se também da existência de TLRs na placenta e em membranas fetais (AVITSUR; POLLAK; YIRMIYA, 1997; CAI et al., 2000; URAKUBO et al., 2001; GAYLE et al., 2004; HARJU et al., 2005; HAVA et al., 2006; XU et al., 2006; SMITH et al., 2007).

As citocinas acessam o cérebro fetal por diferentes maneiras: a maioria vem do lado materno (produzido no útero e placenta durante a infecção intrauterina), atravessando a barreira hematoencefálica imatura do feto e acessando o SNC. Além disso, as citocinas podem ser produzidas na micróglia e nos astrócitos do cérebro fetal a partir da estimulação de citocinas oriundas da mãe (CAI et al., 2000). Essas citocinas podem interferir na homeostasia do ambiente fetal, alterando o desenvolvimento de seu eixo neuroimune (MUNOZ-FERNANDEZ; FRESNO, 1998; URAKUBO et al., 2001; HARJU et al., 2005; XU et al., 2006).

Além das citocinas, os glicocorticóides também podem atuar nos filhotes, sendo capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e influenciar processos de desenvolvimento cerebral dos fetos. Assim, já foi documentada a liberação de hormônio corticotrópico no cérebro fetal após administração de LPS em ratas gestantes, sugerindo a possibilidade de indução da resposta estressora no feto (REUL et al., 1994).

Portanto, citocinas e glicocorticóides podem ser os responsáveis indiretos pelos danos encontrados nos filhotes expostos pré-natalmente ao LPS e esses danos podem perdurar até mesmo na idade adulta do animal (GAYLE et al., 2004; HAVA et al., 2006).

1.8 Justificativa

Na dissertação de mestrado demonstrou-se que a exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg, i.p., no GD 9,5), reduz as interações sociais da prole masculina na infância (comportamento de brincar) e na idade adulta (Apêndice A) (KIRSTEN et al., 2010a). Por tudo já explicado até aqui, sabendo que atualmente existe uma corrente que diz que o autismo pode ser causado por fatores ambientais, incluindo infecções pré-natais, além do fato de que o LPS mimetiza uma infecção bacteriana, e que testes do comportamento de brincar e interação social são utilizados para avaliação de modelos experimentais de autismo, foi proposto que nosso modelo de LPS pré-natal seria um modelo experimental de autismo em ratos.

Para verificar se nosso modelo de LPS pré-natal seria um modelo experimental de autismo, o presente trabalho estudou os outros sintomas típicos de autistas, incluindo anormalidades na comunicação, comportamentos repetitivos, inflexibilidade cognitiva, ausência de demonstração de medo em situações potencialmente perigosas e hiperatividade (DSM-IV, 1994). Portanto, foi avaliado se o LPS pré-natal seria modelo experimental de autismo na prole masculina de ratas.

É importante abrir um parêntese neste ponto com relação ao método de detecção do autismo. Mesmo nos dias de hoje, ainda não existe nenhum exame capaz de diagnosticar o autismo que não seja o diagnóstico baseado em alterações comportamentais (Apêndice D) (BERNARDI; KIRSTEN; TRINDADE, 2012). Devido à diversidade no quadro clínico do autismo, associada ao fato de que nenhum dos aspectos supracitados por si só são exclusivos desse transtorno, seu diagnóstico é eminentemente clínico, sendo composto de várias características, descritas no DSM IV (1994). Nesse sentido, ainda não existem exames complementares que possam validar o diagnóstico clínico (MACHADO et al., 2003).

Para avaliar as anormalidades na comunicação foi realizado o teste da vocalização ultrassônica. Para avaliar comportamentos repetitivos e inflexibilidade cognitiva foi realizado o teste de alternância espontânea no labirinto em T. Para avaliar a ausência de demonstração

de medo em situações potencialmente perigosas, foi realizado o teste do estímulo olfativo aversivo (odor de gato). Para verificar eventual hiperatividade, foi realizado o teste da atividade geral em campo aberto. Para verificar eventuais aumentos dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como ocorre em alguns pacientes autistas, foram quantificadas as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) séricas. Para verificar eventual maior atividade do eixo HPA, foram dosados os níveis séricos de corticosterona. Todos os sintomas comportamentais presentes nos autistas foram definidos pelo DSM-IV (1994).

Uma vez estabelecido o nosso modelo de LPS pré-natal como um modelo experimental de autismo, o próximo passo foi estudar o cérebro dessa prole masculina exposta pré-natalmente ao LPS para tentar entender os mecanismos de ação centrais que poderiam explicar tais alterações comportamentais e imunes.

Além dos prejuízos na socialização, foi demonstrado na dissertação de mestrado redução nos níveis de dopamina e metabólitos no estriado da prole masculina adulta (Apêndice B) (KIRSTEN et al., 2010b). Outros estudos realizados em nosso laboratório com o mesmo tratamento de LPS pré-natal revelaram que o bulbo olfatório também apresenta decréscimo nos níveis de dopamina (Apêndice C) (KIRSTEN et al., 2011). Com essas evidências de prejuízos no sistema dopaminérgico, o presente estudo avaliou de maneira mais aprofundada o sistema dopaminérgico do estriado e bulbo olfatório. Para tanto, foram avaliados por imunohistoquímica, *immunoblotting* e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real a expressão gênica e proteica da enzima limitante na síntese de dopamina, a tirosina hidroxilase (TH) e dos receptores dopaminérgicos D1a e D2. Portanto, foram estudadas possíveis alterações pré- e pós-sinápticas que poderiam contribuir para a redução nos níveis de dopamina previamente encontrados. Além disso, a expressão proteica de marcadores de células gliais (microglia e astrócitos) também foi verificada, uma vez que são considerados como indicadores de neuroinflamação após um desafio imunológico (PANG et al., 2010).

Neste trabalho também foram avaliadas as possíveis alterações maternas induzidas pelo LPS, que poderiam ajudar a entender e explicar os danos encontrados na prole tanto nos estudos realizados no mestrado como no presente. Os estudos realizados durante a gestação das ratas tratadas com LPS foram a dosagem dos níveis séricos de corticosterona e avaliação do desempenho reprodutivo e do tecido placentário.

Por fim, restava uma última pergunta a ser respondida com relação à associação dos resultados encontrados com o modelo experimental de autismo. Sabendo que o autismo é

mais prevalente em homens do que em mulheres, foram avaliadas também as fêmeas expostas pré-natalmente ao LPS. Nesse caso, foi avaliado o comportamento de brincar, a interação social adulta e os níveis séricos de corticosterona.

O estabelecimento do modelo experimental de autismo com o LPS pré-natal significa um passo importante para o entendimento dessa desordem e pode auxiliar também na busca por eventuais tratamentos, baseados nas alterações neuroimunes encontradas.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar (1) se o nosso modelo de LPS pré-natal (100 µg/kg no GD 9,5) é um modelo experimental de autismo na prole masculina de ratas; (2) os mecanismos centrais associados ao LPS pré-natal na prole masculina de ratas; (3) as alterações maternas induzidas pelo LPS pré-natal; e (4) os efeitos induzidos pelo LPS pré-natal na prole feminina de ratas.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Bloco I: LPS pré-natal como modelo experimental de autismo na prole masculina de ratas

- Avaliação da comunicação da prole masculina infante de ratas expostas ao LPS pré-natal por meio da vocalização ultrassônica
- Avaliação da resposta da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal frente a um estímulo olfativo aversivo
- Avaliação da atividade geral em campo aberto da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS
- Avaliação da memória espacial e comportamento repetitivo/restrito no teste de alternância espontânea no labirinto em T da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS
- Quantificação de citocinas pró-inflamatórias séricas avaliadas por ELISA da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS

- Dosagem dos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS

2.2.2 Bloco II: Mecanismos centrais associados ao LPS pré-natal na prole masculina de ratas

- Avaliação da expressão proteica por imunohistoquímica do sistema dopaminérgico e células gliais no estriado da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal
- Avaliação da expressão proteica por *immunoblotting* do sistema dopaminérgico e células gliais no estriado e bulbo olfatório da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal
- Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real do sistema dopaminérgico no estriado e bulbo olfatório da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal

2.2.3 Bloco III: Alterações maternas induzidas pelo LPS pré-natal

- Dosagem dos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio de ratas expostas ao LPS durante a gestação
- Desempenho reprodutivo e avaliação do tecido placentário de ratas expostas ao LPS durante a gestação

2.2.4 Bloco IV: Efeitos induzidos pelo LPS pré-natal na prole feminina de ratas

- Avaliação do comportamento de brincar da prole feminina jovem de ratas expostas ao LPS pré-natal
- Avaliação da interação social da prole feminina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal
- Dosagem dos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio da prole feminina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos e ratas Wistar adultos, com 12 a 14 semanas de idade e peso corporal entre 200 e 350 gramas. Esses animais, provenientes do biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, permaneceram em gaiolas-moradia de polipropileno (38 x 32 x 16 cm), forradas com maravalha (esterilizada e livre de resíduos). Os ratos foram mantidos em sala com aeração, exaustão, umidade entre 65% e 70% e temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, controlados automaticamente por meio de um aparelho de ar condicionado central, com luz artificial (ciclo de 12-horas luz/12-horas escuro, luzes ligadas as 6h00) e com acesso a água filtrada e ração (Nuvilav®, Nuvital company, São Paulo, Brasil) *ad libitum*. Os animais foram utilizados nesse estudo de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil (Protocolo nº 1398/2008). Essas diretrizes são baseadas nas normas do *National Institutes of Health* (Bethesda, MD). Os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos de boas práticas de laboratório com métodos de garantia de qualidade.

3.2 Acasalamento

As ratas empregadas no acasalamento eram virgens e os ratos eram sexualmente experientes e da mesma linhagem, mas de ninhadas diferentes. Para o acasalamento, as ratas foram acondicionadas nas gaiolas-moradia dos machos ao final do período de luz (17h00 – 18h00), sempre duas ratas por macho e lá mantidas durante o período noturno do ciclo de luz.

O procedimento para a detecção da prenhez foi realizado no começo da manhã (7h00 – 8h00) do dia seguinte ao acasalamento, por meio do lavado vaginal. Neste procedimento, uma pipeta plástica contendo salina (cloreto de sódio [NaCl] 0,9%) foi utilizada para lavagem rápida da entrada do canal vaginal da rata, colhendo a secreção

vaginal. A pipeta não pode ser introduzida na vagina da rata para evitar a pseudo-prenhez. Logo após esta etapa, o conteúdo líquido da pipeta foi colocado em uma lâmina de vidro e observado ao microscópio óptico procurando por espermatozoides junto ao material biológico da fêmea (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Se constatada a presença de espermatozoides no lavado vaginal (Figura 4), considerou-se como GD 0 (LEITE et al., 2002). A partir deste momento, cada rata foi alocada individualmente em gaiolas-moradia, iguais as anteriormente mencionadas. No caso da ausência de espermatozoides, as etapas de pareamento de ratos e ratas e lavado vaginal foram repetidas nos dias seguintes até constatação de espermatozoides.

Figura 4 - Lavado vaginal positivo de ratas contendo espermatozoides, observado ao microscópio óptico em aumento de (A) 20x e (B) 40x

3.3 Drogas e soluções

O LPS foi obtido por extração fenólica a partir da bactéria *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8 (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA). A solução salina, empregada tanto para fazer a solução de LPS, como para o tratamento do grupo controle, foi constituída por

solução aquosa de NaCl estéril a 0,9%. A solução de LPS que foi administrada nos animais do grupo experimental era constituída por uma solução na concentração de 50 µg de LPS/mL de solução salina.

3.4 Tratamento

Cinquenta e seis ratas prenhes foram separadas de forma aleatória entre o grupo controle (salina, ou SAL), tratadas com solução salina ($n = 28$) e o grupo experimental (LPS), tratadas com LPS ($n = 28$).

No GD 9,5 das ratas, foi administrada para o grupo experimental a solução de LPS, via i.p., na dose de 100 µg/kg. Essa dose foi escolhida, pois ela (1) induz comportamento doentio, (2) induz alterações endócrinas nas gestantes, (3) aumenta os níveis de citocinas na placenta, e (4) prejudica a taxa de natalidade e o comportamento social da prole masculina na infância e da idade adulta (WANG et al., 2006; SPENCER et al., 2007; KIRSTEN et al., 2010a). Para os animais do grupo controle administrou-se 0,2 mL/100 g de solução salina também por via i.p. Esta etapa do trabalho foi realizada sempre no período da tarde, mais precisamente entre às 15h00 e às 17h00.

3.5 Padronização da ninhada para os testes pós-natais

Foram realizados experimentos maternos nas ratas expostas ao LPS durante a gestação e também experimentos na prole masculina e feminina que recebeu pré-natalmente o LPS. Nos experimentos realizados na prole, o parto ocorreu naturalmente nas ratas tratadas ou não com LPS. O primeiro dia de vida dos filhotes foi definido como dia de vida pós-natal (PND) 1. No PND 1 nenhuma manipulação foi realizada (filhotes e progenitora), já que é fato conhecido que este é um período crítico de estresse para a mãe, que pode acarretar em infanticídio e/ou canibalismo. No PND 2 (8h00 – 9h00), cada ninhada foi ajustada para quatro machos e quatro fêmeas, totalizando oito animais por ninhada. A diferença entre os gêneros foi verificada por meio da diferença visual da distância anogenital, maior nos machos que nas

fêmeas (HOLSON et al., 2006). Não foram realizados procedimentos de cruzamento de filhotes nas ninhadas (*cross-fostering*), pois este procedimento poderia alterar *per se* as respostas comportamentais e imunológicas ao LPS (CHIAVEGATTO; BERNARDI, 1991; GOMEZ-SERRANO et al., 2001). As ninhadas com número de filhotes inferior a oito, foram descartadas.

Os filhotes permaneceram com suas respectivas mães até o PND 21, quando foi realizado o desmame (8h00 – 10h00). Os filhotes do sexo masculino e feminino foram separados, permanecendo agrupados com seus respectivos irmãos do mesmo sexo e mantidos em gaiolas-moradia (quatro filhotes por caixa) iguais as anteriormente citadas. Para cada um dos experimentos pós-natais realizados, apenas um ou dois filhotes de cada ninhada foram utilizados para evitar “efeitos da ninhada” (PEREIRA; BERNARDI; GERARDIN, 2006), usando diferentes animais em diferentes experimentos. Os animais dos diferentes grupos foram avaliados intercaladamente em todos os testes.

Todos os experimentos apresentados nesta tese foram separados em quatro grandes blocos, de acordo com os objetivos propostos. São eles: (3.6.) LPS pré-natal como modelo experimental de autismo na prole masculina de ratas; (3.7.) Mecanismos centrais associados ao LPS pré-natal na prole masculina de ratas; (3.8.) Alterações maternas induzidas pelo LPS pré-natal; e (3.9.) Efeitos induzidos pelo LPS pré-natal na prole feminina de ratas. A seguir é apresentada a metodologia separada em cada um dos quatro blocos correspondentes.

3.6 Bloco I: LPS pré-natal como modelo experimental de autismo na prole masculina de ratas

A prole masculina que foi exposta pré-natalmente ao LPS foi avaliada em testes comportamentais, imunológicos e neuroendócrinos utilizados no estudo dos sintomas tipo autismo para verificação se nosso modelo poderia ser considerado como um modelo experimental de autismo. Os testes realizados nesses animais foram: vocalização ultrassônica, estímulo olfativo aversivo, atividade geral em campo aberto, alternância espontânea no labirinto em T, citocinas pró-inflamatórias séricas e corticosterona sérica.

3.6.1 Avaliação da comunicação da prole masculina infante de ratas expostas ao LPS pré-natal por meio da vocalização ultrassônica

A comunicação prejudicada dos filhotes com suas mães, um típico sintoma do autismo, foi avaliada via vocalização ultrassônica no PND 11 dos filhotes expostos pré-natalmente ao LPS imediatamente após isolamento materno. Filhotes de roedores emitem vocalizações (frequência de banda de 30–50 kHz) quando isolados de suas mães, e essas vocalizações são consideradas indicativas de solicitação de interações maternas (INSEL; HILL; MAYOR, 1986; ISE et al., 2008). O PND 11 foi escolhido, pois (1) a produção de chamados ultrassônicos é relativamente independente da temperatura durante a segunda semana de vida, comparada à primeira semana, (2) é observada alta variabilidade de emissões de chamados entre a ninhada nesse dia, e (3) existem evidências substanciais de estabilidade intraindividual nas emissões de chamados nesse dia (BRUNELLI et al., 1996; BRUNELLI et al., 1997).

Imediatamente após o isolamento dos filhotes dos ninhos e das mães, um filhote macho de cada ninhada dos grupos LPS e controle ($n = 10$ para cada grupo) foi individualmente colocado em gaiola de polipropileno (30 x 20 x 12 cm) e conduzido para a sala teste (com temperatura controlada, $22 \pm 2^\circ\text{C}$) separada da sala moradia. A vocalização ultrassônica foi detectada usando um microfone ultrassônico (modelo D940, Pettersson Elektronik AB®, Uppsala, Sweden) ajustado para uma escala centrada em 40 kHz e colocado distante 10 cm do piso da gaiola (Figura 5). As vocalizações foram gravadas como arquivos digitais .wav (Notebook HP Pavilion dv5 PC, Palo Alto, CA, EUA). Os parâmetros avaliados foram a **latência para a primeira vocalização ultrassônica (tempo em segundos)** e o **número de vocalizações ultrassônicas** em um período de 5 minutos. Os testes foram realizados sempre entre às 9h30 e 10h30. Um observador alheio aos tratamentos dos grupos e à hipótese do trabalho analisou as gravações digitais.

Figura 5 - Aparato utilizado para avaliação da vocalização ultrassônica, constituindo de microfone ultrassônico, gaiola de polipropileno onde cada filhote foi acondicionado e notebook para gravação e análise dos arquivos digitais

3.6.2 Avaliação da resposta da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal frente a um estímulo olfativo aversivo

É sabido que autistas podem não demonstrar medo de situações potencialmente perigosas (DSM-IV, 1994). Para verificar tal aspecto, foi utilizado o modelo de estímulo olfativo aversivo com o odor de gato. Ratos adultos (PND 60) expostos pré-natalmente ao LPS ou a salina (um filhote macho de cada ninhada, $n = 8$ para cada grupo) foram utilizados para este experimento. Além desses animais, outros oito ratos, sem qualquer tratamento (naive), foram utilizados para o chamado grupo neutro. A metodologia empregada neste experimento foi adaptada de Andrews et al. (1993) e Zangrossi e File (1992).

Os ratos foram expostos a duas condições de odor: de gato ou neutra. Todos os odores empregados neste experimento foram coletados em pedaços de tecidos (18 x 22 cm) retirados de uma mesma toalha de algodão de cor branca.

O odor de gato foi obtido esfregando vigorosamente por cinco minutos um pedaço de tecido umedecido contra os pêlos de um gato doméstico (fêmea, sem raça definida, com seis anos de idade e 3,5 kg). Esse procedimento foi realizado uma hora antes da sessão experimental. O tecido impregnado com o odor de gato foi mantido em um saco plástico vedado até o início dos experimentos. Cada tecido com o odor de gato foi utilizado em apenas quatro sessões contínuas de exposição.

Para o teste com o odor neutro, também foi utilizado um pedaço de tecido umedecido, só que sem contato com gatos.

Os experimentos foram realizados em uma sala pequena com luz fraca e a exposição ao odor neutro procedeu à exposição ao odor de gato para evitar traços de odor de gato no grupo neutro. Antes da primeira exposição ao odor de gato, o pano impregnado foi deixado por dez minutos na sala teste. Os testes foram realizados sempre entre às 8h00 e 10h00.

Os animais foram expostos individualmente aos odores em gaiolas-moradia, iguais as anteriormente citadas, com uma tampa de acrílico transparente substituindo a tampa metálica, para facilitar a visualização do comportamento animal. Esta tampa possuía furos para permitir a respiração do animal, assim como um compartimento opaco (caixa rasa de polipropileno), no mesmo lado que a alimentação ficava na tampa metálica (Figura 6). Esse compartimento servia de abrigo para o animal. A altura entre o assoalho e a tampa era de 16 cm. Os animais foram expostos em suas gaiolas-moradia à tampa de acrílico nos dois dias anteriores ao teste, por um período de dez minutos cada, com o intuito de habitué-los ao aparato.

Figura 6 - Aparato utilizado para o teste do estímulo olfativo aversivo, onde dois animais foram avaliados individualmente e simultaneamente em gaiolas-moradia separadas, contando com (T) um tecido impregnado com ou sem o odor de gato e (A) um abrigo no lado oposto

Imediatamente antes da exposição ao odor de gato, dois ratos, um do grupo controle e um do grupo experimental, foram retirados do biotério e carregados em gaiolas-moradia até a sala do teste. As duas gaiolas-moradia foram então colocadas lado a lado e um tecido com odor de gato foi colocado entre as duas gaiolas, na extremidade oposta aos compartimentos de abrigo. Cada sessão de exposição durou cinco minutos e foi registrada por uma câmera de vídeo localizada no teto da sala experimental. As gravações foram analisadas posteriormente. Para cada rato, foram avaliados o **número de vezes que estes entraram em contato com o tecido** (contato físico direto ou a partir de uma distância menor ou igual a cinco centímetros do tecido), o **tempo gasto em contato com o tecido**, o **número de vezes que os animais entraram no compartimento de abrigo**, e o **tempo gasto sob o abrigo**.

3.6.3 Avaliação da atividade geral em campo aberto da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS

Trinta e quatro ratos machos adultos (PND 60) foram avaliados quanto a sua atividade geral em campo aberto, sempre um filhote de cada ninhada. Nove desses ratos fizeram parte do grupo controle (SAL), tratados pré-natalmente (GD 9,5) com salina; outros nove foram expostos pré-natalmente (GD 9,5) ao LPS; outros oito foram tratados pré-natalmente (GD 9,5) com salina e desafiados com LPS (100 µg/kg) 90 minutos antes da avaliação comportamental (grupo SAL+LPS); outros oito foram expostos pré-natalmente (GD 9,5) ao LPS e desafiados com LPS (100 µg/kg) 90 minutos antes da avaliação comportamental (grupo LPS+LPS). Os quatro grupos foram avaliados no período das 9h00 às 11h00 horas. A dose de LPS e o intervalo entre a administração e a avaliação comportamental foram escolhidos, pois eles já foram descritos como indutores do comportamento doentio, além de liberar citocinas pró-inflamatórias e glicocorticóides (LENCZOWSKI et al., 1997).

O campo aberto utilizado foi construído de acordo com Broadhurst (1960), constituído de uma arena circular com 90 centímetros de diâmetro por 28 centímetros de altura, pintado em cinza escuro fosco com revestimento acrílico lavável (Figura 7).

Para a avaliação comportamental, cada animal foi colocado individualmente no centro da arena e observado por um período de 5 minutos, com o ambiente sempre previamente limpo com solução álcool/água 5 %, eliminando possíveis odores deixados por outros animais.

Figura 7 - Arena de campo aberto utilizada para a observação da atividade geral individual dos ratos adultos por uma sessão de 5 minutos

O comportamento animal foi mensurado de maneira automática pelo *software* Ethovision® (Ethovision; Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA). O EthoVision® é um sistema de rastreamento em vídeo, de análise de movimento e reconhecimento comportamental (NOLDUS; SPINK; TEGELENBOSCH, 2001). O sistema de observação indireta é constituído por uma pequena sala isolada do observador, com iluminação difusa e sem qualquer ruído, contendo uma filmadora instalada no teto da sala de observação a 100 cm da arena, conectada a um monitor Sony® Triniton e a um computador IBM®, ambos localizados em uma sala adjacente (Figura 8). As imagens captadas durante a realização do campo aberto foram interpretadas pelo *software* EthoVision® – Video Tracking, Motion & Behavior Recognition System – versão 2.3 (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA). As imagens recebidas pela câmera filmadora foram digitalizadas na placa de captura, e o programa gerou coordenadas espaciais (x e y) do centro de gravidade do animal em intervalos de tempo determinados, segundo uma taxa de amostragem de 6,67 amostras por segundo (ou seja, registra a localização do animal a cada 0,15 segundo). Essas coordenadas foram geradas pelo método de subtração das imagens do animal branco na arena escura (o campo aberto, no caso).

Figura 8 - Sistema para observação indireta da atividade geral em campo aberto, com mensuração automatizada (EthoVision®): (A) arena de campo aberto; (B) sistema computadorizado para rastreamento e análise dos dados; e (C) câmera para captação das imagens

Os parâmetros observados foram: **distância percorrida e frequência de levantar**. Sendo que distância percorrida (cm), ou locomoção, é a distância que o animal percorreu, em centímetros pelo campo aberto, calculado pela somatória das distâncias medida em linha reta, movidas pelo animal entre duas amostras consecutivas; e frequência de levantar corresponde ao número de vezes que o animal se sustentava apenas pelas patas traseiras, interpretado pelo *software* pela diminuição da área do animal a partir de 15%, captado pela câmera que se localizava acima do animal.

O sistema do EthoVision® processou os dados das passagens e calculou os valores numéricos das características de distribuição escolhidas para cada parâmetro. Dessa forma foi possível exportar esses valores para formatos comuns de outros computadores (*Microsoft Excel*®).

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

3.6.4 Avaliação da memória espacial e comportamento repetitivo/restrito no teste de alternância espontânea no labirinto em T da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS

Prejuízos na memória, no aprendizado e ocorrência de comportamento repetitivo/restrito, que são alguns dos sintomas típicos de pacientes autistas, foram avaliados usando o teste de alternância espontânea no labirinto em T. Este teste foi adaptado de Baker et al. (2008), Stangherlin et al. (2008) e Timofeeva et al. (2008). Para tanto, no PND 60–67, foram avaliados dois machos adultos de cada ninhada experimental e controle. Além dos grupos SAL e LPS pré-natais, dois outros grupos foram testados no labirinto em T 90 minutos após um desafio adicional com LPS (100 µg/kg, i.p.). Assim, fizeram parte desse experimento quatro grupos ($n = 8$ para cada grupo): SAL, injeção pré-natal de salina; LPS, injeção pré-natal de LPS; SAL+LPS, injeção pré-natal de salina e de LPS na idade adulta; e LPS+LPS, injeção pré-natal e na idade adulta de LPS. Os animais foram desafiados com LPS, pois é sabido que áreas cerebrais relacionadas à memória apresentam altos níveis de plasticidade neuronal (KREITZER; MALENKA, 2008). Essa plasticidade compensa possíveis prejuízos na função comportamental normal, se tornando aparente apenas quando o sistema imune é desafiado. A dose do desafio com LPS e o tempo de intervalo foram escolhidos, pois eles são reportados por induzir comportamento doentio e liberar citocinas pró-inflamatórias e glicocorticóides (LENCZOWSKI et al., 1997).

O labirinto em T foi construído em madeira pintada de preto (tinta acrílica impermeável) com três braços em forma de T (90° de inclinação). O labirinto em T era elevado 65 cm do chão. Os braços tinham 10 cm de largura e as paredes tinham 30 cm de altura. Um dos braços tinha uma área de partida de 20 cm de comprimento, separado por uma parede removível da continuação do braço. O restante desse braço possuía 45 cm de comprimento. Os outros dois braços (esquerdo e direito) eram os braços de escolha e tinham

40 cm de comprimento cada (Figura 9). A sala de teste usada foi uma sala pequena com iluminação fraca.

Figura 9 - Labirinto em T com barreiras que separam a área de partida e dois braços: (A) área de partida; (E) braço esquerdo; e (D) braço direito

No dia do teste, cada animal foi mantido isolado em uma gaiola-moradia durante todas as sessões de observação em uma antessala, próxima a sala onde se localizava o labirinto em T, a qual possuía baixa iluminação. Os testes foram realizados na parte da manhã, das 8h30 às 10h30, e na parte da tarde, das 13h00 às 15h00, como explicado a seguir:

Os ratos foram colocados na área de partida do aparato e lá mantidos por 10 segundos. Nesse momento, a barreira foi erguida, permitindo que o animal explorasse o labirinto por mais 90 segundos. Inicialmente, cada rato passou por uma sessão de escolha forçada no labirinto, na qual o braço direito estava bloqueado. Após 20–30 minutos, o rato passou por uma sessão de escolha livre, onde ambos os braços estavam abertos para a exploração. Após 4–5 h, o rato passou por outra sessão de escolha forçada, na qual o braço esquerdo estava bloqueado. Finalmente, após 20–30 min, o rato passou por outra sessão de escolha livre. As sessões de escolha forçada (com um dos braços obstruídos) objetivavam levar o animal para um determinado braço do aparato; nas sessões seguintes de livre escolha (com os dois braços livres), o animal tinha acesso aos dois braços do aparato, sendo as sessões de livre escolha o teste propriamente dito. Tanto as sessões de escolha forçada como livre tinham duração máxima de 90 segundos. Antes de cada sessão, o aparato foi lavado com uma solução de 5% álcool/água para eliminar possíveis interferências devido a pistas olfativas deixadas anteriormente por outros ratos. Todas as sessões foram filmadas para análises posteriores.

Foram avaliadas as primeiras escolhas dos ratos nas sessões de escolha livre, isto é, se o rato entrava primeiro no braço direito ou esquerdo. Se o rato entrasse primeiro no braço que estava previamente bloqueado, foi considerado um acerto, baseado no modelo de alternância espontânea. Esse modelo é baseado na propensão natural do rato em alternar a escolha do braço visitado em cada sessão, ao longo de sucessivas sessões (DUDCHENKO, 2004). Se o rato entrasse primeiro no braço que estava previamente desbloqueado, foi considerado um erro. Assim, para análise estatística, foi verificado o **número de acertos no labirinto em T**, isto é, dois erros nas duas sessões de escolha livre representaram um escore de 0, um acerto e um erro representaram escore 1, e dois acertos representaram um escore de 2. Adicionalmente, a **frequência de levantar** (número de vezes que o animal ficou sobre as patas traseiras) foi avaliada na primeira sessão para saber se o animal apresentaria alguma alteração exploratória/motora.

3.6.5 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias séricas avaliadas por ELISA da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS

As citocinas pró-inflamatórias foram avaliadas, pois existem pacientes autistas que apresentam níveis elevados destas tanto no sangue quanto no cérebro (JYONOUCHI; SUN; LE, 2001; CROONENBERGHS et al., 2002; LI et al., 2009). Trinta e quatro ratos machos adultos (PND 60-67), um filhote de cada ninhada, não utilizados em outros experimentos, foram avaliados quanto aos níveis das citocinas pró-inflamatórias séricas **IL-1 β** e **TNF- α** . Esses animais foram divididos em quatro grupos: grupo SAL, tratados pré-natalmente (GD 9,5) com salina ($n = 9$); grupo LPS, exposto pré-natalmente (GD 9,5) ao LPS ($n = 8$); grupo SAL+LPS, tratados pré-natalmente (GD 9,5) com salina e desafiados com LPS (100 μ g/kg, i.p.) 90 minutos antes da coleta do sangue ($n = 9$); e grupo LPS+LPS, exposto pré-natalmente (GD 9,5) ao LPS e desafiados com LPS (100 μ g/kg, i.p.) 90 minutos antes da coleta do sangue ($n = 8$). A coleta do sangue dos ratos foi realizada no período das 9h45 às 10h30, para minimizar os efeitos do ritmo circadiano. A dose de LPS e o intervalo entre a administração e a coleta do sangue foram escolhidos, pois elas foram descritos como indutores do comportamento doentio, além de liberar citocinas pró-inflamatórias e glicocorticóides (LENCZOWSKI et al., 1997).

Nos três dias anteriores às coletas do sangue, os ratos foram habituados, ou seja, foram levados à sala de coleta e submetidos à contenção, da mesma forma do procedimento empregado no dia da coleta, para minimizar o estresse desta manipulação.

No dia da coleta do sangue, os ratos foram levados individualmente à sala de coleta. Imediatamente, eles foram submetidos à eutanásia para a coleta de sangue. Dessa forma o próximo animal que teria seu sangue coletado não era exposto a vocalizações ou odores do anterior. O sangue foi coletado em *eppendorfs* secos e deixado à temperatura ambiente para a retração do coágulo. Em seguida, foi centrifugado sob refrigeração a 1000 gs por 20 minutos. O soro (sobrenadante) foi armazenado em *eppendorfs* de polietileno em freezer a -80°C até o momento da realização das dosagens, que ocorreram em aproximadamente 20 dias após as coletas.

Os soros obtidos foram utilizados para a quantificação de IL-1 β e TNF- α circulantes. Essas dosagens de citocinas foram realizadas por ELISA, utilizando-se kits comerciais (*DuoSets*, R&D Systems®, Minneapolis, MN, USA). Neste método, placas de 96

poços foram sensibilizadas com 100 µL por poço de anticorpo de captura diluído em salina tamponada (PBS, *phosphate buffered saline*) e incubadas por uma noite. Após três lavagens com 300 µL/poço de tampão de lavagem para ELISA, as placas foram bloqueadas com 200 µL/poço de tampão de bloqueio por uma hora à temperatura ambiente. Após três lavagens, as amostras foram incubadas por um período de duas horas em temperatura ambiente. Para a curva padrão de cada citocina, duplicatas de 100 µL/poço das diluições seriadas das citocinas recombinantes foram incubadas por duas horas em temperatura ambiente, conforme recomendações do fabricante. Após cinco lavagens, foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo de detecção, incubando no escuro por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada sete vezes; adicionando-se 100 µL/poço de estreptoavidina e incubando por 20 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. Por fim, foram adicionados 50 µL/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 2N) para interromper a reação. A densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm com correção de 570 nm.

3.6.6 Dosagem dos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS

Quarenta ratos machos adultos (PND 60-67), um filhote de cada ninhada, não utilizados em outros experimentos, foram avaliados quanto à dosagem dos **níveis séricos de corticosterona** avaliados por radioimunoensaio. Esses animais foram divididos em quatro grupos: grupo SAL, tratados pré-natalmente (GD 9,5) com salina ($n = 10$); grupo LPS, exposto pré-natalmente (GD 9,5) ao LPS ($n = 10$); grupo SAL+LPS, tratados pré-natalmente (GD 9,5) com salina e desafiados com LPS (100 µg/kg, i.p.) 90 minutos antes da coleta do sangue ($n = 10$); e grupo LPS+LPS, exposto pré-natalmente (GD 9,5) ao LPS e desafiados com LPS (100 µg/kg, i.p.) 90 minutos antes da coleta do sangue ($n = 10$). A coleta do sangue dos ratos foi realizada no período das 9h45 às 10h30, para minimizar os efeitos do ritmo circadiano. A dose de LPS e o intervalo entre a administração e a coleta do sangue foram escolhidos, pois elas foram descritos como indutores do comportamento doentio, além de liberar citocinas pró-inflamatórias e glicocorticóides (LENCZOWSKI et al., 1997).

Os animais foram decapitados e o sangue do tronco foi coletado. O sangue foi centrifugado (2.000 rpm/20 minutos em temperatura ambiente) para obtenção do soro. Este

foi armazenado em *ependorfs* de polietileno em freezer a -80°C até o momento da realização das dosagens hormonais, que ocorreu aproximadamente após 15 dias.

As amostras de soro dos animais foram retiradas do freezer e mantidas à temperatura ambiente ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) para o descongelamento. As dosagens para quantificação de corticosterona foram realizadas por radioimunoensaio em fase sólida utilizando-se o kit comercial Coat-a-Count (DPC®, Los Angeles, CA, USA) específico. Nesta técnica, há competição da corticosterona marcada com iodo radioativo (I^{125}) e do hormônio contido na amostra (soro) pelos sítios de anticorpos fixados à parede do tubo de ensaio (fase sólida). O volume de 50 μL de cada amostra de soro foi pipetado dentro de cada tubo de ensaio. Após a adição de 1 mL da corticosterona marcada com (I^{125}), estes tubos foram incubados à temperatura ambiente por 2 horas. A seguir, o conteúdo dos tubos foi desprezado, sendo a leitura da radioatividade remanescente desta reação feita no contador automático de radiação gama (Packard® Cobra™ II Auto-Gamma® counter, A Canberra Company, CT, USA). Os resultados finais das contagens por minutos foram expressos em ng/mL.

Uma curva padrão de corticosterona foi obtida utilizando calibradores padrões (50 μL) com concentrações previamente conhecidas de corticosterona: 0, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 ng/mL. Além disso, foi utilizado um soro controle (50 μL) com concentrações de 200 ng/mL de corticosterona no início, meio e final do ensaio. Os seguintes parâmetros de validação foram registrados: sensibilidade do método de 89,96%; coeficiente de variação intraensaio baixo de 8%; coeficiente de variação intraensaio alto de 6,5%; e limite de detecção de 1,3633 ng/mL.

Os ensaios para dosagem de corticosterona foram realizados no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal (VRA), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP.

3.7 Bloco II: Mecanismos centrais associados ao LPS pré-natal na prole masculina de ratas

A prole masculina que foi exposta pré-natalmente ao LPS e que apresentou uma série de prejuízos comportamentais e imunológicos foi estudada ao nível cerebral na tentativa do entendimento dos mecanismos neurais associados a esses prejuízos. O sistema

dopaminérgico e células gliais do estriado e do bulbo olfatório foram estudados com técnicas de imunohistoquímica, *immunoblotting* e PCR em tempo real. Essas estruturas cerebrais e enzimas e células foram escolhidas baseadas nos nossos estudos prévios, como mencionado anteriormente (KIRSTEN, 2008; TARICANO, 2010).

3.7.1 Avaliação da expressão proteica por imunohistoquímica do sistema dopaminérgico e células gliais no estriado da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal

A expressão proteica de marcadores do sistema dopaminérgico e de células gliais no estriado (Figura 10) foi analisada qualitativamente pela técnica de imunohistoquímica. No PND 60, um macho adulto de cada ninhada experimental e controle ($n = 8$ para cada grupo) foi profundamente anestesiado com quetamina e xilazina e perfundido via transcardíaca com PBS e paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M (PB; pH 7,4). Após 4-6 horas de pós-fixação nos mesmos fixadores, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose a 30% em PB para a crioproteção. Os encéfalos foram então congelados e cortes coronais em uma espessura de 30 μ m foram obtidos em um micrótomo deslizante de congelação e coletados em PB. Os cortes do encéfalo contendo as áreas de interesse foram incubados com os seguintes anticorpos: (1) anticorpo monoclonal anti-tirosina hidroxilase (**TH**) feito em camundongo, (2) anticorpo monoclonal anti-receptor dopaminérgico **D1a** feito em camundongo, (3) anticorpo policlonal anti-receptor dopaminérgico **D2** humano feito em coelho (Chemicon®, Temecula, CA, USA), (4) anticorpo monoclonal anti-proteína glial fibrilar ácida (**GFAP**, *glial fibrillary acidic protein*) feito em camundongo para marcação de astrócito (Sigma®, Saint Louis, MO, USA), e (5) anticorpo monoclonal anti-CD11b/c de rato (**OX-42**) feito em camundongo, marcador de micróglia (Pharmigen BD Biosciences®, USA). Todos os anticorpos foram diluídos 1:1.000 em PB contendo 0,3% de Triton X-100 e 5% de soro normal de burro ou de cabra. A incubação com os anticorpos primários foi conduzida por 14-20 horas à temperatura ambiente. A detecção foi realizada usando o protocolo convencional de imunoperoxidase (CHAVES et al., 2008): após três lavagens (10 minutos cada) em PB, os cortes foram incubados com anticorpos secundários anti-coelho feito cabra ou anti-camundongo feito em burro (Vector, Burlingame, CA, USA) diluído a 1:200 em PB

por duas horas. Os cortes foram então lavados em PB e incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite®, Vector, Burlingame, CA, USA). Seguindo-se a reação com 0,05% de 3-3'-diaminobenzidina e uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,01% em PB e intensificação com 0,05% de tetróxido de ósmio em água, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, desidratados, e cobertos com lamínulas utilizando Permount (Fisher Scientific®, Fair Lawn, USA). Os cortes contendo as áreas de interesse foram analisados por microscopia óptica convencional e as imagens digitais foram capturadas e montadas usando o *software* Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

Figura 10 - Ilustração de um corte sagital de um encéfalo de rato esquematizando as diferentes regiões, incluindo o estriado (ou caudado putâmen – *caudate-putamen*) e o bulbo olfatório (*olfactory bulb*) que foram avaliados neste estudo

Fonte: Figura retirada do site gensat.org

3.7.2 Avaliação da expressão proteica por imunoblotting do sistema dopaminérgico e células gliais no estriado e bulbo olfatório da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal

Os níveis de proteínas do sistema dopaminérgico e de células gliais no estriado e bulbo olfatório foram quantitativamente analisados por *immunoblotting* como descrito

anteriormente (CHAVES et al., 2008). Foram utilizados dezesseis ratos adultos (PND 60), um filhote de cada ninhada, não utilizados em outros experimentos, sendo metade desses animais ($n = 8$) do grupo controle, ou SAL, isto é, tratados pré-natalmente (GD 9,5) com salina, e a outra metade dos animais ($n = 8$) do grupo LPS, isto é, expostos pré-natalmente (GD 9,5) ao LPS. A coleta do cérebro dos ratos foi realizada no período das 13h00 às 14h30.

Os animais foram decapitados e as duas estruturas cerebrais – estriado e bulbo olfatório (Figura 10) – foram coletadas sobre placa de gelo seco, formando assim um micro-ambiente o mais frio possível. Essas regiões foram dissecadas com base nas seguintes coordenadas: estriado aproximadamente +2.28 a -1.32 mm do bregma e bulbo olfatório aproximadamente +7.56 a + 5.16 mm do bregma (PAXINOS; WATSON, 1998). Os procedimentos de coleta duraram no máximo três minutos por animal. Imediatamente após a coleta, as estruturas foram individualmente homogeneizadas a 4 °C em tampão de extração (Tris pH 7,4, 100 mM; ácido dissódico etilenodiaminotetracético [EDTA] 10 mM; *ammonium persulfate* [PMSF] 2 mM; aprotinina 0,01 mg/mL) com um homogenizador do tipo Turratrec modelo MA-102/mini (Marconi®; São Paulo, SP, Brasil). Os homogenatos foram centrifugados a 12.000 rpm por 20 minutos a 4 °C em uma microcentrífuga modelo 5804R (Eppendorf®; Hamburgo, Alemanha) e a concentração proteica do sobrenadante foi determinada usando-se uma solução para ensaio colorimétrico (Bio-Rad®, Hercules, CA, USA). Amostras dos sobrenadantes contendo 50-75 µg de proteína total foram tratadas com tampão Laemmli contendo ditiotreitol 100 mM e submetidas à eletroforese em géis de acrilamida a 6,5-10% contendo dodecil sulfato de sódio utilizando uma cuba para mini-gel (Mini-Protean 3; Bio-Rad®, Hercules, CA, USA). Após a separação eletroforética, as proteínas foram eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm de diâmetro) utilizando-se um sistema de transferência (Trans-Blot cell system; Bio-Rad®, Hercules, CA, USA) em tampão contendo SDS (*sodium dodecyl sulfate*). Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio contendo 5% de leite desnatado em salina tamponada contendo Tween 20 (TTBS; 0,01 M de Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 0,05% de Tween 20) durante pelo menos duas horas sob leve agitação. Após esse período, as membranas foram lavadas três vezes, 10 minutos cada, com TTBS e incubadas a 4 °C, sob leve agitação, durante toda a noite com os mesmos anticorpos usados na imunohistoquímica (item 3.7.1) nas seguintes diluições: **TH** diluído 1:4000, **D1a** e **D2** diluídos 1:1000, **GFAP** diluído 1:4000, e **OX-42** diluído 1:500. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes, 10 minutos cada, em TTBS e posteriormente incubadas por duas horas com anticorpo

secundário anti camundongo ou coelho conjugados com peroxidase (Amersham®; Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) diluídos a 1:10.000 em solução para incubação contendo 1% de leite desnatado em TTBS. Novamente as membranas foram lavadas em TTBS por três vezes de 10 minutos e a ligação específica do anticorpo com a proteína foi revelada utilizando o kit quimioluminescente ECL (Amersham Biosciences®, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). Finalmente, as bandas foram analisadas quanto à densidade óptica (DO) da imunorreatividade usando-se o programa Scion Image 4.0.2 (Scion Corporation®, Frederick, MD, USA). Como controle da quantidade de proteínas aplicada nos géis utilizou-se o anticorpo contra a proteína estrutural β -actina (Sigma®, St. Louis, MO, USA) nas mesmas membranas, seguindo o mesmo protocolo de incubação descrito a cima. Como não houve variações na expressão de β -actina nas condições estudadas, a DO das bandas de todos os anticorpos foram primeiramente normalizadas em relação à banda correspondente de β -actina em cada experimento. Os dados foram normalizados fazendo-se a razão da DO da banda do anticorpo estudado sobre a DO da banda de β -actina correspondente. Os dados obtidos foram então submetidos à análise estatística por teste *t* de Student não pareado, comparando sempre o grupo LPS com seu correspondente grupo controle para cada estrutura e proteína.

3.7.3 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real do sistema dopaminérgico no estriado e bulbo olfatório da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal

Quatorze ratos machos adultos (PND 60), um filhote de cada ninhada, não utilizados em outros experimentos, foram avaliados quanto à expressão de genes de interesse em duas regiões cerebrais: estriado e bulbo olfatório (Figura 10). Esses animais foram divididos igualmente em dois grupos: grupo SAL, tratados pré-natalmente (GD 9,5) com salina ($n = 7$); e grupo LPS, tratados pré-natalmente (GD 9,5) com LPS ($n = 7$). A coleta do cérebro dos ratos foi realizada no período das 13h00 às 14h30.

Os animais foram submetidos à eutanásia e as duas estruturas cerebrais – estriado e bulbo olfatório – foram coletadas sobre placa de gelo seco, formando assim um micro-ambiente o mais frio possível. Essas regiões foram dissecadas com base nas coordenadas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 1998). Os procedimentos de coleta duraram no

máximo três minutos por animal. Cada estrutura foi acondicionada em crio-tubos e estocada em freezer a -80°C para posterior extração de RNA, que ocorreu em aproximadamente 15 dias após as coletas.

O RNA celular total foi isolado das amostras por meio dos reagentes Trizol/Clorofórmio (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA). Após a exposição do conteúdo celular, o RNA total torna-se visível na presença de isopropanol. O RNA extraído foi solubilizado em água livre de RNase e armazenado a -80°C para posterior quantificação por espectrometria. A seguir foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,5 % para verificação da integridade do RNA mensageiro. A transcrição reversa foi feita a partir de 1500 ng de RNA para obtenção do cDNA seguindo protocolos sugeridos pela empresa fornecedora (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) e armazenado a -20 °C até o momento da reação de PCR.

A reação de PCR foi feita utilizando o sistema TaqMan (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) certificado para cada um dos genes, utilizando-se o gene GAPDH (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) como controle endógeno da reação; foi utilizado 75 ng de cDNA para cada reação realizada em duplicata. Os dados obtidos na corrida foram submetidos à análise segundo o método de Livak (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), sendo os valores individuais normalizados com as médias dos valores do grupo controle para obtenção da quantificação relativa do RNA mensageiro.

Os genes analisados e seus respectivos códigos são: GAPDH (Rn99999916_s1), **TH** (Rn00562500_m1), receptor **D1a** para dopamina (Rn03062203_s1) e receptor **D2** para dopamina (Rn01418275_m1).

3.8 Bloco III: Alterações maternas induzidas pelo LPS pré-natal

Uma vez verificado uma série de prejuízos comportamentais, imunológicos e cerebrais na prole masculina que foi exposta pré-natalmente ao LPS, buscou-se estudar o que o LPS causou diretamente nas gestantes, para ajudar a explicar o que desencadeou tais prejuízos nos filhotes. Para tanto, foi avaliado os níveis de corticosterona sérica, o desempenho reprodutivo e o tecido placentário e nas ratas tratadas com LPS durante a gestação.

3.8.1 Dosagem dos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio de ratas expostas ao LPS durante a gestação

No GD 9,5, 90 minutos após a exposição das gestantes ao LPS ou salina, dezessete ratas não utilizadas em outros experimentos ($n = 8$ para o grupo controle e $n = 9$ para o grupo LPS), foram avaliados quanto à dosagem dos **níveis séricos de corticosterona** avaliados por radioimunoensaio como descrito anteriormente no item 3.6.6. Resumidamente, a coleta do sangue dos ratos foi realizada no período das 9h45 às 10h30. Após decapitação, coletou-se o sangue, que foi centrifugado para obtenção do soro. As dosagens para quantificação de corticosterona foram realizadas por radioimunoensaio em fase sólida utilizando-se o kit comercial Coat-a-Count (DPC®, Los Angeles, CA, USA) específico. A leitura da radioatividade remanescente desta reação feita no contador automático de radiação gama (Packard®). Os resultados finais das contagens por minutos foram expressos em ng/mL.

Os seguintes parâmetros de validação foram registrados: coeficiente de variação intraensaio de 5,48%; e limite de detecção de 2,87 ng/mL.

3.8.2 Desempenho reprodutivo e avaliação do tecido placentário de ratas expostas ao LPS durante a gestação

Para este experimento, foram utilizadas seis ratas do grupo controle e seis ratas do grupo experimental, exposta ao LPS. No GD 16, as ratas foram decapitadas. Em seguida, foi realizado o procedimento de laparotomia exploratória, com exposição dos cornos uterinos, para contagem de pontos de implantação, de reabsorção e de fetos vivos e mortos e, em seguida, procedeu-se a retirada das placentas para posterior análise morfológica. Os ovários também foram retirados para a contagem de corpos lúteos. Este procedimento foi realizado das 8h00 às 10h00.

As perdas embrionárias, no período de pré-implantação e no período de pós-implantação, bem como a taxa de implantação e de fetos vivos, foram calculadas por meio das seguintes proporções:

$$\begin{aligned}\% \text{ de perda pré-implantação} &= (CL - IM) \times 100/CL; \\ \% \text{ de perda pós-implantação} &= (IM - FV) \times 100/IM; \\ \% \text{ de taxa de implantação} &= 100 - \% \text{ de perda pré-implantação}; \\ \% \text{ fetos vivos} &= 100 - \% \text{ de perda pós-implantação},\end{aligned}$$

onde CL refere-se ao número de corpos lúteos, IM é o número de implantações, FV é o número de fetos vivos.

Posteriormente, as placentas foram cortadas em pequenos fragmentos transversais, colocadas em cassetes e fixadas em formol diluído a 10% em PBS. O material foi emblocado, cortado e corado com hematoxilina-eosina (HE), para observação de possíveis alterações à microscopia óptica.

3.9 Bloco IV: Efeitos induzidos pelo LPS pré-natal na prole feminina de ratas

Uma vez que foi demonstrado que a prole masculina exposta pré-natalmente ao LPS apresentou prejuízos comportamentais e imunológicos do tipo autista, a prole feminina também foi avaliada no intuito de verificar a prevalência desses prejuízos, uma vez que o autismo é mais prevalente em homens que em mulheres (FOMBONNE, 2009). As fêmeas expostas ao LPS pré-natal foram avaliadas quanto ao comportamento de brincar na infância, interação social na idade adulta e níveis séricos de corticosterona.

3.9.1 Avaliação do comportamento de brincar da prole feminina jovem de ratas expostas ao LPS pré-natal

O comportamento de brincar foi avaliado em filhotes fêmeas para saber se o prejuízo social que foi previamente observado nos filhotes machos (KIRSTEN et al., 2010a) também ocorre em fêmeas. Após o desmame, no PND 21, 48 filhotes fêmeas dos grupos

controle e LPS (dois filhotes de cada ninhada) foram separados em uma das duas seguintes condições para a análise do comportamento de brincar: acondicionamento individual (filhotes controle isolados, $n = 12$; filhotes tratados isolados, $n = 12$) e acondicionamento agrupado, consistindo de três filhotes por gaiola (filhotes controle agrupados, $n = 12$; filhotes tratados agrupados, $n = 12$). O motivo do isolamento social foi para aumentar a motivação em iniciar o comportamento de brincar (PANKSEPP; BEATTY, 1980). Os animais permaneceram nessas condições (isolados ou agrupados) nas gaiolas-moradia (38 x 32 x 16 cm) até o PND 30.

O comportamento de brincar foi avaliado no PND 30, pois esse comportamento apresenta pico nesse período (PLETNIKOV et al., 1999). No PND 30, um filhote tratado ou controle isolado foi confrontado com um filhote controle ou tratado agrupado, respectivamente (a diferença no peso foi menor que 10 gramas), sendo o agrupado inserido na gaiola do isolado, onde o experimento foi realizado, e, portanto, os isolados são também denominados como residentes, e os agrupados como intrusos.

Imediatamente antes do início do experimento, as gaiolas de um animal isolado e de um trio agrupado foram colocadas na sala de observação por 5 minutos para aclimação. Após este período, um intruso foi colocado na gaiola do residente e imediatamente a avaliação comportamental começou. As sessões foram de 10 minutos na própria gaiola de polipropileno do isolado residente. Os testes foram realizados durante a manhã, entre as 9h00 e 11h00. O comportamento dos animais foi filmado e, ao final das sessões, analisado.

Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- **Frequência de *pinning***, ou comportamento de brincar propriamente dito, isto é, o número de vezes que o animal deita de costas (com seu dorso encostado no chão) mostrando seu ventre para o parceiro, que fica sobre ele (Figura 11); esse comportamento foi avaliado para os dois animais, pois ambos foram participantes ativos.
- **Tempo gasto em farejar o parceiro (tempo em segundos)** entendido pelo tempo que um dos animais gasta farejando seu parceiro, ou seja, encostando o nariz no outro, para sentir seu cheiro.
- **Frequência de passar sobre ou sob o outro animal**, quando um dos animais passa por cima ou por baixo do outro rato que está parado ou em movimento.
- **Frequência de montas no parceiro**, classificado quando um animal sobe no dorso do outro, sempre no sentido caudal-cranial, com auxílio de suas patas anteriores.

- **Duração do tempo gasto perseguindo o parceiro (tempo em segundos)**, computado pelo tempo que um dos animais persegue o outro, ou seja, se movimenta em direção ao outro, quando o animal perseguido também está se movimentando.
- **Locomoção (tempo em segundos)** é o tempo que o animal passa se movimentando de maneira exploratória na gaiola, sem qualquer tipo de interação com o outro rato.

Todos os parâmetros do comportamento de brincar, exceto o *pinning*, foram observados individualmente para os animais isolados.

O comportamento de *pinning* é considerado como o comportamento de brincar propriamente dito. Os comportamentos de farejar, passar sobre ou sob o outro, de montar e perseguir são considerados como investigações e solicitações de brincar.

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

Fonte: KIRSTEN, T. B., 2012

3.9.2 Avaliação da interação social da prole feminina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal

Ratas fêmeas também foram avaliadas para interações sociais na idade adulta. As interações sociais foram analisadas como previamente reportado (KIRSTEN et al., 2010a). Resumidamente, no PND 54–59, 24 filhotes fêmeas dos grupos controle e LPS (um filhote de cada ninhada experimental e controle, $n = 12$ para cada grupo) foram isolados imediatamente após a confirmação na fase de estro (detecção por lavado vaginal, explicado no item 3.2.). Os animais permaneceram nessas condições nas gaiolas-moradia (38 x 32 x 16 cm) por seis dias. No PND 60–65, uma fêmea do grupo LPS ou controle isolada em estro foi confrontada com uma fêmea adulta naïve em estro que estava previamente agrupada (a diferença do peso foi menor que 10 gramas). Seus comportamentos foram gravados por 5 minutos em uma nova gaiola-moradia com maravalha. Antes do teste, os animais permaneceram por 5 minutos na sala teste para adaptação. Os parâmetros avaliados foram: **tempo gasto em farejar o parceiro (tempo em segundos)**, **frequência de passar sobre ou sob o outro animal**, **frequência de montas no parceiro**, **duração do tempo gasto perseguido o parceiro (tempo em segundos)**, e **locomotoção (tempo em segundos)** já definidos no item 3.9.1. Os pareamentos foram realizados no período das 9h00 – 11h00. Todos os parâmetros foram observados individualmente para os animais isolados.

3.9.3 Dosagem dos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio da prole feminina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS

No PND 60, 20 ratas adultas expostas pré-natalmente ao LPS ou a salina ($n = 10$ para ambos os grupos), um filhote de cada ninhada, não utilizados em outros experimentos, foram avaliados quanto à dosagem dos **níveis séricos de corticosterona** avaliados por radioimunoensaio como descrito anteriormente no item 3.6.6. Resumidamente, a coleta do sangue das ratas foi realizada no período das 9h45 às 10h30 90 minutos após um desafio com LPS. Após decapitação, coletou-se o sangue, que foi centrifugado para obtenção do soro. As dosagens para quantificação de corticosterona foram realizadas por radioimunoensaio em fase

sólida utilizando-se o kit comercial Coat-a-Count (DPC®, Los Angeles, CA, USA) específico. A leitura da radioatividade remanescente desta reação feita no contador automático de radiação gama (Packard®). Os resultados finais das contagens por minutos foram expressos em ng/mL.

Os seguintes parâmetros de validação foram registrados: coeficiente de variação intraensaio de 5,48%; e limite de detecção de 2,87 ng/mL.

3.10 Delineamento experimental

Seguindo a ordem cronológica dos eventos, primeiramente foi realizado o acasalamento das ratas fêmeas adultas, que tinham o GD 0 identificado por meio de lavado vaginal. No GD 0, essas ratas foram mantidas isoladas nas suas gaiolas moradia durante toda a gestação, passando pelo tratamento com solução de LPS ou salina no GD 9,5. Ainda durante a gestação, foram dosados nessas mães os níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio, além da verificação do desempenho reprodutivo e avaliação do tecido placentário.

Após o nascimento da prole exposta ou não ao LPS pré-natal, foi realizada a padronização das ninhadas (PND 2) e uma série de experimentos comportamentais, imunológicos, neuroendócrinos e cerebrais em diferentes períodos da infância e idade adulta, em machos e fêmeas. Os experimentos realizados foram: avaliação da comunicação por meio da vocalização ultrassônica, avaliação do comportamento de brincar, avaliação da interação social, avaliação da resposta frente a um estímulo olfativo aversivo, avaliação da atividade geral em campo aberto, avaliação da memória espacial e comportamento repetitivo/restrito no teste de alternância espontânea no labirinto em T, quantificação de citocinas pró-inflamatórias séricas avaliadas por ELISA, dosagem dos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio e avaliação da expressão proteica por imunohistoquímica do sistema dopaminérgico e células gliais do estriado. Mais ainda, foi realizada a avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real do sistema dopaminérgico do estriado e bulbo olfatório e avaliação da expressão proteica por *immunoblotting* do sistema dopaminérgico e células gliais do estriado e bulbo olfatório.

É importante destacar que em cada um dos experimentos maternos e na prole, foram utilizados animais diferentes, e no caso da prole também ninhadas diferentes.

Toda sequência dos experimentos realizados nos animais está esquematizada na figura a seguir (Figura 12).

Figura 12 - Delineamento dos experimentos realizados, desde a determinação do dia zero de gestação (GD 0) das ratas, passando pelo tratamento com LPS ou salina, experimentos nas gestantes, nascimento da prole no dia de vida pós-natal (PND) 1 e experimentos na prole jovem ou adulta, machos ou fêmeas, lembrando que cada experimento foi realizado com animais diferentes

3.11 Análise estatística

Um filhote de cada ninhada foi utilizado como unidade nos estudos da prole para evitar efeitos de ninhada. O *software* GraphPad Prism 5.00 (GraphPad® Software, Inc., San Diego, CA, USA) foi utilizado para a análise estatística. Primeiramente verificou-se a homocedasticidade dos dados pelo teste de Bartlett ou teste F (para avaliação da distribuição Gaussiana). A normalidade foi verificada pelo teste de Kolmogorov e Smirnov. O teste estatístico empregado para análises de dados paramétricos entre os dois grupos (SAL e LPS) foi o teste *t* de Student (não pareado e bicaudal). Para os dados paramétricos com análises de três ou quatro grupos (ex: grupos SAL, LPS, SAL+LPS e LPS+LPS) foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Dados não paramétricos com análises de dois grupos (SAL e LPS) foram analisados pelo teste *U* de Mann-Whitney. Para os dados não paramétricos de quatro grupos (SAL, LPS, SAL+LPS e LPS+LPS), como no caso de escores, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. O nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado suficiente para mostrar diferenças significativas em todos os dados analisados. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão (EP), porcentagens ou mediana (mínimo e máximo).

Resultados

4 RESULTADOS

O item resultados, bem como o material e métodos é apresentado seguindo a divisão dos experimentos em quatro blocos, de acordo com os objetivos propostos no presente trabalho.

4.1 Bloco I: LPS pré-natal como modelo experimental de autismo na prole masculina de ratas

4.1.1 Avaliação da comunicação da prole masculina infante de ratas expostas ao LPS pré-natal por meio da vocalização ultrassônica

A tabela 1 mostra e a figura 13 ilustra os efeitos do LPS pré-natal na vocalização ultrassônica da prole masculina de ratas. Os filhotes machos do grupo LPS emitiram menos vocalizações ultrassônicas que seus respectivos controles durante a realização do teste ($p = 0,0239$). A latência para a primeira vocalização ultrassônica não diferiu entre os grupos controle e LPS ($p = 0,9235$).

Esses resultados mostram que os filhotes expostos pré-natalmente ao LPS chamaram menos, isto é, solicitaram menos suas mães quando estavam isolados.

Tabela 1 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nas vocalizações ultrassônicas da prole masculina infante de ratas no PND 11. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal. Os valores são representados como média ± EP. $n = 10$ para ambos os grupos

Parâmetros	Grupo SAL	Grupo LPS
Número de vocalizações ultrassônicas	98,50 ± 15,29	56,00 ± 7,94 *
Latência para a primeira vocalização (tempo em s)	28,70 ± 20,23	26,20 ± 15,80

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

Figura 13 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no número de vocalizações ultrassônicas da prole masculina infante de ratas no PND 11. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Teste t de Student). Os valores são representados como média ± EP. $n = 10$ para ambos os grupos

4.1.2 Avaliação da resposta da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal frente a um estímulo olfativo aversivo

A tabela 2 mostra e a figura 14 ilustra os efeitos do LPS pré-natal na resposta da prole masculina de ratas frente a um estímulo olfativo aversivo, o odor de gato. De acordo com a análise estatística ANOVA de uma via, foram encontradas diferenças quanto ao tempo de contato com o tecido ($F(2/21) = 6,54, p < 0,0062$), sendo que o pós-teste de comparações múltiplas, mostrou redução no tempo de contato com o tecido somente no grupo controle (SAL), comparado aos dados do grupo neutro ($p = 0,0062$), mas não quando foi comparado o grupo LPS ao neutro ($p > 0,05$). Também foram detectadas diferenças quanto ao número de contatos com o tecido ($F(2/21) = 22,79, p < 0,0001$), sendo que o pós-teste de comparações múltiplas, mostrou redução no número de contatos com o tecido no grupo controle, comparado aos dados do grupo neutro ($p < 0,0001$), bem como redução no grupo LPS, comparado aos dados do grupo neutro ($p < 0,0001$).

Entretanto, os eventos de abrigamento não foram diferentes entre os grupos neutro, controle e LPS (tempo de abrigamento $F(2/21) = 3,10, p = 0,0663$ e número de abrigamentos $F(2/21) = 0,37, p = 0,6978$).

Os resultados no teste de exposição ao odor de gato mostram que os filhotes expostos pré-natalmente ao LPS apresentaram menor aversão frente a um estímulo olfativo aversivo, uma vez que o tempo de contato com o tecido do grupo LPS foi igual ao do grupo neutro (sem odor de gato) e maior que do controle (com odor de gato).

Tabela 2 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) sob um estímulo olfativo aversivo na prole masculina adulta de ratas no PND 60. Neutro = animais naive expostos a um tecido sem odor de gato; SAL = salina pré-natal, expostos a um tecido com odor de gato; LPS = LPS pré-natal, expostos a um tecido com odor de gato. Os valores são representados como média ± EP. $n = 8$ para ambos os grupos

Parâmetros	Grupo neutro	Grupo SAL	Grupo LPS
Tempo (s) de contato com o tecido	26,88 ± 4,80	9,25 ± 2,47 **	14,75 ± 2,85
Número de contatos com o tecido	15,00 ± 1,69	4,37 ± 1,03 ***	5,37 ± 0,78 ***
Tempo (s) de abrigoamento	85,25 ± 18,16	140,13 ± 15,76	120,25 ± 13,04
Número de abrigoamentos	4,88 ± 0,48	4,88 ± 0,81	5,50 ± 0,42

ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey

** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$ comparado com o grupo neutro

Figura 14 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no tempo em contato com tecido impregnado com odor de gato (estímulo olfativo aversivo) na prole masculina adulta de ratas no PND 60. Neutro = animais naive expostos a um tecido sem odor de gato; SAL = salina pré-natal, expostos a um tecido com odor de gato; LPS = LPS pré-natal, expostos a um tecido com odor de gato. ** $p < 0,01$ comparado com o grupo neutro (ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey). Os valores são representados como média ± EP. $n = 8$ para ambos os grupos

4.1.3 Avaliação da atividade geral em campo aberto da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS

A tabela 3 mostra e a figura 15 ilustra os efeitos do LPS pré-natal na atividade geral em campo aberto prole masculina adulta de ratas após desafio com LPS. De acordo com a ANOVA de uma via, foram detectadas diferenças em ambos os parâmetros avaliados: distância percorrida ($F(3/30) = 19, p = 0,0001$) e frequência de levantar ($F(3/30) = 19, p = 0,0001$) nos ratos tratados pré-natalmente com LPS ou salina e desafiados com LPS na idade adulta. O pós-teste de comparações múltiplas não revelou diferenças entre o grupo LPS pré-natal e salina pré-natal (SAL). Entretanto, os ratos tratados pré-natalmente com salina e desafiados com LPS na idade adulta apresentaram atividade locomotora e frequência de levantar reduzidas, comparados aos grupos não desafiados com LPS. Os ratos tratados pré-natalmente com LPS e que receberam o desafio de LPS na idade adulta também apresentaram decréscimo na atividade locomotora e frequência de levantar comparados aos ratos não desafiados com LPS na idade adulta. Mais do que isso, esses ratos tratados pré-natalmente com LPS e que receberam o desafio de LPS na idade adulta foram ainda mais prejudicados que aqueles que foram tratados pré-natalmente com salina e desafiados com LPS na idade adulta, uma vez que os animais LPS+LPS apresentaram prejuízo nos dois parâmetros da atividade geral, quando comparados também com os SAL+LPS.

Os resultados no teste da avaliação do comportamento em campo aberto mostram que a prole exposta pré-natalmente ao LPS apresentaram menor atividade geral após o desafio imune na idade adulta, com efeito direto do desafio. A exposição pré-natal ao LPS *per se* não influenciou a atividade geral.

Tabela 3 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na atividade geral em campo aberto da prole masculina adulta de ratas no PND 60 após desafio com LPS. SAL = salina pré-natal ($n = 9$), LPS = LPS pré-natal ($n = 9$), SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS ($n = 8$), LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS ($n = 8$). Os valores são representados como média $\pm$ EP

Parâmetros	Grupos			
	SAL	LPS	SAL+LPS	LPS+LPS
Distância	3062,82 $\pm$	3085,47 $\pm$	2335,05 $\pm$	1416,44 $\pm$
percorrida (cm)	69,73	219,04	180,81 *, #	214,75 ***, ###, \$\$
Frequência de	29,33 $\pm$	30,00 $\pm$	21,38 $\pm$	11,75 $\pm$
levantar	0,83	1,21	3,13 *, #	2,18 ***, ###, \$

ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey

* $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ comparado com o grupo SAL

$p < 0,05$ e ### $p < 0,0001$ comparado com o grupo LPS

\$ $p < 0,05$ e \$\$ $p < 0,01$ comparado com o grupo SAL+LPS

Figura 15 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na atividade geral em campo aberto da prole masculina adulta de ratas no PND 60 após desafio com LPS. SAL = salina pré-natal ($n = 9$), LPS = LPS pré-natal ($n = 9$), SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS ($n = 8$), LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS ($n = 8$). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ comparado com o grupo SAL; # $p < 0,05$ e ### $p < 0,0001$ comparado com o grupo LPS; \$ $p < 0,05$ e \$\$ $p < 0,01$ comparado com o grupo SAL+LPS (ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey). Os valores são representados como média $\pm$ EP

4.1.4 Avaliação da memória espacial e comportamento repetitivo/restrito no teste de alternância espontânea no labirinto em T da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS

A tabela 4 mostra e a figura 16 ilustra os efeitos do LPS pré-natal na memória espacial e comportamento repetitivo/restrito avaliados no teste de alternância espontânea no labirinto em T na prole masculina adulta de ratas após desafio com LPS. De acordo com o teste de Kruskal-Wallis, foram detectadas diferenças quanto ao número de acertos no labirinto em T ($KW = 14,85$, $p = 0,0019$). Segundo o pós-teste de comparações múltiplas, não foram encontradas diferenças nos escores de acerto entre os grupos SAL, LPS e SAL+LPS. Porém, o grupo LPS+LPS apresentou significativamente menos acertos que o grupo SAL ($p < 0,05$) e particularmente que o grupo LPS ($p < 0,01$). Assim, o LPS pré-natal prejudicou a alternância no labirinto em T, pois o grupo SAL+LPS (desafiado com LPS antes do teste) não apresentou diferenças, comparado aos grupos SAL e LPS, diferente do grupo LPS+LPS que errou mais as entradas nos braços do labirinto, comparado aos grupos SAL e LPS.

Também foram encontradas diferenças quanto à frequência de levantar no labirinto em T ($F(3/28) = 27,11$, $p < 0,0001$, Tabela 4), sendo que o pós-teste de comparações múltiplas, mostrou redução no levantar: 1) no grupo controle que foi tratado na idade adulta com LPS (SAL+LPS), comparado aos dados do grupo controle (SAL, $p < 0,0001$); 2) no grupo tratado pré-natalmente e desafiado na idade adulta com LPS (LPS+LPS), comparado aos dados do grupo controle (SAL, $p < 0,0001$); 3) no grupo SAL+LPS, comparado aos dados do grupo LPS ($p < 0,0001$); e 4) no grupo LPS+LPS, comparado aos dados do grupo LPS ($p < 0,0001$). Em outras palavras, esses dados apontam para uma redução do levantar nos animais tratados com LPS 90 minutos antes do teste (grupos SAL+LPS e LPS+LPS), comparado aos dados dos animais tratados pré-natalmente com LPS ou com salina.

Os resultados no teste de alternância espontânea no labirinto em T (número de acertos) mostram que a prole exposta pré-natalmente ao LPS apresentaram prejuízos na memória espacial e comportamento repetitivo/restrito. Porém, a atividade exploratória (frequência de levantar) não foi alterada pela exposição pré-natal ao LPS, sendo prejudicada somente após desafio com LPS na idade adulta.

Tabela 4 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na memória espacial e comportamento repetitivo/restrito avaliados no teste de alternância espontânea no labirinto em T na prole masculina adulta de ratas no PND 60-67 após desafio com LPS. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal, SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS, LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS. Os valores são representados como mediana (mínimo e máximo) para o escore e média ± EP para a frequência. *n* = 8 para ambos os grupos

Parâmetros	Grupos			
	SAL	LPS	SAL+LPS	LPS+LPS
Número de acertos (escore)	1,0 (0,0 – 2,0)	2,0 (0,0 – 2,0)	0,0 (0,0 – 2,0)	0,0 (0,0 – 1,0) *,##
Frequência de levantar	7,50 ± 0,89	9,25 ± 0,65	1,63 ± 0,71 ***,###	2,2 ± 0,65 ***,###

Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para o escore e ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey para a frequência

* $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ comparado com o grupo SAL

$p < 0,01$ e ### $p < 0,0001$ comparado com o grupo LPS

Figura 16 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no número de acertos no teste de alternância espontânea no labirinto em T para avaliação da memória espacial e comportamento repetitivo/restrito na prole masculina adulta de ratas no PND 60-67 após desafio com LPS. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal, SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS, LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS. Barras pretas = acertos; Barras cinza = erros. * $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ## $p < 0,01$ comparado com o grupo LPS (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn). Os valores são representados como porcentagem de acertos e erros. $n = 8$ para ambos os grupos

4.1.5 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias séricas avaliadas por ELISA da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS

A tabela 5 mostra e a figura 17 ilustra os efeitos do LPS pré-natal nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias avaliados por ELISA na prole masculina adulta de ratas após desafio com LPS. Os níveis das citocinas em alguns animais não foram detectados devido ao limite de detecção dos kits. Dessa forma, o número de animais empregados neste experimento passou para sete para os quatro grupos, tanto para IL-1 β quanto para TNF- α . Além disso, os níveis de IL-1 β e TNF- α não foram detectáveis nos animais que não foram submetidos a desafio com LPS na idade adulta 90 minutos antes do teste, ou seja, nos grupos SAL e LPS. Desta forma, estes dois grupos não foram incluídos nas análises estatísticas. Por outro lado, os níveis dessas duas citocinas foram detectados e avaliados nos grupos SAL+LPS e LPS+LPS.

Assim, de acordo com o teste t de Student, o nível de IL-1 β aumentou de forma significativa nos animais tratados pré-natalmente com LPS e desafiados com LPS na idade adulta (LPS+LPS), comparado aos dados do grupo tratado pré-natalmente com salina e desafiado na idade adulta com LPS (SAL+LPS, $p = 0,0406$). Entretanto, os níveis de TNF- α não foram modificados comparando-se os grupos SAL+LPS e LPS+LPS ($p = 0,8911$).

Os resultados na quantificação de citocinas pró-inflamatórias séricas mostram que a prole exposta pré-natalmente ao LPS apresentaram maiores níveis de IL-1 β e não de TNF- α após uma situação de desafio imune.

Tabela 5 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α avaliados por ELISA da prole masculina adulta de ratas no PND 60-67 após desafio com LPS. SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS, LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS. Os valores são representados como média ± EP. $n = 7$ para ambos os grupos

Citocinas (pg/mL)	Grupo SAL+LPS	Grupo LPS+LPS
IL-1β	239,53 ± 58,10	511,73 ± 103,45 *
TNF-α	1021,10 ± 310,68	972,03 ± 163,38

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

Figura 17 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis séricos da citocina pró-inflamatória IL-1β avaliados por ELISA da prole masculina adulta de ratas no PND 60-67 após desafio com LPS. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal, SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS, LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS. * $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL+LPS (Teste t de Student). Os valores são representados como média ± EP. $n = 7$ para ambos os grupos

4.1.6 Dosagem dos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS

A tabela 6 mostra e a figura 18 ilustra os efeitos do LPS pré-natal nos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio na prole masculina adulta de ratas após desafio com LPS. De acordo com a ANOVA de uma via, foram detectadas diferenças nos níveis séricos de corticosterona ($F(3/36) = 5,54, p = 0,0031$). O pós-teste de comparações múltiplas não revelou diferenças entre os grupos LPS pré-natal e salina pré-natal (SAL). Da mesma forma, não existiram diferenças estatísticas entre os grupos desafiados com LPS, isto é, entre os grupos SAL+LPS e LPS+LPS. Por outro lado, foram encontradas diferenças entre os grupos desafiados e não desafiados com LPS: os níveis de corticosterona foram maiores nos grupos SAL+LPS e LPS+LPS, comparado aos dados dos grupos SAL e LPS ($p < 0,05$ para SAL versus SAL+LPS, SAL versus LPS+LPS, LPS versus SAL+LPS e LPS versus LPS+LPS).

Os resultados deste experimento mostram que a prole exposta pré-natalmente ao LPS não apresentou uma alteração anormal nos níveis séricos de corticosterona após uma situação de desafio imune na idade adulta, uma vez que os grupos com e sem desafio não se diferiam entre si, ocorrendo apenas o aumento de corticosterona após desafio com LPS.

Tabela 6 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio da prole masculina adulta de ratas no PND 60-67 após desafio com LPS. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal, SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS, LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS. Os valores são representados como média ± EP. $n = 10$ para ambos os grupos

	Grupos			
	SAL	LPS	SAL+LPS	LPS+LPS
Corticosterona	120,76 ±	120,48 ±	425,63 ±	403,13 ±
(ng/mL)	34,96	34,07	99,15 *, #	92,83 *, #

ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey

* $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL

$p < 0,05$ comparado com o grupo LPS

Figura 18 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio da prole masculina adulta de ratas no PND 60-67 após desafio com LPS. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal, SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS, LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS. * $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL e # $p < 0,05$ comparado com o grupo LPS (ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey). Os valores são representados como média ± EP. $n = 10$ para ambos os grupos

4.2 Bloco II: Mecanismos centrais associados ao LPS pré-natal na prole masculina de ratas

4.2.1 Avaliação da expressão proteica por imunohistoquímica do sistema dopaminérgico e células gliais no estriado da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal

A figura 19 ilustra os efeitos do LPS pré-natal na expressão proteica avaliada por imunohistoquímica do sistema dopaminérgico (TH e receptores D1a e D2) e células gliais (GFAP e OX-42) no estriado da prole masculina de ratas.

A imunorreatividade para TH e para os receptores D1a e D2 no estriado apareceu exclusivamente em neurópila. Já em relação às células da glia os dois anticorpos utilizados produziram marcação na célula como um todo.

Não foram encontradas aparentes alterações na expressão de TH, GFAP, OX-42 ou dos receptores dopaminérgicos D1a e D2 do estriado na análise qualitativa por imunohistoquímica. Além disso, não ocorreram alterações morfológicas nos astrócitos e na micróglia.

Figura 19 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na expressão proteica avaliada por imunohistoquímica do sistema dopaminérgico (TH = tirosina hidroxilase; D1a = receptor dopaminérgico D1a; e D2 = receptor dopaminérgico D2) e células gliais (GFAP = proteína glial fibrilar ácida, marcador de astrócito; e OX-42 = marcador de micróglia) no estriado da prole masculina adulta de ratas no PND 60. Imagens digitais de cortes coronais. Notar que não existem aparentes diferenças na expressão e na morfologia dessas proteínas entre os grupos

4.2.2 Avaliação da expressão proteica por immunoblotting do sistema dopaminérgico e células gliais no estriado e bulbo olfatório da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal

A tabela 7 mostra e figura 20 ilustra os efeitos do LPS pré-natal na expressão proteica avaliada por *immunoblotting* do sistema dopaminérgico (TH e receptores D1a e D2) e células gliais (GFAP e OX-42) no estriado e bulbo olfatório da prole masculina de ratas.

Os machos adultos que foram tratados pré-natalmente com LPS apresentaram redução dos níveis de TH estriatal, com respeito ao grupo controle ($p = 0,0009$). Entretanto, não foram encontradas diferenças para D1a, D2, GFAP ou OX-42 comparando os dois grupos ($p > 0,05$).

No bulbo olfatório, não foram encontradas diferenças entre os grupos para nenhuma proteína avaliada ($p > 0,05$ para as avaliações de TH, D1a, D2, GFAP e OX-42).

Tabela 7 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na expressão proteica (média da razão da densidade óptica em relação à β -actina) avaliada por *immunoblotting* do sistema dopaminérgico (TH = tirosina hidroxilase; D1a = receptor dopaminérgico D1a; e D2 = receptor dopaminérgico D2) e células gliais (GFAP = proteína glial fibrilar ácida, marcador de astrócito; e OX-42 = marcador de micróglia) no estriado e bulbo olfatório da prole masculina adulta de ratas no PND 60. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal. Os valores são representados como média $\pm$ EP. $n = 6-8$ para ambos os grupos

Proteína	Grupo SAL	Grupo LPS	<i>p</i>
Estriado			
TH	1,003 $\pm$ 0,039	0,759 $\pm$ 0,039 ***	0,0009
D1a	1,024 $\pm$ 0,118	1,225 $\pm$ 0,171	0,3533
D2	1,010 $\pm$ 0,054	0,967 $\pm$ 0,064	0,6174
GFAP	0,998 $\pm$ 0,032	1,001 $\pm$ 0,129	0,9848
OX-42	0,970 $\pm$ 0,156	0,654 $\pm$ 0,170	0,1955
Bulbo olfatório			
TH	1,000 $\pm$ 0,119	0,886 $\pm$ 0,132	0,5380
D1a	1,000 $\pm$ 0,082	0,994 $\pm$ 0,216	0,9805
D2	1,000 $\pm$ 0,129	0,743 $\pm$ 0,079	0,1106
GFAP	1,000 $\pm$ 0,090	0,997 $\pm$ 0,138	0,9879
OX-42	1,000 $\pm$ 0,120	1,085 $\pm$ 0,114	0,6162

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

Figura 20 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na expressão proteica (média da razão da densidade óptica em relação à β -actina) avaliada por *immunoblotting* do sistema dopaminérgico (TH = tirosina hidroxilase; D1a = receptor dopaminérgico D1a; e D2 = receptor dopaminérgico D2) e células gliais (GFAP = proteína glial fibrilar ácida, marcador de astrócito; e OX-42 = marcador de micróglia) no estriado da prole masculina adulta de ratas no PND 60. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal. *** $p < 0,001$ comparado com o grupo SAL (Teste t de Student). Os valores são representados como média $\pm$ EP. $n = 6-8$ para ambos os grupos

4.2.3 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real do sistema dopaminérgico no estriado e bulbo olfatório da prole masculina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal

A tabela 8 mostra os efeitos do LPS pré-natal na expressão gênica avaliada por PCR em tempo real do sistema dopaminérgico (TH e receptores D1a e D2) no estriado e bulbo olfatório da prole masculina de ratas.

O tratamento pré-natal com LPS não alterou a expressão gênica de TH, D1a e D2 tanto no estriado como no bulbo olfatório, comparando aos dados do grupo controle ($p > 0,05$ para todas as análises).

Tabela 8 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na expressão gênica (razões normalizadas) avaliada por PCR em tempo real do sistema dopaminérgico (TH = tirosina hidroxilase; D1a = receptor dopaminérgico D1a; e D2 = receptor dopaminérgico D2) no estriado e bulbo olfatório da prole masculina adulta de ratas no PND 60. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal. Os valores são representados como média ± EP. *n* = 6-7 para ambos os grupos

RNA mensageiro	Grupo SAL	Grupo LPS	<i>p</i>
Estriado			
TH	1,115 ± 0,311	1,061 ± 0,226	0,8111
D1a	1,203 ± 0,313	1,006 ± 0,155	0,5863
D2	1,136 ± 0,244	0,947 ± 0,204	0,5676
Bulbo olfatório			
TH	0,958 ± 0,072	1,456 ± 0,227	0,0770
D1a	1,019 ± 0,092	1,128 ± 0,165	0,5782
D2	1,013 ± 0,066	0,944 ± 0,120	0,6108

Teste *t* de Student

4.3 Bloco III: Alterações maternas induzidas pelo LPS pré-natal

4.3.1 Dosagem dos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio de ratas expostas ao LPS durante a gestação

A tabela 9 mostra e a figura 21 ilustra os efeitos do LPS nos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio nas ratas expostas ao LPS durante a gestação. O grupo exposto ao LPS 90 minutos antes da coleta apresentou aumento nos níveis de corticosterona, comparado aos dados do grupo controle ($p > 0,0001$).

Os dados deste experimento mostram que a exposição ao LPS na gestação acarretou em elevação nos níveis séricos de corticosterona nas ratas.

Tabela 9 - Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio nas ratas expostas a esta endotoxina durante a gestação. Coleta do sangue 90 minutos após a exposição ao LPS (*n* = 9) ou a salina (SAL, *n* = 8). Os valores são representados como média ± EP

	Grupo SAL	Grupo LPS
Corticosterona (ng/mL)	278,40 ± 46,70	772,51 ± 42,60 ***

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

Figura 21 - Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio nas ratas expostas a esta endotoxina durante a gestação. Coleta do sangue 90 minutos após a exposição ao LPS (*n* = 9) ou a salina (SAL, *n* = 8). *** *p* < 0,0001 comparado com o grupo SAL (Teste *t* de Student). Os valores são representados como média ± EP

4.3.2 Desempenho reprodutivo e avaliação do tecido placentário de ratas expostas ao LPS durante a gestação

A tabela 10 mostra e a figura 22 ilustra os efeitos do LPS no desempenho reprodutivo das ratas expostas ao LPS durante a gestação. A porcentagem de perda pós-implantação foi maior no grupo exposto ao LPS durante a gestação, comparado aos dados do grupo controle ($p > 0,0438$). Concordando com este dado, a porcentagem de fetos vivos foi menor no grupo LPS ($p > 0,0438$). Não foi observada nenhuma alteração estatisticamente significativa entre os grupos SAL e LPS na porcentagem de perda pré-implantação ($p > 0,6868$) e na taxa de implantação ($p > 0,6868$).

As figuras 23, 24 e 25 ilustram os efeitos do LPS no tecido placentário (cortes histológicos analisados em microscopia óptica de luz) das ratas expostas ao LPS durante a gestação.

A figura 23 ilustra a morfologia de uma placenta do grupo controle (salina). Em uma visão panorâmica (Figura 23A) reconhece-se a região da placa coriônica, a zona labiríntica e a zona juncional. Nesta última ainda podem ser identificadas as células do espongiotrofoblasto que incluem as células de glicogênio de aspecto vacuolizado devido à extração artefactual destas moléculas, células de citoplasma basófilo e as células gigantes trofoblásticas que limitam a interface materno-fetal e fazem contato direto com a decídua e vasos endometriais. Em 23B um detalhe da região labiríntica, responsável pelas trocas entre os organismos materno e fetal. O sangue materno está extravasado nos espaços labirínticos revestidos por trofoblasto e o fetal contido em capilares fetais. Hemácias nucleadas são frequentes nos capilares fetais, assim como figuras de mitose indicando crescimento da vasculatura placentária. Em aumento maior (Figura 23C) notar a barreira materno-fetal que separa o sangue fetal do sangue materno, composta pelo capilar fetal e pelas camadas de células trofoblásticas. Na figura 23D, observa-se a interface de contato com a decídua; notar o tecido conjuntivo endometrial muito celular e com vasos na face materna da placenta e em contato direto com as células trofoblásticas gigantes. Na região juncional (Figura 23E) destacam-se a presença das células de glicogênio, das células basófilas do espongiotrofoblasto, além das células gigantes em contato com a decídua. A figura 23F mostra células gigantes circundando um grupo de células de glicogênio.

Nas placentas das ratas que receberam LPS (Figuras 24 e 25), notam-se diferenças na face materna (decídua) e fetal (zona labiríntica e juncional) desta estrutura. As principais alterações encontradas estão abaixo relacionadas:

As alterações observadas foram muito mais acentuadas e evidentes na região juncional (Figura 24). Esta região pareceu estar hipertrofiada no grupo experimental, principalmente pela presença de grande quantidade de cistos de dimensões variadas, alguns se estendendo por grande parte da zona juncional (Figuras 24A e B). Apesar desta hipertrofia, houve clara diminuição no compartimento de células de glicogênio. Além disto, a presença de poucas destas células no interior dos cistos, que apresentavam aspecto hialino e se coravam muito fracamente pela eosina, sugere que estes cistos se formaram no interior destes grupamentos celulares (Figuras 24D e F). Por outro lado, parte destes cistos continha também sangue materno extravasado (Figuras 24G e H); em alguns cistos eram encontrados sangue e material amorfo (Figura 24G) e em outros, apenas sangue extravasado (Figura 24H). Células trofoblásticas gigantes com atividade eritrofagocítica foram frequentemente observadas nas placentas dos grupos experimentais (Figura 24D). Na face materna da placenta observaram-se células deciduais de núcleo picnótico e fragmentado, intensamente corados pela hematoxilina (Figura 24C). Estas imagens são compatíveis com processos degenerativos. Células com estas características também foram encontradas nas placentas do grupo controle, mas apenas ocasionalmente e não na alta frequência observada nos animais do grupo experimental. Além disto, a presença de focos hemorrágicos (grandes bolsões de sangue materno aparentemente extravasado) em contato com as células trofoblásticas da interface materno-fetal também foram frequentes (Figura 24B), assim como a presença de infiltrados leucocitários, compostos principalmente de neutrófilos (Figura 24B).

As alterações encontradas na região do labirinto das ratas tratadas com LPS compreendem (Figura 25): (1) uma maior quantidade de sangue materno extravasado nos espaços labirínticos (Figura 25A); (2) a evidente presença de uma maior quantidade de leucócitos neste sangue materno (Figura 25B); e (3) um maior espessamento da barreira materno-fetal, aparentemente por um aumento do volume citoplasmático das células trofoblásticas (Figura 25C).

Os dados deste experimento mostram que antes da exposição ao LPS, a gestação das ratas foi normal quando avaliado os parâmetros reprodutivos (perda pré-implantação e taxa de implantação). Porém, após a exposição ao LPS, ocorreu prejuízo nos parâmetros

reprodutivos (perda pós-implantação e fetos vivos). Da mesma maneira, o tecido placentário apresentou uma série de danos após a exposição ao LPS.

Tabela 10 - Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no desempenho reprodutivo das ratas expostas a esta endotoxina durante a gestação. Cirurgias realizadas no GD 16. SAL = grupo controle tratado com salina; LPS = grupo exposto ao LPS. Os valores são representados como mediana (mínimo e máximo). $n = 6$ para ambos os grupos

Parâmetros	Grupo SAL	Grupo LPS
% de perda pré-implantação	9,25 (0,00 - 15,38)	10,80 (0,00 – 25,00)
% de perda pós-implantação	2,65 (0,00 - 18,18)	14,49 (11,11 – 33,33) *
% de taxa de implantação	90,75 (84,62 – 100,00)	89,20 (75,00 – 100,00)
% de fetos vivos	97,35 (81,82 – 100,00)	85,52 (66,67 – 88,89) *

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

Figura 22 - Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no desempenho reprodutivo das ratas expostas a esta endotoxina durante a gestação. Cirurgias realizadas no GD 16. SAL = grupo controle tratado com salina; LPS = grupo exposto ao LPS. * $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL (Teste U de Mann-Whitney). Os valores são representados como mediana e distribuição dos valores individuais do grupo. $n = 6$ para ambos os grupos

Figura 23 - Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no tecido placentário das ratas expostas a esta endotoxina durante a gestação. Cirurgias realizadas no GD 16. Fotomicrografia do corte histológico do tecido placentário de ratas do grupo controle (SAL). HE; (A) 100x; (B, D e E) 200x; (C e F) 400x. pc: placa coriônica; ZL: zona labiríntica; ZJ: zona juncional; gl: células de glicogênio; g: células trofoblásticas gigantes; D: decídua; —: barreira materno-fetal; sm: sangue materno; *: hemácias maternas; cf: capilar fetal; t: camadas de células trofoblásticas; vm: vasos maternos; et: espongiotrofoblasto; ponta da seta: fagossomos

Figura 24 - Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no tecido placentário das ratas expostas a esta endotoxina durante a gestação. Cirurgias realizadas no GD 16. Fotomicrografia do corte histológico da zona juncional do tecido placentário de ratas do grupo LPS. HE; (A) 100x; (C, E e G) 200x; (B, D, F e H) 400x. ZJ: zona juncional; L: labirinto; gl: células de glicogênio; g: células trofoblásticas gigantes; D: decídua; et: espongiotrofoblasto; ponta da seta: fagossomos; **: sangue materno extravasado; seta interrompida: infiltrado leucocitário; *: cistos de material amorfo

Figura 25 - Efeitos da exposição ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no tecido placentário das ratas expostas a esta endotoxina durante a gestação. Cirurgias realizadas no GD 16. Fotomicrografia do corte histológico da zona do labirinto do tecido placentário de ratas do grupo LPS. HE; (A) 100x; (C) 200x; (B) 400x. *: sangue materno extravasado; ponta da seta: leucócitos; —: barreira materno-fetal; sm: sangue materno; cf: capilar fetal; g: células trofoblásticas gigantes

4.4 Bloco IV: Efeitos induzidos pelo LPS pré-natal na prole feminina de ratas

4.4.1 Avaliação do comportamento de brincar da prole feminina jovem de ratas expostas ao LPS pré-natal

A tabela 11 mostra os efeitos do LPS pré-natal no comportamento de brincar da prole feminina de ratas. Nenhum dos parâmetros avaliados no comportamento de brincar foi alterado estatisticamente nas fêmeas do grupo LPS, comparados aos dados dos animais do grupo controle (SAL, $p > 0,05$ para todos os parâmetros).

Os resultados deste experimento mostram que, diferentemente dos irmãos machos que foram prejudicados pelo LPS pré-natal, as fêmeas não apresentaram interferências no comportamento de brincar.

Tabela 11 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) no comportamento de brincar da prole feminina jovem de ratas no PND 30. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal. Os valores são representados como média ± EP. $n = 12$ para ambos os grupos

Parâmetros	Grupo SAL	Grupo LPS	p
Frequência de <i>pinning</i>	4,08 ± 0,83	4,00 ± 0,91	0,9468
Farejar o parceiro (tempo em segundos)	246,75 ± 27,83	230,50 ± 25,95	0,6734
Frequência de passar sobre ou sob o outro animal	14,17 ± 2,39	15,50 ± 1,72	0,6557
Frequência de montas no parceiro	1,92 ± 0,47	2,67 ± 0,41	0,2430
Perseguir o parceiro (tempo em segundos)	18,22 ± 1,74	16,45 ± 1,57	0,4578
Locomoção (tempo em segundos)	229,56 ± 30,97	218,59 ± 27,59	0,7938

Teste t de Student

4.4.2 Avaliação da interação social da prole feminina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal

A tabela 12 mostra os efeitos do LPS pré-natal na interação social da prole feminina adulta de ratas. Nenhum dos parâmetros avaliados na interação social foi alterado estatisticamente nas fêmeas do grupo LPS, comparados aos dados dos animais do grupo controle (SAL, $p > 0,05$ para todos os parâmetros).

Os resultados deste experimento mostram que, diferentemente dos irmãos machos que foram prejudicados pelo LPS pré-natal, as fêmeas não apresentaram interferências na interação social adulta.

Tabela 12 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) na interação social da prole feminina adulta de ratas no PND 60-65. SAL = salina pré-natal, LPS = LPS pré-natal. Os valores são representados como média ± EP. $n = 12$ para ambos os grupos

Parâmetros	Grupo SAL	Grupo LPS	p
Farejar o parceiro (tempo em segundos)	68,26 ± 9,30	62,70 ± 9,01	0,6716
Frequência de passar sobre ou sob o outro animal	9,42 ± 1,53	7,67 ± 0,86	0,3313
Frequência de montas no parceiro	2,50 ± 0,48	1,58 ± 0,60	0,2455
Perseguir o parceiro (tempo em segundos)	19,79 ± 2,71	17,10 ± 2,42	0,4684
Locomoção (tempo em segundos)	38,41 ± 4,24	44,17 ± 6,58	0,4698

Teste t de Student

4.4.3 Dosagem dos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio da prole feminina adulta de ratas expostas ao LPS pré-natal após desafio com LPS

A tabela 13 mostra os efeitos do LPS pré-natal nos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio na prole feminina adulta de ratas. Não foram encontradas alterações nos níveis de corticosterona entre os grupos controle (SAL+LPS) e LPS+LPS 90 minutos após o desafio com LPS ($p = 0,6141$).

Os dados deste experimento mostram que, assim como nos irmãos machos, a exposição pré-natal ao LPS não alterou os níveis séricos de corticosterona após uma situação de desafio imune na idade adulta.

Tabela 13 - Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) nos níveis séricos de corticosterona avaliados por radioimunoensaio da prole feminina adulta de ratas no PND 60. Coleta do sangue 90 minutos após o desafio com LPS. SAL+LPS = salina pré-natal e desafio com LPS, LPS+LPS = LPS pré-natal e desafio com LPS. Os valores são representados como média ± EP. $n = 10$ para ambos os grupos

	Grupo SAL+LPS	Grupo LPS+LPS
Corticosterona (ng/mL)	796,12 ± 127,10	697,33 ± 144,61

Teste t de Student

Discussão

5 DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostraram que a exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) reduziu o número de chamados ultrassônicos dos filhotes para as suas mães, prejudicou a alternância no labirinto em T, reduziu a aversão ao odor de gato e elevou os níveis de IL-1 β na prole masculina, comparado aos dados dos respectivos grupos controles.

Parte dos testes comportamentais empregados neste trabalho já foi usada e validada em outros modelos animais para avaliação de sintomas tipo autismo. O teste da vocalização ultrassônica é considerado válido para avaliar a redução da solicitação de comunicação dos filhotes com suas mães, revelando prejuízos emocionais, como os que ocorrem em autistas (HARMON et al., 2008). Portanto, o dado de redução da vocalização dos ratos expostos pré-natalmente ao LPS pode ser entendido como um prejuízo na comunicação, similar ao que acontece no autismo.

O teste de alternância espontânea no labirinto em T também já foi empregado em outros estudos para avaliar prejuízos do tipo autista em modelos animais, levando em consideração que autistas apresentam resistência a mudanças, comportamentos repetitivos e inflexibilidade cognitiva (DSM-IV, 1994). No caso do labirinto em T, os animais apresentam insistência de visita à mesma localização espacial, discutido experimentalmente como sintoma de autismo (CRAWLEY, 2007; MOY et al., 2008b; MACFABE et al., 2011). Assim, o LPS pré-natal causou comportamentos repetitivos e inflexibilidade cognitiva, similares aos que são encontrados em autistas.

Já o uso de um estímulo olfativo aversivo para avaliar a ausência de demonstração de medo em situações potencialmente perigosas que ocorre em autistas (DSM-IV, 1994) não havia sido empregado anteriormente em modelos animais de autismo. Esse teste foi proposto utilizando como estímulo olfativo aversivo o odor de gato, tendo em mente que o gato é o predador natural do rato, e, portanto, o gato deve causar aversão e medo ao rato, por instintos de sobrevivência.

Com relação ao uso do teste do odor de gato como ferramenta para avaliar modelos animais de autismo, pôde-se concluir que esse teste foi eficaz para esse fim, inclusive, pois a metodologia empregada foi bem sucedida, desde que os dados dos animais do grupo controle e daqueles do grupo neutro foram estatisticamente diferentes, tanto para a frequência como para o tempo de contato com o tecido com o odor de gato. Assim como

esperado, os animais do grupo controle expostos ao odor de gato, diminuíram o contato com o tecido, comparado aos animais “brancos” (grupo neutro), expostos somente a um tecido sem qualquer odor de gato. Portanto, os animais do grupo controle expostos ao odor de gato, demonstraram medo pelo odor de seu predador (ZANGROSSI; FILE, 1992). Além disso, foi demonstrado que o LPS pré-natal fez com que os animais não encarassem o odor de gato como estímulo aversivo, uma vez que o tempo de contato com o tecido impregnado com odor de gato dos animais do grupo LPS não diferiu estatisticamente daquele dos animais do grupo neutro (que não possuía odor de gato), enquanto que os animais do grupo controle diferiram do grupo neutro. Assim, o LPS pré-natal, resultou em ausência de demonstração de medo em situações potencialmente perigosas, como ocorre em autistas.

Esses dados demonstram que os animais expostos pré-natalmente ao LPS apresentaram prejuízos na comunicação, no aprendizado e memória espacial, além de apresentarem comportamento repetitivo/restrito e ausência de demonstração de medo em situações potencialmente perigosas. O conjunto desses comportamentos, somado aos nossos dados previamente publicados do mesmo tratamento de LPS pré-natal prejudicando o comportamento de brincar e a interação social na idade adulta (KIRSTEN et al., 2010a) pode ser diagnosticado em humanos como o autismo (DSM-IV, 1994; LANDRIGAN, 2010). Portanto, observamos que nosso modelo de LPS pré-natal induziu comportamentos do tipo autismo em ratos.

O fato do nosso modelo de LPS pré-natal induzir experimentalmente sintomas tipo autismo concorda com a hipótese de o autismo também poder ser causado por fatores ambientais, como o caso de infecções pré-natais virais, além dos fatores genéticos (MEYER; FELDON; FATEMI, 2009; BOKSA, 2010). Mais ainda, acrescenta de maneira inédita um modelo que mimetiza uma infecção bacteriana no início da gestação como indutor do autismo.

Outro dado obtido neste trabalho que corrobora com os sintomas tipo autismo e com a corrente ambiental (ou neuroimune) do autismo foram os achados de elevação nos níveis da citocina pró-inflamatória de IL-1 β nos animais expostos pré-natalmente ao LPS. A esse respeito, existem estudos que demonstram níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias em pacientes autistas, tanto em amostras do soro, como no líquido cerebrospinal e em diversas regiões cerebrais (PARDO; VARGAS; ZIMMERMAN, 2005; CHEZ et al., 2007). Inclusive já foi reportado o aumento específico dos níveis séricos de IL-1 em pacientes autistas (AL-AYADHI, 2005).

Embora tenhamos encontrado vários sintomas similares ao autismo a partir da exposição pré-natal ao LPS, como prejuízos na socialização (KIRSTEN et al., 2010a), na comunicação, no aprendizado e memória espacial, além de apresentarem comportamento repetitivo/restrito e ausência de demonstração de medo em situações potencialmente perigosas, não foi observado hiperatividade nesses animais, sintoma que ocorre em alguns autistas (DSM-IV, 1994). O LPS pré-natal não alterou a atividade geral em campo aberto, comparado ao grupo controle. Pelo contrário, quando esses animais do grupo LPS receberam um desafio imune na idade adulta, apresentaram redução na atividade geral, comparado a todos os outros grupos, inclusive ao grupo controle pré-natal desafiado na idade adulta.

Esses dados de não hiperatividade não podem desqualificar o nosso modelo de LPS pré-natal como modelo animal de autismo por dois motivos. O primeiro deles é que o autismo é parte do TEA, um amplo espectro de desordens do desenvolvimento conhecido como transtornos globais do desenvolvimento com um "amplo fenótipo" (DSM-IV, 1994). Assim, pacientes não necessariamente precisam apresentar todos os sintomas clínicos para serem diagnosticados com o TEA ou autismo (RUTTER; SCHOPLER, 1992; VOLKMAR et al., 2004). O segundo motivo é que em outros modelos animais reconhecidos como de autismo nem sempre é observada a hiperatividade. Por exemplo, camundongos *knockout* *Ehmt1*(+/-) heterozigoto (gene que causa a síndrome de deleção subtelomérica 9q34.3) que apresentam comportamentos do tipo autismo, como a redução na socialização, apresentam redução na atividade geral e exploração em campo aberto (BALEMANS et al., 2010), assim como o observado no presente estudo.

A exposição pré-natal ao LPS não alterou os níveis séricos de corticosterona em uma situação basal nem após um desafio imune. Embora existam relatos de pacientes autistas apresentarem maior atividade do eixo HPA, com maior concentração de cortisol na saliva (JANSEN et al., 2003), os achados com relação ao estudo do eixo HPA em autistas são bastante heterogêneos e até mesmo contraditórios. Isso porque também existem diversos relatos de pacientes autistas que não apresentam qualquer alteração no eixo, avaliado pelos níveis de cortisol (SANDMAN et al., 1991; NIR et al., 1995), além de estudos apontarem para uma redução na atividade do eixo HPA dos autistas, com a redução nos níveis do hormônio adrenocorticotrópico e de cortisol (HERMAN et al., 1988; CURIN et al., 2003). Portanto, embora existam evidências que o autismo está ligado a alterações do eixo HPA, essa correlação ainda está obscura.

É proposto que os efeitos da exposição maternal ao LPS no desenvolvimento do cérebro fetal são mediados não diretamente pelo LPS, mas pela indução de citocinas e glicocorticóides na circulação materna e placenta (CAI et al., 2000; URAKUBO et al., 2001; ASHDOWN et al., 2006; SMITH et al., 2007). A exposição pré-natal ao LPS aumenta os níveis de citocinas e glicocorticóides no cérebro fetal (GAYLE et al., 2004; HAVA et al., 2006). Dessa forma, os níveis elevados de citocinas e glicocorticóides no feto são os potenciais responsáveis pelos prejuízos encontrados na prole exposta pré-natalmente ao LPS. Entretanto, no presente trabalho os glicocorticóides provavelmente não devem ter prejudicado o desenvolvimento do cérebro *in utero*. Isso porque é sabido que o eixo HPA se desenvolve somente entre os GDs 15 e 21 (COYLE et al., 2009), que é pelo menos cinco dias após a exposição ao LPS do presente trabalho (no GD 9,5). Os presentes resultados indicando preservação do eixo HPA e elevação dos níveis da citocina IL-1 β na prole adulta reforçam essa hipótese. Portanto, o LPS pré-natal deve ter causado os sintomas tipo autismo nos ratos pela indução de citocinas na circulação materna, que chegaram até o feto e afetaram seu desenvolvimento.

A respeito do fato de não ter sido encontrado alterações nos níveis de TNF- α e somente elevação de IL-1 β , sabe-se que a IL-1 β é o principal mediador responsável pelas alterações comportamentais com infecções e inflamações (LARSON; DUNN, 2001), além de desempenhar papel fundamental na geração do comportamento doentio (AVITSUR; COHEN; YIRMIYA, 1997; LARSON; DUNN, 2001). Mais do que isso, é o mediador predominante do comportamento doentio no cérebro (DANTZER, 2006). Alguns experimentos comprovam a importância da IL-1 β neste contexto: (1) sua administração induz o comportamento doentio da mesma maneira (sintomatologia e alterações cerebrais) que o LPS induz (DANTZER, 2004); e (2) a administração do antagonista do receptor para IL-1, o IL-1Ra, reduz ou até mesmo impede o comportamento doentio dos animais (ARAKAWA; BLANDINO; DEAK, 2009). Por outro lado, é sabido que o TNF não é um mediador tão importante envolvido nas alterações comportamentais ou ativação do eixo HPA (SWIERGIEL et al., 1997; LARSON; DUNN, 2001; DUNN, 2006). O TNF está mais relacionado a exposições em altas doses de LPS, que podem induzir choque séptico, ou ainda a estressores crônicos e câncer (SWIERGIEL; DUNN, 1999; DUNN, 2006; CAUWELS; BROUCKAERT, 2007). Dessa forma, a ausência de alterações quanto ao nível de TNF- α seria esperada no presente tratamento com LPS, uma vez que a exposição é aguda e em uma dose considerada mediana (AVITSUR; POLLAK; YIRMIYA, 1997).

Os presentes achados do LPS pré-natal podem ser interpretados como uma exacerbação do comportamento doentio nesses animais, uma vez que o comportamento doentio é definido por um conjunto de alterações, incluindo a diminuição da atividade exploratória, da interação social, do comportamento sexual, perda de apetite, anedonia e prejuízos cognitivos e no aprendizado, acompanhado pela elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (LARSON; DUNN, 2001; DANTZER, 2004). Nossos achados justamente revelaram que os animais expostos pré-natalmente ao LPS apresentaram diminuição da atividade exploratória, da interação social, prejuízos cognitivos e no aprendizado, além de elevação dos níveis de IL-1 β . Pelos conhecimentos supracitados da função da IL-1 β , os achados de comportamento doentio são creditados a elevação nos níveis de IL-1 β .

Uma vez estabelecido que nosso modelo de exposição pré-natal ao LPS é um modelo experimental de autismo, por induzir uma série de alterações comportamentais e imunes similares àsquelas encontradas em pacientes autistas, portanto efeitos tipo autismo, foi estudado a seguir os mecanismos centrais associados ao LPS pré-natal que poderiam explicar o motivo dessas alterações. Presentemente, foi escolhido estudar a expressão gênica e proteica do sistema dopaminérgico do estriado e do bulbo olfatório baseado nos nossos achados prévios. Previamente nosso grupo analisou extensamente os encéfalos dos animais expostos pré-natalmente ao LPS, utilizando diversas técnicas, incluindo análises histológicas (hematoxilina-eosina), determinação dos níveis de monoaminas e *turnover* (cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC), e expressões proteicas qualitativa (imunohistoquímica) e quantitativa (*immunoblotting*) e gênica (PCR em tempo real) em todo o encéfalo, incluindo o cerebelo, estriado, hipotálamo, córtex frontal, hipocampo e bulbo olfatório. Nossos resultados demonstraram que a exposição pré-natal ao LPS diminui os níveis de dopamina no estriado e no bulbo olfatório, sem alterar os sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos (KIRSTEN, 2008; KIRSTEN et al., 2010b; KIRSTEN et al., 2010a; TARICANO, 2010; KIRSTEN et al., 2011). Dessa forma, foi escolhido o aprofundamento do estudo do sistema dopaminérgico do estriado e do bulbo olfatório. Nossos presentes resultados mostram a redução da expressão de tirosina hidroxilase estriatal nos animais tratados pré-natalmente com LPS. Esses resultados, combinados com nossas quantificações prévias de diminuição nos níveis de dopamina e metabólitos estriatais sugerem que o sistema dopaminérgico estriatal está prejudicado no modelo experimental de autismo induzido por LPS. O prejuízo do sistema dopaminérgico estriatal ocorreu provavelmente devido a um prejuízo na síntese de dopamina, pois a tirosina hidroxilase é a primeira enzima na via de biossíntese de dopamina (BAKER, H. et al., 2003).

Concordando com esses resultados, Ling et al. (2002) mostraram que o tratamento pré-natal com LPS no dia embrionário 10,5 reduziu a dopamina estriatal e levou a perda de células tirosina hidroxilase imunoreativas no mesencéfalo, sugerindo que os ratos tratados com LPS devem ter uma perda permanente de neurônios dopaminérgicos. De fato, a exposição pré-natal ao LPS, que frequentemente ocorre em humanos devido à vaginose bacteriana, leva ao nascimento de animais com menos neurônios dopaminérgicos que o normal (LING et al., 2009). Além disso, o LPS pré-natal aumenta os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α no fluido corioamniótico (LING et al., 2002). O LPS é um potente indutor de TNF- α , o qual mata neurônios dopaminérgicos em cultura (MCGUIRE et al., 2001). Esses dados são similares aos nossos achados comportamentais e neuroquímicos.

Entretanto, existem algumas importantes diferenças entre os estudos de Ling et al. (2002) e os nossos dados. Primeiro, nós usamos uma dose muito menor do LPS (100 μ g/kg vs. 1 mg/kg). Segundo, eles reportaram somente alterações na infância (PND 21), enquanto que nós demonstramos que o LPS também afeta o comportamento e o cérebro na idade adulta. Finalmente, eles encontraram um aumento da atividade de dopamina, isto é, a razão metabólito/neurotransmissor, enquanto que nós não observamos diferença na atividade da dopamina (KIRSTEN et al., 2010b).

Nossos resultados de *immunoblotting* revelaram um decréscimo de 24% nos níveis de tirosina hidroxilase nos ratos que foram expostos pré-natalmente com LPS. Entretanto, os mesmos resultados não foram observados na imunohistoquímica. Essa diferença deve ter ocorrido devido a peculiaridades da técnica de imunohistoquímica, como revisto por Leong e colaboradores (2010). A imunohistoquímica é fundamentalmente uma técnica qualitativa, especialmente quando a marcação é difusa, como a tirosina hidroxilase no estriado.

A técnica de PCR detectou RNA mensageiro de tirosina hidroxilase no estriado dos ratos. O RNA mensageiro de tirosina hidroxilase, o qual não foi alterado após a exposição pré-natal ao LPS, pode ser proveniente de uma pequena circuitaria dopaminérgica intrínseca estriatal (HUOT; PARENT, 2007). Diferentes modelos animais, como da doença de Parkinson, apresentam massiva perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra compacta (SNc), que acarretam em grande decréscimo de dopamina no estriado. Esses estudos também reportam um aumento no número de neurônios intrínsecos tirosina hidroxilase+ no estriado depletado de dopamina (PORRITT et al., 2000). No presente estudo, devido à redução de dopamina ter sido discreta, ela pode não ter sido suficiente para alterar a

expressão gênica da tirosina hidroxilase no estriado. A pequena redução de dopamina no estriado também deve explicar a falta de variação na expressão dos receptores D1a e D2, uma vez que era esperado um aumento na expressão desses receptores, similar ao reportado na doença de Parkinson (GUTTMAN, 1992).

A falta de variação no RNA mensageiro da tirosina hidroxilase combinado com a diminuição dos níveis proteicos de TH no estriado do grupo LPS pré-natal e por tudo já mencionado da ligação do estriado com a substância negra, nos leva a especular que nossos resultados poderiam ser consequência de eventos ocorrendo na SNc. É importante ressaltar que a injeção de LPS na SNc de ratos é considerada como indutora de degeneração de neurônios dopaminérgicos via um forte processo neuroinflamatório, que acarreta em um modelo animal de doença de Parkinson (DUTTA; ZHANG; LIU, 2008). Porém, em nosso estudo, a exposição ao LPS foi pré-natal, e, aparentemente, não ocorreu nenhuma alteração nas células gliais dos adultos, indicando a ausência de processos neuroinflamatórios permanentes no estriado e no bulbo olfatório dos ratos adultos. Esses achados são diferentes do estudo que usou uma administração aguda de LPS, que demonstrou que o número de astrócitos e micróglia aumentou, e essas células foram ativadas após infecção ou um desafio imunológico (BJORKLUNG; LINDVALL, 1984). O processo neuroinflamatório da exposição pré-natal ao LPS deve ter ocorrido durante o desenvolvimento fetal, quando os animais são expostos ao LPS. Por exemplo, a exposição intrauterina ao LPS (GD 15 ou 18,5) promove danos cerebrais no feto, como evidenciado pelas alterações na expressão de citocinas e injúrias neuronais (ELOVITZ et al., 2011).

Presentemente, foi demonstrado que a exposição pré-natal ao LPS induziu hipoativação do sistema dopaminérgico estriatal. Existem diversas hipóteses neurológicas para o autismo, sendo a mais disseminada a de hiperserotonemia (NARITA, N. et al., 2002). Entretanto, os níveis de serotonina se mostraram inalterados após exposição pré-natal ao LPS (KIRSTEN, 2008). Existe também uma hipótese dopaminérgica, que sugere que uma hiperativação do sistema dopaminérgico leva ao autismo (NAKASATO et al., 2008). O fato de o autismo ser definido como apresentando um “fenótipo amplo” (VOLKMAR et al., 2004) deve explicar as variadas manifestações neurológicas que vem sendo reportadas. A importância do estabelecimento do modelo experimental de autismo com o LPS pré-natal é um passo extra para o melhor entendimento dessa desordem, lembrando que o exato mecanismo que leva ao desenvolvimento do autismo ainda é desconhecido. Nosso modelo revelou alterações em diferentes categorias comportamentais, como na comunicação,

socialização e cognição a partir de uma única ativação imune materna no início da gestação. Além disso, os presentes estudos também incluíram a hipoatividade do sistema dopaminérgico como um possível aspecto para explicar o TEA.

Apesar da redução da expressão proteica de tirosina hidroxilase no estriado, que foi acompanhada pela redução dos níveis de dopamina estriatal nos animais expostos ao LPS pré-natal (KIRSTEN et al., 2010b), não foram encontradas alterações proteicas ou genéticas no bulbo olfatório para tirosina hidroxilase e para os receptores dopaminérgicos D1a e D2 mesmo com a redução dos níveis de dopamina no bulbo olfatório (KIRSTEN et al., 2011). De acordo com Cave e Baker (2009), a expressão de tirosina hidroxilase no bulbo olfatório é restrita a camada glomerular, onde interneurônios dopaminérgicos são encontrados. Assim, a produção de dopamina por interneurônios dopaminérgicos no bulbo olfatório não deve estar alterada. Sendo esse o caso, os níveis reduzidos de dopamina encontrados no bulbo olfatório não devem ser consequência de um prejuízo dopaminérgico no bulbo propriamente, mas um prejuízo dopaminérgico em fibras aferentes do sistema dopaminérgico olfatório, e/ou em outra área cerebral, como a zona subventricular e o sistema mesolímbocortical. A esse respeito, diante de nossos outros achados de prejuízos dopaminérgicos estriatais e a já citada ligação com o sistema mesolímbocortical e a substância negra, é tentador especular que essas regiões cerebrais estão relacionadas com a redução dos níveis de dopamina observados no estriado e no bulbo olfatório. Desse modo, é interesse investigarmos em estudos futuros estas regiões cerebrais em nosso modelo de infecção pré-natal.

Poderia se especular que as alterações encontradas nos animais expostos ao LPS pré-natal no teste do estímulo olfativo aversivo estariam ligadas a alterações na ansiedade dos animais, uma vez que o teste de exposição ao odor de gato é também classicamente usado para avaliar a ansiedade dos roedores, isto é, normalmente os ratos apresentam uma resposta ansiogênica durante a exposição ao odor de gato, como a diminuição do contato com o tecido impregnado com odor de gato, inclusive sem habituação após diversas sessões (ZANGROSSI; FILE, 1992). Entretanto, nossos estudos prévios mostraram que o LPS pré-natal não alterou os parâmetros ligados a ansiedade, com relação aos controles, quando avaliados na atividade no labirinto em cruz elevado (KIRSTEN et al., 2010a), que é provavelmente o teste mais popular e aceito para avaliar ansiedade. Assim, baseado nesse fato e em outros achados comportamentais e neuroquímicos de prejuízos olfativos do nosso grupo, como a redução na preferência ao odor materno nos filhotes e a redução dos níveis de dopamina no bulbo olfatório (KIRSTEN et al., 2011), é provável que tenha ocorrido um

prejuízo olfativo e não diretamente na ansiedade desses animais expostos pré-natalmente ao LPS. É importante destacar que o teste de preferência ao odor materno foi realizado no PND 7, período neonatal onde os olhos ainda estão fechados nos ratos, enquanto que o sistema sensorial olfativo já está atuando, o qual é o primeiro a se tornar funcional (MORAES et al., 2004; SLOTNICK; SCHELLINCK; BROWN, 2005); dessa forma, o prejuízo encontrado neste teste foi estritamente olfativo.

Outra explicação para os presentes achados comportamentais além do prejuízo olfativo é que os ratos expostos pré-natalmente ao LPS teriam um prejuízo motivacional. Evidências que apoiam essa hipótese vêm dos achados que o LPS pré-natal prejudicou o interesse social na infância e na idade adulta por motivos de prejuízos motivacionais (KIRSTEN et al., 2010a). As alterações comportamentais não podem ser atribuídas a prejuízos motores já que a atividade motora desses animais foi extensamente avaliada durante o mestrado e foi considerada intacta: o LPS pré-natal não alterou a atividade geral em campo aberto na infância nem na idade adulta, assim como não interferiu com a catatonia induzida por haloperidol, nem com a estereotipia induzida por apomorfina (KIRSTEN et al., 2010b). Por esses motivos e porque estímulos olfativos do gato e materno são ligados à sobrevivência do rato, portanto difíceis de serem ignorados, a hipótese de prejuízos motivacionais é reforçada. Mais ainda, é sabido que a dopamina é envolvida com o controle da motivação, além do seu envolvimento com a atividade motora (IKEMOTO, 2007). Os achados de redução de dopamina no estriado e bulbo olfatório são então consistentes com os prejuízos motivacionais em ratos expostos pré-natalmente ao LPS.

Após o estabelecimento do modelo de LPS pré-natal como modelo experimental de autismo, e do estudo dos mecanismos centrais associados aos prejuízos comportamentais, o presente estudo buscou avaliar as alterações maternas induzidas pelo LPS, para ajudar no entendimento da gênese dessas alterações. Foi observado que o LPS causou elevação nos níveis de corticosterona, prejudicou o desempenho reprodutivo e causou uma série de danos no tecido placentário das ratas.

Os resultados mostraram que 90 minutos após a exposição ao LPS, ocorreu aumento nos níveis séricos de corticosterona nas gestantes no GD 9,5. Esses achados já eram esperados, pois é fato conhecido que o LPS em contato com o organismo animal resulta, dentre outras coisas, na liberação de corticosterona, inclusive já verificado em administrações de 100 µg/kg de LPS, i.p., e também em dosagens 90 minutos após a injeção; dose e intervalo usados neste trabalho (LENCZOWSKI et al., 1997). Esses dados poderiam sugerir que a

elevação dos níveis de corticosterona no ambiente materno seria o responsável, ou ao menos um dos responsáveis pelos danos na prole. Isso porque, embora os glicocorticóides tenham a função básica de frear a ativação do sistema imune, portanto impedindo um efeito danoso de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores imunes no organismo, em níveis elevados, eles são prejudiciais ao indivíduo, sendo conhecidos como o hormônio do estresse, podendo inclusive causar danos ao sistema nervoso em desenvolvimento (SAPOLSKY, 2000). Porém, como já discutido, no presente trabalho os glicocorticóides provavelmente não devem ter perturbado o desenvolvimento do cérebro *in útero*, já que o eixo HPA se desenvolve somente entre os GDs 15 e 21 (COYLE et al., 2009), que é pelo menos cinco dias após a exposição ao LPS do presente trabalho (no GD 9,5). Os presentes resultados indicando preservação do eixo HPA na prole adulta exposta pré-natalmente ao LPS reforçam essa hipótese.

Quanto ao desempenho reprodutivo, tanto a perda pré-implantação como a taxa de implantação não foram afetadas após o tratamento com o LPS. Este resultado já era esperado, pois o tratamento com o LPS foi realizado no GD 9,5 e a implantação nas ratas ocorre nos GDs 5-6 (BERNARDI, 2006). Sendo assim, já havia ocorrido a implantação quando o tratamento foi realizado, impossibilitando qualquer alteração nesses parâmetros. Por outro lado, ocorreu maior perda pós-implantação e menor porcentagem de fetos vivos após exposição ao LPS. Esses prejuízos no desempenho reprodutivo após a exposição ao LPS vão de encontro com os dados descritos na literatura que dizem que o LPS induz uma série de prejuízos nos parâmetros reprodutivos, incluindo indução de aborto espontâneo, reabsorção embrionária e mortalidade intrauterina (AVITSUR; COHEN; YIRMIYA, 1997; XU et al., 2006; ZHAO et al., 2008). Nesse contexto, nos estudos prévios do mestrado, foi demonstrado que o LPS administrado na gestação reduziu o número de filhotes nascidos, apesar de não ter alterado o peso total e individual da prole, bem como não prejudicou o desenvolvimento físico e reflexológico dessa prole (KIRSTEN et al., 2010b; KIRSTEN et al., 2010a). Esses mesmos estudos mostraram que as ratas gestantes apresentaram o comportamento doentio verificado pela diminuição da atividade geral em campo aberto uma hora após a exposição ao LPS (KIRSTEN et al., 2010a); fato que comprova a eficiência da dose do LPS e que os efeitos são em decorrência da liberação das citocinas, que causam o comportamento doentio (DANTZER et al., 1998). Portanto, a exposição ao LPS não só prejudicou o comportamento, e o sistema neuroimune da prole exposta pré-natalmente a essa endotoxina, como prejudicou o desempenho reprodutivo das ratas expostas durante a gestação.

As alterações morfológicas encontradas no tecido placentário após o tratamento com LPS no GD 9,5 resumem-se a alterações na região juncional e na região do labirinto. (1) A região juncional encontrou-se hipertrofiada, principalmente pela presença de grande quantidade de cistos (com ou sem sangue e material amorfo), porém, com diminuição no compartimento de células de glicogênio, sugerindo que estes cistos se formaram no interior destes grupamentos celulares; processos degenerativos nas células decíduais; presença de focos hemorrágicos de sangue materno em contato com as células trofoblásticas da interface materno-fetal; e presença de infiltrados leucocitários, compostos principalmente de neutrófilos. (2) Na região do labirinto, observou-se uma maior quantidade de sangue materno extravasado nos espaços labirínticos; maior quantidade de leucócitos neste sangue materno; e um maior espessamento da barreira materno-fetal, aparentemente por um aumento do volume citoplasmático das células trofoblásticas.

O estudo morfológico do tecido placentário das ratas demonstrou ser uma boa metodologia para melhor entender os efeitos da exposição ao LPS em gestantes, pelo fato que tanto ratas como mulheres têm placentas do tipo hemocorial (ou endotelial), nas quais o trofoblasto rompe vasos sanguíneos endometriais e interagem diretamente com o sangue materno durante toda a gestação, e ambas são igualmente decíduais (KAUFMANN; BURTON, 1994; BERNARDI, 2006). É possível, portanto, fazer uma série de extrapolações para as infecções maternas em humanas gestantes e seus danos à prole.

A placenta tem funções como o transporte de alimentos, íons, metais e vitaminas, excreção, biotransformação e metabolização de substâncias exógenas, atividade endócrina (produção de diversos hormônios), manutenção da gestação, isolamento do feto/embrião do organismo materno para evitar rejeição e, finalmente, proteção dele. No entanto, a ideia que a placenta funciona como uma barreira a substâncias tóxicas exógenas não é de todo válida, pois, como qualquer barreira lipídica, permite que substâncias apolares a atravessem facilmente. Isso sem contar com o sistema de transporte ativo e difusão facilitada. Vale lembrar ainda, que é pouco provável que uma determinada substância seja detoxificada no próprio feto, devido à ausência de enzimas de biotransformação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; BERNARDI, 2006; GÓRNIK; SPINOSA; BERNARDI, 2008).

As áreas hemorrágicas e processos degenerativos encontrados nas células decíduais das ratas tratadas com LPS sugerem que ocorreu um efeito tóxico da endotoxina nas células placentárias (HALL, 1974; LEVARIO-CARRILLO et al., 2004). Creditam-se grande parte desses danos às citocinas pró-inflamatórias, uma vez que elas atravessam o tecido

placentário (URAKUBO et al., 2001; GOLAN et al., 2005; MEYER et al., 2005). Nesse sentido, é sabido que o TNF- α é sintetizado e secretado em cultura de células decíduais humanas em resposta ao tratamento com LPS e que citocinas produzidas em células decíduais do tipo macrófago devem ter papel fundamental na patogênese de partos prematuros (CASEY et al., 1989). Além do TNF- α , a IL-1 também pode ser grande responsável pelos danos placentários, uma vez que ambos são produzidos na placenta, resultando no aumento dos níveis *in situ*, e também podem agir de forma somatória, ou sinérgica (SILEN et al., 1989).

A produção e efeitos das citocinas são importantes para a regulação do crescimento celular, diferenciação e invasão do trofoblasto. Tecidos placentários e decíduais de gestantes normais expressam tanto citocinas pró- como anti-inflamatórias. Em gestações normais, particularmente na interface materno-fetal, ocorre predomínio de citocinas anti-inflamatórias Th2. A interleucina-2, o TNF- α e o interferon-gama, por exemplo, são suprimidos, com estimulação das interleucinas 4, 6 e 10. As citocinas pró-inflamatórias parecem ser nocivas para a gestação, associadas a prejuízos como partos prematuros e abortos (MOR; ABRAHAMS, 2003; GAYLE et al., 2004).

Somado as citocinas pró-inflamatórias, a expressão da enzima COX-2 é aumentada nas decíduas das ratas que sofrem administração i.p. de LPS no meio da gestação. Esta enzima leva a produção dos eicosanóides que também devem estar envolvidos nos efeitos lesivos (DUNN, 2006; WANG et al., 2006).

O papel das células leucocitárias decíduais na manutenção da gestação ainda não está elucidado. No presente estudo, houve aumento de infiltrado leucocitário, que sugere a supressão da resposta imune materna para o feto, limitando a invasão trofoblástica e prevenindo a transmissão de patógenos ao feto, sendo este um possível mecanismo de ajuste compensatório para manter um adequado intercâmbio metabólico na placenta (WEIS et al., 2007).

Os danos placentários encontrados nas ratas tratadas com LPS por prejudicar o papel funcional da placenta, podem ter contribuído com os eventos reprodutivos adversos observados (LEVARIO-CARRILLO et al., 2004; WEIS et al., 2007). Uma vez que os danos observados nas placentas das ratas tratadas com LPS na gestação correspondem a danos descritos em diversas infecções maternas e intrauterinas, inclusive com a administração de citocinas pró-inflamatórias (SILEN et al., 1989; BELL; HALLENBECK; GALLO, 2004; GAYLE et al., 2004), pôde-se mais uma vez sugerir que foram as citocinas pró-inflamatórias as responsáveis pelos danos placentários e consequentemente pelos danos na prole.

Somado aos prejuízos no desempenho reprodutivo e no tecido placentário, que estão ligados aos danos na prole expostas pré-natalmente ao LPS, poder-se-ia aventar que os presentes achados na prole seriam (também) em decorrência de prejuízos no cuidado materno nas ratas tratadas com LPS, pois é sabido que a exposição aguda ao LPS induz o comportamento doentio em ratos (LARSON; DUNN, 2001). Assim, as mães cuidariam menos de seus filhotes, prejudicando o desenvolvimento normal da prole (AUBERT et al., 1997; SILVA; BERNARDI; FELICIO, 2001). Entretanto, um experimento recentemente realizado em nosso laboratório mostrou uma leve melhora no comportamento materno nas ratas que receberam o mesmo tratamento do presente estudo, isto é, as mães expostas ao LPS na gestação buscaram mais rapidamente o primeiro filhote da ninhada após a separação dos mesmos (KIRSTEN et al., 2011). Consequentemente, os filhotes do grupo LPS receberam a mesma ou até mais atenção de suas mães que os controles. Portanto, podemos descartar interferências do comportamento materno como responsáveis pelos prejuízos encontrados nos filhotes. Esses dados levam mais uma vez a crer que os prejuízos na prole devem então ser consequência da liberação de mediadores imunológicos maternos após a exposição ao LPS, particularmente de citocinas pró-inflamatórias na circulação materna e placenta (URAKUBO et al., 2001).

O último bloco de experimentos realizados neste trabalho foi delineado para responder uma pergunta que surgiu após a confirmação do nosso modelo de LPS pré-natal como modelo animal de autismo. Apesar dos resultados comportamentais já serem bastante robustos como efeitos do tipo autismo, até então só se havia estudado a prole masculina exposta pré-natalmente ao LPS e não a prole feminina. Sabendo que o autismo é mais prevalente em homens do que em mulheres (FOMBONNE, 2009; THEOHARIDES; KEMPURAJ; REDWOOD, 2009), foi investigado também a ocorrência das alterações comportamentais em fêmeas. Os resultados mostraram que, ao contrário dos machos que apresentaram prejuízos na socialização na infância (comportamento de brincar) e na idade adulta (KIRSTEN et al., 2010a), as fêmeas expostas ao LPS pré-natal não apresentaram qualquer alteração na socialização juvenil e adulta. O LPS pré-natal apresentou um efeito sexualmente dimórfico, com maior sensibilidade dos machos. Assim, nosso modelo de LPS pré-natal tem mais um fator que o coloca como modelo animal de autismo, que é a maior prevalência nos machos, comparado às fêmeas.

O outro experimento realizado na prole feminina exposta pré-natalmente ao LPS foi a dosagem dos níveis séricos de corticosterona, que não apresentou alterações, comparado

ao grupo controle. Esse resultado está de acordo com os dados encontrados nos machos, isto é, machos e fêmeas expostos ao LPS pré-natal não apresentaram alterações nos níveis séricos de corticosterona após um desafio imune na idade adulta. Com esses achados, pôde-se concluir que o eixo HPA não deve estar alterado nos machos nem nas fêmeas após a exposição pré-natal ao LPS.

Apesar dos diferentes achados comportamentais e neuroimunes sugerirem fortemente que o presente modelo de LPS pré-natal é um modelo animal de autismo em ratos, poderia ser aventado que o modelo de LPS pré-natal estaria na verdade relacionado com outras desordens do desenvolvimento cerebral, especialmente a esquizofrenia, já que ambas compartilham alguns padrões comportamentais e origem similar ligada a fatores ambientais (MEYER; FELDON; FATEMI, 2009; BOKSA, 2010). Nesse contexto, existem diversas publicações correlacionando modelos animais experimentais com ativação imunológica maternal e o surgimento da esquizofrenia. Um modelo bem estabelecido é baseado no tratamento pré-natal com o polyI:C: exposições no início/meio (GD 9) e no final (GD 17) da gestação de camundongos são ferramentas experimentais poderosas em induzir e estudar as distintas anormalidades cerebrais e comportamentais que são respectivamente relevantes aos sintomas positivos e negativos/cognitivos da esquizofrenia (MEYER et al., 2006a; MEYER et al., 2006b; MEYER et al., 2008; MEYER; FELDON, 2012). Mais ainda, o tratamento pré-natal com LPS também tem sido amplamente utilizado como um modelo “revelador” de esquizofrenia, como descrito pelos grupos de Fortier e Romero (FORTIER et al., 2004; ROMERO, R. et al., 2007; ROMERO, E. et al., 2010). Entretanto, os tratamentos pré-natais com LPS empregados pelos grupos de Fortier e Romero são, respectivamente, ao final (GD 18 e 19) e durante toda a gestação (GD 0 a 20). Em nosso modelo, o tratamento com LPS foi administrado em uma única dose e cedo (no GD 9,5), similar a outros modelos experimentais de autismo com diferentes agentes, como a talidomida e o ácido valpróico (SCHNEIDER et al., 2008; NARITA, M. et al., 2010). Existem também consideráveis evidências epidemiológicas que ligam falhas no início do desenvolvimento cerebral fetal (isto é, em torno das primeiras semanas de gestação) ao maior risco de autismo (ARNDT; STODGELL; RODIER, 2005; LIBBEY et al., 2005; MILLER et al., 2005). Assim, a gênese de diferentes desordens do desenvolvimento cerebral deve depender do estágio da gestação no qual ocorre a ativação imune (MEYER; YEE; FELDON, 2007).

Outros fatores distanciam nossos presentes achados dos sintomas tipo esquizofrenia, e os aproximam dos sintomas tipo autismo: (1) enquanto que geralmente os

sintomas da esquizofrenia só aparecem no final da adolescência ou na idade adulta, o autismo já pode ser detectado nos primeiros meses de vida do indivíduo, permanecendo por toda a vida do paciente, assim como o ocorrido neste estudo, com prejuízos comportamentais encontrados já nos primeiros dias de vida dos ratos, permanecendo inclusive na idade adulta; (2) nosso modelo de LPS pré-natal foi avaliado em modelos clássicos de esquizofrenia e não de autismo, como estereotipia induzida por dopamiméticos e redução de catatonia induzida por haloperidol (TORDJMAN et al., 2007), mas esses animais não apresentaram quaisquer alterações nestes testes (KIRSTEN et al., 2010b); e (3) a esquizofrenia não apresenta alterações claras de manifestação entre os gêneros, mas o autismo é mais prevalente em homens, e essa maior prevalência de prejuízos nos machos foi replicada no modelo animal quando expostos pré-natalmente ao LPS. Portanto, o nosso modelo de exposição pré-natal ao LPS em ratos foi definido exclusivamente como modelo animal de autismo e não relacionado a outras desordens neuropsiquiátricas.

Desse modo, podemos concluir que nosso modelo de LPS pré-natal produziu resultados robustos de um modelo experimental de autismo por todos os achados comportamentais e imunológicos encontrados. Foi proposto também a hipoatividade do sistema dopaminérgico como responsável por essas alterações (Apêndice E). Mais ainda, apresenta de maneira inédita a proposta que uma infecção bacteriana no início da gestação pode ocasionar o autismo.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Os presentes resultados mostraram que a exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) prejudicou a comunicação, causou comportamentos repetitivos/restritos, inflexibilidade cognitiva e levou a ausência de demonstração de medo em situações potencialmente perigosas na prole masculina de ratas. Além disso, foi observado que as fêmeas não apresentaram os prejuízos comportamentais que foram observados nos machos. O conjunto desses comportamentos, somado aos nossos experimentos prévios de prejuízo na interação social na infância e na idade adulta (KIRSTEN et al., 2010a) e ao fato que o autismo é mais prevalente em machos (DSM-IV, 1994), sugerem fortemente que nosso modelo de LPS pré-natal induziu comportamentos do tipo autismo em ratos. Esses achados corroboram com a hipótese do autismo também poder ser causado por fatores ambientais, além dos fatores genéticos. Mais ainda, acrescenta de maneira inédita um modelo que mimetiza uma infecção bacteriana no início da gestação como indutor do autismo. A elevação nos níveis de IL-1 β nos animais expostos ao LPS pré-natal explica ao menos em parte as alterações comportamentais e corrobora com a corrente ambiental (neuroimune) do autismo.

Mais ainda, o LPS pré-natal reduziu a expressão proteica de tirosina hidroxilase estriatal. Esses resultados, combinados com nossas quantificações prévias de diminuição nos níveis de dopamina e metabólitos estriatais (KIRSTEN et al., 2010b) sugerem que o sistema dopaminérgico estriatal está prejudicado no modelo experimental de autismo induzido por LPS.

Os estudos nas mães expostas durante a gestação ao LPS revelaram elevação nos níveis de corticosterona, prejuízo no desempenho reprodutivo e danos no tecido placentário das ratas, que ajudam no entendimento da gênese dos prejuízos na prole exposta pré-natalmente ao LPS.

Nosso modelo revelou alterações em diferentes categorias comportamentais a partir de uma única ativação imune materna no início da gestação. Além disso, os presentes estudos também incluíram a hipoatividade do sistema dopaminérgico como um possível aspecto para explicar o TEA. O estabelecimento do modelo experimental de autismo com o LPS pré-natal significa mais um passo para entender essa desordem, lembrando que o exato mecanismo que leva ao desenvolvimento do autismo ainda é desconhecido.

Um dos frutos que podemos colher com este estudo é a aplicação deste modelo animal de autismo a diferentes intervenções farmacológicas e neuroimunes para buscar a eventual prevenção ou tratamento do autismo, que é uma desordem que ainda não possui tratamentos e medicações considerados satisfatórios no seu combate.

Referências

REFERÊNCIAS

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

AL-AYADHI, L. Y. Pro-inflammatory cytokines in autistic children in central Saudi Arabia. **Neurosciences (Riyadh)**, v. 10, n. 2, p. 155-158, 2005.

ANDREWS, N.; BARNES, N. M.; STEWARD, L. J.; WEST, K. E.; CUNNINGHAM, J.; WU, P. Y.; ZANGROSSI, H., JR.; FILE, S. E. A comparison of rat brain amino acid and monoamine content in diazepam withdrawal and after exposure to a phobic stimulus. **British Journal of Pharmacology**, v. 109, n. 1, p. 171-174, 1993.

ARAKAWA, H.; BLANDINO, P., JR.; DEAK, T. Central infusion of interleukin-1 receptor antagonist blocks the reduction in social behavior produced by prior stressor exposure. **Physiology & Behavior**, v. 98, n. 1-2, p. 139-146, 2009.

ARNDT, T. L.; STODGELL, C. J.; RODIER, P. M. The teratology of autism. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 2-3, p. 189-199, 2005.

ASHDOWN, H.; DUMONT, Y.; NG, M.; POOLE, S.; BOKSA, P.; LUHESHI, G. N. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 47-55, 2006.

ATLADOTTIR, H. O.; THORSEN, P.; OSTERGAARD, L.; SCHENDEL, D. E.; LEMCKE, S.; ABDALLAH, M.; PARNER, E. T. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 40, n. 12, p. 1423-1430, 2010.

AUBERT, A.; GOODALL, G.; DANTZER, R.; GHEUSI, G. Differential effects of lipopolysaccharide on pup retrieving and nest building in lactating mice. **Brain Behavior and Immunity**, v. 11, n. 2, p. 107-118, 1997.

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

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

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

BAIRD, G.; SIMONOFF, E.; PICKLES, A.; CHANDLER, S.; LOUCAS, T.; MELDRUM, D.; CHARMAN, T. Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population cohort of children in South Thames: the Special Needs and Autism Project (SNAP). **Lancet**, v. 368, n. 9531, p. 210-215, 2006.

BAKER, H.; KOBAYASHI, K.; OKANO, H.; SAINO-SAITO, S. Cortical and striatal expression of tyrosine hydroxylase mRNA in neonatal and adult mice. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 23, n. 4-5, p. 507-518, 2003.

BAKER, S.; CHEBLI, M.; REES, S.; LEMAREC, N.; GODBOUT, R.; BIELAJEW, C. Effects of gestational stress: 1. Evaluation of maternal and juvenile offspring behavior. **Brain Research**, v. 1213, p. 98-110, 2008.

BALEMANS, M. C.; HUIBERS, M. M.; EIKELNBOOM, N. W.; KUIPERS, A. J.; VAN SUMMEREN, R. C.; PIJPERS, M. M.; TACHIBANA, M.; SHINKAI, Y.; VAN BOKHOVEN, H.; VAN DER ZEE, C. E. Reduced exploration, increased anxiety, and altered social behavior: Autistic-like features of euchromatin histone methyltransferase 1 heterozygous knockout mice. **Behavioural Brain Research**, v. 208, n. 1, p. 47-55, 2010.

BAMBINI-JUNIOR, V.; RODRIGUES, L.; BEHR, G. A.; MOREIRA, J. C.; RIESGO, R.; GOTTFRIED, C. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters. **Brain Research**, v. 1408, p. 8-16, 2011.

BELL, M. J.; HALLENBECK, J. M.; GALLO, V. Determining the fetal inflammatory response in an experimental model of intrauterine inflammation in rats. **Pediatric Research**, v. 56, n. 4, p. 541-546, 2004.

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

BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; TRINDADE, M. O. Sobre o autismo, neuroinflamação e modelos animais para o estudo de autismo: uma revisão. **Revista Neurociências**, v. 20, n. 1, p. 117-127, 2012.

BJORKLUNG, A.; LINDVALL, E. Dopamine-containing systems in the CNS. In: BJORKLUND, A.; HOKFELT, T. (Ed.). **Handbook of chemical neuroanatomy vol 2: Classical transmitters in the CNS, part I**. Amsterdam: Elsevier, 1984. p. 55-111.

BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. **Brain Behavior and Immunity**, v. 24, n. 6, p. 881-897, 2010.

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

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Estrutura celular. In: BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. (Ed.). **Jawetz, Melnick & Adelberg: microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 6-30.

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

BRUNELLI, S. A.; KEATING, C. C.; HAMILTON, N. A.; HOFER, M. A. Development of ultrasonic vocalization responses in genetically heterogeneous National Institute of Health (N:NIH) rats. I. Influence of age, testing experience, and associated factors. **Developmental Psychobiology**, v. 29, n. 6, p. 507-516, 1996.

BRUNELLI, S. A.; VINOCUR, D. D.; SOO-HOO, D.; HOFER, M. A. Five generations of selective breeding for ultrasonic vocalization (USV) responses in N:NIH strain rats. **Developmental Psychobiology**, v. 31, n. 4, p. 255-265, 1997.

CAI, Z.; PAN, Z. L.; PANG, Y.; EVANS, O. B.; RHODES, P. G. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. **Pediatric Research**, v. 47, n. 1, p. 64-72, 2000.

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

CASEY, M. L.; COX, S. M.; BEUTLER, B.; MILEWICH, L.; MACDONALD, P. C. Cachectin/tumor necrosis factor- α formation in human decidua. Potential role of cytokines in infection-induced preterm labor. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 83, n. 2, p. 430-436, 1989.

CAUWELS, A.; BROUCKAERT, P. Survival of TNF toxicity: dependence on caspases and NO. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 462, n. 2, p. 132-139, 2007.

CAVE, J. W.; BAKER, H. Dopamine systems in the forebrain. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 651, p. 15-35, 2009.

CHAVES, G. P.; NOGUEIRA, T. C.; BRITTO, L. R.; BORDIN, S.; TORRAO, A. S. Retinal removal up-regulates cannabinoid CB(1) receptors in the chick optic tectum. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 7, p. 1626-1634, 2008.

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

CHIAVEGATTO, S.; BERNARDI, M. M. Prenatal versus postnatal effects on offspring weight gain of rats exposed to diphenhydramine: a critical evaluation of fostering procedures in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology A Comparative Physiology**, v. 99, n. 1-2, p. 219-221, 1991.

CLANCY, B.; DARLINGTON, R. B.; FINLAY, B. L. Translating developmental time across mammalian species. **Neuroscience**, v. 105, n. 1, p. 7-17, 2001.

CLANCY, B.; FINLAY, B. L.; DARLINGTON, R. B.; ANAND, K. J. Extrapolating brain development from experimental species to humans. **Neurotoxicology**, v. 28, n. 5, p. 931-937, 2007.

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

COYLE, P.; TRAN, N.; FUNG, J. N.; SUMMERS, B. L.; ROFE, A. M. Maternal dietary zinc supplementation prevents aberrant behaviour in an object recognition task in mice offspring exposed to LPS in early pregnancy. **Behavioural Brain Research**, v. 197, n. 1, p. 210-218, 2009.

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

CROONENBERGHS, J.; BOSMANS, E.; DEBOUTTE, D.; KENIS, G.; MAES, M. Activation of the inflammatory response system in autism. **Neuropsychobiology**, v. 45, n. 1, p. 1-6, 2002.

CURIN, J. M.; TERZIC, J.; PETKOVIC, Z. B.; ZEKAN, L.; TERZIC, I. M.; SUSNJARA, I. M. Lower cortisol and higher ACTH levels in individuals with autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 33, n. 4, p. 443-448, 2003.

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

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, n. 1-3, p. 399-411, 2004.

DANTZER, R. EuroConference on cytokines in the brain: Expression and action of cytokines in the brain and pathophysiological implications. **Brain, behavior, and immunity**, v. 19, n. 3, p. 5, 2005.

DANTZER, R. Cytokine, sickness behavior, and depression. **Neurologic Clinics**, v. 24, n. 3, p. 441-460, 2006.

DEVERMAN, B. E.; PATTERSON, P. H. Cytokines and CNS development. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 61-78, 2009.

DSM-IV. Pervasive Developmental Disorders. In: (Ed.). **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994, p. 65-78.

DUDCHENKO, P. A. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 7, p. 699-709, 2004.

DUNN, A. J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clinical Neuroscience Research**, v. 6, n. 1-2, p. 52-68, 2006.

DUTTA, G.; ZHANG, P.; LIU, B. The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 22, n. 5, p. 453-464, 2008.

ELOVITZ, M. A.; BROWN, A. G.; BREEN, K.; ANTON, L.; MAUBERT, M.; BURD, I. Intrauterine inflammation, insufficient to induce parturition, still evokes fetal and neonatal brain injury. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 6, p. 663-671, 2011.

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

FOLSTEIN, S. E.; PIVEN, J. Etiology of autism: genetic influences. **Pediatrics**, v. 87, n. 5, pt. 2, p. 767-773, 1991.

FOMBONNE, E. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 66, Supplement, 10, p. 3-8, 2005.

FOMBONNE, E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. **Pediatric Research**, v. 65, n. 6, p. 591-598, 2009.

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

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

GADIA, C. A.; TUCHMAN, R.; ROTTA, N. T. Autism and pervasive developmental disorders. **Jornal de Pediatria (Rio J)**, v. 80, n. 2, Supplement, p. S83-94, 2004.

GAYLE, D. A.; BELOOSESKY, R.; DESAI, M.; AMIDI, F.; NUNEZ, S. E.; ROSS, M. G. Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, n. 6, p. R1024-1029, 2004.

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

GOMEZ-SERRANO, M.; TONELLI, L.; LISTWAK, S.; STERNBERG, E.; RILEY, A. L. Effects of cross fostering on open-field behavior, acoustic startle, lipopolysaccharide-induced corticosterone release, and body weight in Lewis and Fischer rats. **Behavior Genetics**, v. 31, n. 5, p. 427-436, 2001.

GÓRNIK, S. L.; SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M. Toxicologia do desenvolvimento. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. (Ed.). **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. São Paulo: Manole, 2008. p. 701-731.

GUTTMAN, M. Dopamine receptors in Parkinson's disease. **Neurologic Clinics**, v. 10, n. 2, p. 377-386, 1992.

HALL, G. A. An investigation into the mechanism of placental damage in rats inoculated with Salmonella dublin. **American Journal of Pathology**, v. 77, n. 2, p. 299-312, 1974.

HARJU, K.; OJANIEMI, M.; ROUNIOJA, S.; GLUMOFF, V.; PAANANEN, R.; VUOLTEENAHONEN, R.; HALLMAN, M. Expression of toll-like receptor 4 and endotoxin responsiveness in mice during perinatal period. **Pediatric Research**, v. 57, n. 5, pt. 1, p. 644-648, 2005.

HARMON, K. M.; CROMWELL, H. C.; BURGDORF, J.; MOSKAL, J. R.; BRUDZYNSKI, S. M.; KROES, R. A.; PANKSEPP, J. Rats selectively bred for low levels of 50 kHz ultrasonic vocalizations exhibit alterations in early social motivation. **Developmental Psychobiology**, v. 50, n. 4, p. 322-331, 2008.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 12, n. 2, p. 123-137, 1988.

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

HERBERT, M. R. Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders. **Current Opinion in Neurology**, v. 23, n. 2, p. 103-110, 2010.

HERMAN, B. H.; ARTHUR-SMITH, A.; HAMMOCK, M. K.; JOSEPHS, S. Ontogeny of beta-endorphin and cortisol in the plasma of children and adolescents. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 67, n. 1, p. 186-190, 1988.

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

HUOT, P.; PARENT, A. Dopaminergic neurons intrinsic to the striatum. **Journal of Neurochemistry**, v. 101, n. 6, p. 1441-1447, 2007.

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

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

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

ISE, S.; NAGANO, N.; OKUDA, S.; OHTA, H. Corticotropin-releasing factor modulates maternal separation-induced ultrasonic vocalization in rat pups via activation of CRF1 receptor. **Brain Research**, v. 1234, p. 59-65, 2008.

JAMES, S. J. Oxidative stress and the metabolic pathology of autism. In: ZIMMERMAN, A. W. (Ed.). **Autism: current theories and evidence**. Totowa: Humana Press, 2008. p. 245-268.

JANSEN, L. M.; GISPEN-DE WIED, C. C.; VAN DER GAAG, R. J.; VAN ENGELAND, H. Differentiation between autism and multiple complex developmental disorder in response to psychosocial stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 3, p. 582-590, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. (Ed.). **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 367-388.

JYONOUCHI, H.; SUN, S.; LE, H. Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. **Journal of Neuroimmunology**, v. 120, n. 1-2, p. 170-179, 2001.

KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **The nervous child**, v. 2, p. 217-250, 1943.

KAUFMANN, P.; BURTON, G. Anatomy and genesis of the placenta. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p. 441-484.

KAWAMURA, Y.; TAKAHASHI, O.; ISHII, T. Reevaluating the incidence of pervasive developmental disorders: impact of elevated rates of detection through implementation of an integrated system of screening in Toyota, Japan. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 62, n. 2, p. 152-159, 2008.

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

KIRSTEN, T. B. **Avaliação comportamental e neuroquímica da prole masculina de ratas expostas pré-natalmente ao lipossacarídeo**. 2008. 123 p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

KIRSTEN, T. B.; TARICANO, M.; FLORIO, J. C.; PALERMO-NETO, J.; BERNARDI, M. M. Prenatal lipopolysaccharide reduces motor activity after an immune challenge in adult male offspring. **Behavioural Brain Research**, v. 211, n. 1, p. 77-82, 2010b.

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

KREITZER, A. C.; MALENKA, R. C. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. **Neuron**, v. 60, n. 4, p. 543-554, 2008.

LANDRIGAN, P. J. What causes autism? Exploring the environmental contribution. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 22, n. 2, p. 219-225, 2010.

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

LARSSON, H. J.; EATON, W. W.; MADSEN, K. M.; VESTERGAARD, M.; OLESEN, A. V.; AGERBO, E.; SCHENDEL, D.; THORSEN, P.; MORTENSEN, P. B. Risk factors for autism: perinatal factors, parental psychiatric history, and socioeconomic status. **American Journal of Epidemiology**, v. 161, n. 10, p. 916-928, 2005.

LEITE, L. G.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; PIACENTI, A.; ARAGÃO, M.; SCHONS, S. V. Susceptibilidade de animais de laboratório à intoxicação por *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae). **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 6, 2002.

LENCZOWSKI, M. J.; VAN DAM, A. M.; POOLE, S.; LARRICK, J. W.; TILDERS, F. J. Role of circulating endotoxin and interleukin-6 in the ACTH and corticosterone response to intraperitoneal LPS. **American Journal of Physiology**, v. 273, n. 6 Pt 2, p. R1870-1877, 1997.

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

LEONG, T. Y.; COOPER, K.; LEONG, A. S. Immunohistology--past, present, and future. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 17, n. 6, p. 404-418, 2010.

LEVARIO-CARRILLO, M.; OLAVE, M. E.; CORRAL, D. C.; ALDERETE, J. G.; GAGIOTI, S. M.; BEVILACQUA, E. Placental morphology of rats prenatally exposed to methyl parathion. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 55, n. 6, p. 489-496, 2004.

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

LI, X.; CHAUHAN, A.; SHEIKH, A. M.; PATIL, S.; CHAUHAN, V.; LI, X. M.; JI, L.; BROWN, T.; MALIK, M. Elevated immune response in the brain of autistic patients. **Journal of Neuroimmunology**, v. 207, n. 1-2, p. 111-116, 2009.

LIBBEY, J. E.; SWEETEN, T. L.; MCMAHON, W. M.; FUJINAMI, R. S. Autistic disorder and viral infections. **Journal of Neurovirology**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2005.

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

LING, Z.; ZHU, Y.; TONG, C. W.; SNYDER, J. A.; LIPTON, J. W.; CARVEY, P. M. Prenatal lipopolysaccharide does not accelerate progressive dopamine neuron loss in the rat as a result of normal aging. **Experimental Neurology**, v. 216, n. 2, p. 312-320, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LORTON, D.; LUBAHN, C. L.; ESTUS, C.; MILLAR, B. A.; CARTER, J. L.; WOOD, C. A.; BELLINGER, D. L. Bidirectional communication between the brain and the immune system: implications for physiological sleep and disorders with disrupted sleep. **Neuroimmunomodulation**, v. 13, n. 5-6, p. 357-374, 2006.

MACFABE, D. F.; CAIN, N. E.; BOON, F.; OSSENKOPP, K. P.; CAIN, D. P. Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 217, n. 1, p. 47-54, 2011.

MACHADO, M. G.; OLIVEIRA, H. A.; CIPOLOTTI, R.; SANTOS, C. A.; DE OLIVEIRA, E. F.; DONALD, R. M.; KRAUSS, M. P. Anatomical and functional abnormalities of central nervous system in autistic disorder: a MRI and SPECT study. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 61, n. 4, p. 957-961, 2003.

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

MCAFOOSE, J.; BAUNE, B. T. Evidence for a cytokine model of cognitive function. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 3, p. 355-366, 2009.

MCGUIRE, S. O.; LING, Z. D.; LIPTON, J. W.; SORTWELL, C. E.; COLLIER, T. J.; CARVEY, P. M. Tumor necrosis factor alpha is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons. **Experimental Neurology**, v. 169, n. 2, p. 219-230, 2001.

MCPHEETERS, M. L.; WARREN, Z.; SATHE, N.; BRUZEK, J. L.; KRISHNASWAMI, S.; JEROME, R. N.; VEENSTRA-VANDERWEELE, J. A systematic review of medical treatments for children with autism spectrum disorders. **Pediatrics**, v. 127, n. 5, p. e1312-1321, 2011.

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

MEYER, U.; FELDON, J.; SCHEDLOWSKI, M.; YEE, B. K. Immunological stress at the maternal-foetal interface: a link between neurodevelopment and adult psychopathology. **Brain Behavior and Immunity**, v. 20, n. 4, p. 378-388, 2006a.

MEYER, U.; NYFFELER, M.; ENGLER, A.; URWYLER, A.; SCHEDLOWSKI, M.; KNUESEL, I.; YEE, B. K.; FELDON, J. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 18, p. 4752-4762, 2006b.

MEYER, U.; YEE, B. K.; FELDON, J. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? **Neuroscientist**, v. 13, n. 3, p. 241-256, 2007.

MEYER, U.; NYFFELER, M.; YEE, B. K.; KNUESEL, I.; FELDON, J. Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. **Brain Behavior and Immunity**, v. 22, n. 4, p. 469-486, 2008.

MEYER, U.; FELDON, J.; FATEMI, S. H. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 7, p. 1061-1079, 2009.

MEYER, U.; FELDON, J.; DAMMANN, O. Schizophrenia and autism: both shared and disorder-specific pathogenesis via perinatal inflammation? **Pediatric Research**, v. 69, n. 5 Pt 2, p. 26R-33R, 2011.

MEYER, U.; FELDON, J. To poly(I:C) or not to poly(I:C): advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 3, p. 1308-1321, 2012.

MILLER, M. T.; STROMLAND, K.; VENTURA, L.; JOHANSSON, M.; BANDIM, J. M.; GILLBERG, C. Autism associated with conditions characterized by developmental errors in early embryogenesis: a mini review. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 2-3, p. 201-219, 2005.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia médica**. São Paulo: Manole, 1999.

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

MOR, G.; ABRAHAMS, V. M. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 119, 2003.

MORAES, A. P.; SCHWARZ, A.; SPINOSA, H. S.; FLORIO, J. C.; BERNARDI, M. M. Maternal exposure to diphenhydramine during the fetal period in rats: effects on physical and neurobehavioral development and on neurochemical parameters. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, n. 5, p. 681-692, 2004.

MOY, S. S.; NADLER, J. J.; POE, M. D.; NONNEMAN, R. J.; YOUNG, N. B.; KOLLER, B. H.; CRAWLEY, J. N.; DUNCAN, G. E.; BODFISH, J. W. Development of a mouse test for repetitive, restricted behaviors: relevance to autism. **Behavioural Brain Research**, v. 188, n. 1, p. 178-194, 2008a.

MOY, S. S.; NADLER, J. J.; YOUNG, N. B.; NONNEMAN, R. J.; SEGALL, S. K.; ANDRADE, G. M.; CRAWLEY, J. N.; MAGNUSON, T. R. Social approach and repetitive behavior in eleven inbred mouse strains. **Behavioural Brain Research**, v. 191, n. 1, p. 118-129, 2008b.

MUHLE, R.; TRENTACOSTE, S. V.; RAPIN, I. The genetics of autism. **Pediatrics**, v. 113, n. 5, p. e472-486, 2004.

MUNOZ-FERNANDEZ, M. A.; FRESNO, M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 56, n. 3, p. 307-340, 1998.

MURATORE, C. S.; LUKS, F. I.; ZHOU, Y.; HARTY, M.; REICHNER, J.; TRACY, T. F. Endotoxin alters early fetal lung morphogenesis. **Journal of Surgical Research**, v. 155, n. 2, p. 225-230, 2009.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Imunidade inata. In: MURPHY, K., TRAVERS, P. e WALPORT, M. (Ed.). **Imunobiologia de Janeway**. Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 39-109.

NAKASATO, A.; NAKATANI, Y.; SEKI, Y.; TSUJINO, N.; UMINO, M.; ARITA, H. Swim stress exaggerates the hyperactive mesocortical dopamine system in a rodent model of autism. **Brain Research**, v. 1193, p. 128-135, 2008.

NARITA, M.; OYABU, A.; IMURA, Y.; KAMADA, N.; YOKOYAMA, T.; TANO, K.; UCHIDA, A.; NARITA, N. Nonexploratory movement and behavioral alterations in a thalidomide or valproic acid-induced autism model rat. **Neuroscience Research**, v. 66, n. 1, p. 2-6, 2010.

NARITA, N.; KATO, M.; TAZOE, M.; MIYAZAKI, K.; NARITA, M.; OKADO, N. Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal thalidomide- and valproic acid-exposed rat: putative animal models for autism. **Pediatric Research**, v. 52, n. 4, p. 576-579, 2002.

NIR, I.; MEIR, D.; ZILBER, N.; KNOBLER, H.; HADJEZ, J.; LERNER, Y. Brief report: circadian melatonin, thyroid-stimulating hormone, prolactin, and cortisol levels in serum of young adults with autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 25, n. 6, p. 641-654, 1995.

NOLDUS, L. P.; SPINK, A. J.; TEGELENBOSCH, R. A. EthoVision: a versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. **Behavior Research Methods Instruments & Computers**, v. 33, n. 3, p. 398-414, 2001.

PANG, Y.; ZHENG, B.; CAMPBELL, L. R.; FAN, L. W.; CAI, Z.; RHODES, P. G. IGF-1 can either protect against or increase LPS-induced damage in the developing rat brain. **Pediatric Research**, v. 67, n. 6, p. 579-584, 2010.

PANKSEPP, J.; BEATTY, W. W. Social deprivation and play in rats. **Behavioral Neural Biology**, v. 30, n. 2, p. 197-206, 1980.

PARDO, C. A.; VARGAS, D. L.; ZIMMERMAN, A. W. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. **International Review of Psychiatry**, v. 17, n. 6, p. 485-495, 2005.

PATTERSON, P. H. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. **Behavioural Brain Research**, v. 204, n. 2, p. 313-321, 2009.

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

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. San Diego: Academic Press, 1998.

PEREIRA, O. C.; BERNARDI, M. M.; GERARDIN, D. C. Could neonatal testosterone replacement prevent alterations induced by prenatal stress in male rats? **Life Sciences**, v. 78, n. 24, p. 2767-2771, 2006.

PLETNIKOV, M. V.; RUBIN, S. A.; VASUDEVAN, K.; MORAN, T. H.; CARBONE, K. M. Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. **Behavioural Brain Research**, v. 100, n. 1-2, p. 43-50, 1999.

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

PORRITT, M. J.; BATCHELOR, P. E.; HUGHES, A. J.; KALNINS, R.; DONNAN, G. A.; HOWELLS, D. W. New dopaminergic neurons in Parkinson's disease striatum. **Lancet**, v. 356, n. 9223, p. 44-45, 2000.

REUL, J. M.; STEC, I.; WIEGERS, G. J.; LABEUR, M. S.; LINTHORST, A. C.; ARZT, E.; HOLSBOER, F. Prenatal immune challenge alters the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in adult rats. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 6, p. 2600-2607, 1994.

ROCHE, M.; DIAMOND, M.; KELLY, J. P.; FINN, D. P. In vivo modulation of LPS-induced alterations in brain and peripheral cytokines and HPA axis activity by cannabinoids. **Journal of Neuroimmunology**, v. 181, n. 1-2, p. 57-67, 2006.

ROMERO, E.; GUAZA, C.; CASTELLANO, B.; BORRELL, J. Ontogeny of sensorimotor gating and immune impairment induced by prenatal immune challenge in rats: implications for the etiopathology of schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 4, p. 372-383, 2010.

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

RUTTER, M.; SCHOPLER, E. Classification of pervasive developmental disorders: some concepts and practical considerations. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 22, n. 4, p. 459-482, 1992.

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

SAMUELSSON, A. M.; JENNISCHE, E.; HANSSON, H. A.; HOLMANG, A. Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 5, p. R1345-1356, 2006.

SANDMAN, C. A.; BARRON, J. L.; CHICZ-DEMET, A.; DEMET, E. M. Brief report: plasma beta-endorphin and cortisol levels in autistic patients. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 21, n. 1, p. 83-87, 1991.

SAPOLSKY, R. M. Stress hormones: good and bad. **Neurobiology of Disease**, v. 7, n. 5, p. 540-542, 2000.

SARGENT, I. L. Maternal and fetal immune responses during pregnancy. **Experimental and Clinical Immunogenetics**, v. 10, n. 2, p. 85-102, 1993.

SCHNEIDER, T.; ROMAN, A.; BASTA-KAIM, A.; KUBERA, M.; BUDZISZEWSKA, B.; SCHNEIDER, K.; PRZEWLOCKI, R. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 6, p. 728-740, 2008.

SHAO, Y.; WOLPERT, C. M.; RAIFORD, K. L.; MENOLD, M. M.; DONNELLY, S. L.; RAVAN, S. A.; BASS, M. P.; MCCLAIN, C.; VON WENDT, L.; VANCE, J. M.; ABRAMSON, R. H.; WRIGHT, H. H.; ASHLEY-KOCH, A.; GILBERT, J. R.; DELONG, R. G.; CUCCARO, M. L.; PERICAK-VANCE, M. A. Genomic screen and follow-up analysis for autistic disorder. **American Journal of Medical Genetics**, v. 114, n. 1, p. 99-105, 2002.

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

SILEN, M. L.; FIRPO, A.; MORGELLO, S.; LOWRY, S. F.; FRANCUS, T. Interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor alpha cause placental injury in the rat. **American Journal of Pathology**, v. 135, n. 2, p. 239-244, 1989.

SILVA, M. R.; BERNARDI, M. M.; FELICIO, L. F. Effects of dopamine receptor antagonists on ongoing maternal behavior in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 68, n. 3, p. 461-468, 2001.

SLOTNICK, B.; SCHELLINCK, H.; BROWN, R. Olfaction. In: WHISHAW, I. Q.; KOLB, B. (Ed.). **The behavior of the laboratory rat: a handbook with tests**. New York: Oxford University Press, 2005. p. 90-104.

SMITH, S. E. P.; LI, J.; GARBETT, K.; MIRNICS, K.; PATTERSON, P. H. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 40, p. 10695-10702, 2007.

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

STANGHERLIN, E. C.; LUCHESE, C.; PINTON, S.; ROCHA, J. B.; NOGUEIRA, C. W. Sub-chronical exposure to diphenyl diselenide enhances acquisition and retention of spatial memory in rats. **Brain Research**, v. 1201, p. 106-113, 2008.

SWEETEN, T. L.; POSEY, D. J.; MCDOUGLE, C. J. High blood monocyte counts and neopterin levels in children with autistic disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 9, p. 1691-1693, 2003.

SWIERGIEL, A. H.; SMAGIN, G. N.; JOHNSON, L. J.; DUNN, A. J. The role of cytokines in the behavioral responses to endotoxin and influenza virus infection in mice: effects of acute and chronic administration of the interleukin-1-receptor antagonist (IL-1ra). **Brain Research**, v. 776, n. 1-2, p. 96-104, 1997.

SWIERGIEL, A. H.; DUNN, A. J. The roles of IL-1, IL-6, and TNFalpha in the feeding responses to endotoxin and influenza virus infection in mice. **Brain Behavior and Immunity**, v. 13, n. 3, p. 252-265, 1999.

TANG, W. Y.; HO, S. M. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 8, n. 2, p. 173-182, 2007.

TANI, P.; LINDBERG, N.; MATTO, V.; APPELBERG, B.; NIEMINEN-VON WENDT, T.; VON WENDT, L.; PORKKA-HEISKANEN, T. Higher plasma ACTH levels in adults with Asperger syndrome. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 58, n. 6, p. 533-536, 2005.

TARICANO, M. **Efeitos da administração pré-natal de LPS no aprendizado e/ou memória na prole de ratas.** 2010. 103 p. Dissertação (mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

THEOHARIDES, T. C.; KEMPURAJ, D.; REDWOOD, L. Autism: an emerging 'neuroimmune disorder' in search of therapy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 10, n. 13, p. 2127-2143, 2009.

TIMOFEEVA, O. A.; ROEGGE, C. S.; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T. A.; LEVIN, E. D. Persistent cognitive alterations in rats after early postnatal exposure to low doses of the organophosphate pesticide, diazinon. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 30, n. 1, p. 38-45, 2008.

TORDJMAN, S.; DRAPIER, D.; BONNOT, O.; GRAIGNIC, R.; FORTES, S.; COHEN, D.; MILLET, B.; LAURENT, C.; ROUBERTOUX, P. L. Animal models relevant to schizophrenia and autism: validity and limitations. **Behavior Genetics**, v. 37, n. 1, p. 61-78, 2007.

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

VARGAS, D. L.; NASCIMBENE, C.; KRISHNAN, C.; ZIMMERMAN, A. W.; PARDO, C. A. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. **Annals of Neurology**, v. 57, n. 1, p. 67-81, 2005.

VOLKMAR, F. R.; LORD, C.; BAILEY, A.; SCHULTZ, R. T.; KLIN, A. Autism and pervasive developmental disorders. **Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines**, v. 45, n. 1, p. 135-170, 2004.

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

WEINBERG, E. D. Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 6, n. 6, p. 814-831, 1984.

WEIS, S. N.; FAVERO, A. M.; STANGHERLIN, E. C.; MANARIN, F. G.; ROCHA, J. B.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. Repeated administration of diphenyl diselenide to pregnant rats induces adverse effects on embryonic/fetal development. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 175-181, 2007.

WING, L.; POTTER, D. The epidemiology of autistic spectrum disorders: is the prevalence rising? **Mental retardation and developmental disabilities research reviews**, v. 8, n. 3, p. 151-161, 2002.

WINK, L. K.; PLawecki, M. H.; ERICKSON, C. A.; STIGLER, K. A.; MCDougLE, C. J. Emerging drugs for the treatment of symptoms associated with autism spectrum disorders. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 15, n. 3, p. 481-494, 2010.

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

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, n. 3-4, p. 381-388, 1992.

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

Prenatal Lipopolysaccharide Reduces Social Behavior in Male Offspring

Thiago B. Kirsten Marina Taricano Paulo C. Maiorka João Palermo-Neto
Maria M. Bernardi

Neuroimmunomodulation Research Group, Department of Pathology, School of Veterinary Medicine,
University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Key Words

Lipopolysaccharide • Prenatal infection • Development •
Play behavior • Social interaction • Plus maze • Brain
morphology

Abstract

Objective: This study investigated the relationship between maternal sickness behavior during pregnancy and offspring development and behavior. **Methods:** Pregnant Wistar rats were administered with lipopolysaccharide (LPS, 100 µg/kg, i.p.) on gestation day (GD) 9.5. Dams' sickness behavior was analyzed, and at birth, offspring number and weight were evaluated. Male offspring was evaluated through physical development, play behavior, adult social interaction, plus maze studies and morphological analysis of the brain. **Results:** Results, with respect to the control group, showed that: (1) LPS decreased general activity, food intake, and weight gain in dams, but no pyrexia was observed following treatment; (2) LPS reduced litter size, but no alterations in physical development were observed; (3) LPS reduced play behavior parameters in baby rats; (4) LPS decreased adult social interaction; (5) no alterations were observed between groups on plus maze studies; (6) no differences were observed between groups on morphological analyses of the brain. **Conclusion:** These data reveal that LPS administered

on GD 9.5 impaired male offspring's social behavior in infancy and adulthood. These results may be related to an alteration in motivational states or/and increased anxiety.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Introduction

Lipopolysaccharide (LPS), an endotoxin that originates from the cell wall of gram-negative bacteria, activates the immune system to release proinflammatory cytokines (interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor-α, and some others) and stimulates monocytes, neutrophils, blood platelets, endothelial cells, and primarily macrophage activities. Several authors reported that LPS also affects central nervous system activity, leading to sickness behavior in many species [1–3]. The innate immune system is responsible for many of the acute sickness symptoms related to systemic inflammation or infection [4, 5]. LPS-induced sickness behavior is generally accompanied by a decrease in exploratory activity, social behavior, ingestive behavior, sexual behavior and induced anhedonia, and poor learning and cognitive functions [6].

Prenatal LPS exposure causes reproductive, behavioral and neurochemical injuries both to the mother and the

pups [7–16]. It has been suggested that the effects of maternal LPS exposure on the developing fetal brain are mediated by cytokine induction within the maternal circulation or placenta [17]. In this respect, several research efforts have attempted to model the long-term consequences of maternal infection during pregnancy on subsequent offspring behavior. These models include exposure to LPS [18, 19], infection with human influenza virus, and exposure to polyriboinosinic-polyribocytidilic acid that mimics viral RNA [20, 21].

Meyer et al. [22] integrate both epidemiological and experimental findings supporting the hypothesis that infection-associated immunological events in early fetal life may have a stronger neurodevelopmental impact compared to late-pregnancy infections. This is because infection in early gestation may not only interfere with fundamental neurodevelopmental events such as cell proliferation and differentiation, but it may also predispose the developing nervous system to additional failures in subsequent cell migration, target selection, and synapse maturation, eventually leading to multiple brain and behavioral abnormalities in adult offspring. Several data indicate that early/middle infection (gestation day 9, GD 9) induces the most relevant long-term neuropathological consequences in neural substrates [20, 22, 23]. Thus, GD 9.5 was chosen to study the effects of prenatal infection induced by LPS administration. Our objective was to verify if a prenatal maternal infection (100 µg/kg LPS on GD 9.5) impairs the social behavior of male pups during infancy and adulthood. Moreover, the physical development, stress/anxiety levels and brain morphology were analyzed. Besides that, maternal sickness behavior and reproductive performance were investigated to confirm our LPS dose effects as previously reported in the literature.

Methods

Animals

Pregnant Wistar rats from our own colony, weighing 216–263 g each, were used (GD 0 = spermatozoa in the vaginal smear). Dams were individually housed in polypropylene cages (38 × 32 × 16 cm³) at controlled room temperature (22 ± 2°C), humidity (65–70%), and artificial lighting (12-hour light/12-hour dark cycle, lights on at 6.00 a.m.) with free access to Nuvilab[®] rodent chow (Nuvital Co., São Paulo, Brazil) and filtered water. Sterilized and residue-free wood shavings were used as animal bedding. The dams were randomly distributed into control and experimental groups. The animals used in this study were maintained in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources of the School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Brazil (protocol No. 925/2006,

FMVZ – USP). These guidelines are similar to those of the National Research Council, USA.

Treatment

LPS (from *Escherichia coli*, Sigma[®], serotype 0127: B8) was dissolved in saline (50 µg/ml of LPS in 0.9% NaCl solution) and was administered intraperitoneally (i.p.) to pregnant rats at a dose of 100 µg/kg on GD 9.5. This dose was chosen because it has been shown to induce behavioral and endocrine alterations and to increase cytokines at the placental level [13, 24]. GD 9.5 was selected, since in rats it coincides with the period of cerebral organogenesis, particularly neural-plate formation [25, 26]. The control group consisted of pregnant rats submitted to the same treatment schedule with saline. Each dam was administered 0.1 ml/100 g saline or LPS solution.

Maternal Sickness Behavior

Experiments were carried out in accordance with the GLP protocols and quality assurance methods. Maternal sickness behavior was analyzed in pregnant female rats treated with both LPS and control solution on GD 9.5 (n = 8 for both groups). One hour after LPS or 0.9% NaCl treatment, dams' general activity was observed in an open field. The device used consisted of a round wooden arena with acrylic washable covering (90 cm in diameter, walls 28 cm in height) painted gray and subdivided into 25 parts [27]. For the observations, each dam was individually placed in the center of the apparatus and the following parameters were measured over a period of 5 min: locomotion frequency (number of floor units entered with both feet), rearing frequency (number of times the rodents stood on their hind legs), and self-grooming time (seconds of licking or biting of the fur, limbs, or genital region). Hand-operated counters and stopwatches were employed to count these behaviors. To minimize the influence of possible circadian changes on the open-field behavior, the rodents were observed at the same time of the day (2.00–4.00 p.m.) during each session. Also, the device was washed with a 5% alcohol/water solution before placing the animals, to obviate possible biasing effects owing to odor clues left by earlier rats.

Body temperature of experimental dams was measured after 1, 24 and 48 h of LPS or control solution treatments using an infrared thermometer (Techline[®] TS-201) placed on their ear. This method was used to avoid interference with pregnancy since other methods such as biotelemetry (involving surgery) or rectal temperature (cervix stimulus) measurements are stressful management.

The animals' food consumption was also evaluated 24, 48 and 72 h after the treatment.

Reproductive Parameters and Offspring Studies

Pregnant rats were assigned to control and LPS-treated groups to study maternal reproductive parameters. These rats (n = 10 for both groups) were allowed to give birth and nurture their offspring normally. No cross-fostering procedure was used. The day of birth was considered as postnatal day (PND) 1. Parturition day was observed to analyze premature deliveries.

Pregnant rats were weighed on GD 9.5 and PND 2 to estimate their weight gain. No handling was done on PND 1, while on PND 2, the number of rat pups and the total offspring weight were measured. Immediately after weighing, 8 offspring (4 males and 4 females) were randomly selected (by anogenital difference, greater

Fig. 1. Experimental design diagram.

in males). Litters smaller than 8 pups were culled. One male offspring from each litter ($n = 10$ for both groups) was subcutaneously marked with China ink in the right hind paw on PND 2. These animals were used to study physical development. The second and third offspring of control and experimental litters were employed for play behavior studies, whereas the fourth and the last male offspring of these litters were used for morphological analyses of the brain. Different pregnant rats treated or not with LPS were obtained and their offspring were assigned for adult social interaction and plus maze studies ($n = 7$ for both groups). Female rat pups were kept apart to be used in another experiment. These procedures are summarized in figure 1.

To assess physical development, the following parameters were observed on the rat pups prenatally treated with LPS or the control solution: pinna detachment [the first day that the point of a pinna (earflap) was detached from a rat pup's head, beginning on PND 3], coat appearance [rat pups were examined for the appearance of hair (bristles) on the dorsal surface, beginning on PND 5], eruption of teeth (rat pups were examined for the appearance of either upper or lower incisor eruption, beginning on PND 8), opening of ears (determined by visualization of the open auditory meatus, beginning on PND 11), opening of eyes (determined by the visualization of a longitudinal eyelid fissure, beginning on PND 14) and adult gait (when the rat pups walk without propping their ventral portion on the floor, beginning on PND 13). The animals were weighed individually on PND 2, PND 21, and PND 60. The baby rats were observed daily between 8.00 and 10.00 a.m.

Behavioral Tests

On PND 21, 40 different male rat pups of the control and LPS-treated groups were assigned to one of the following two conditions for play behavior analysis: individual housing (isolated-control rat pups: $n = 10$; isolated-treated rat pups: $n = 10$) and group housing, comprising 2 rat pups per cage (control-grouped rat pups: $n = 10$; treated-grouped rat pups: $n = 10$). The rationale for socially depriving some of the experimental rats is to increase the motivation to initiate play behavior [28]. The animals were left undisturbed in polypropylene cages ($38 \times 32 \times 16 \text{ cm}^3$) until PND 30. The play behavior was observed both on PND 30 and 31, respectively, as this period was found to be the peak time for its occurrence [29].

On PND 30 (9.00–11.00 a.m.), 1 experimental or control-isolated rat pup was confronted with 1 control or treated-grouped rat pup, respectively (the difference in weight was less than 10 g).

Thus, prenatal LPS-treated rat pups either kept in groups or isolated were always observed for play behavior with the nontreated rat pups (isolated or grouped) to avoid treatment interferences (e.g. decrease in social stimulus by one partner may affect the behavior of the other). Observations (filmed procedure) were made for 10 min in the cage of the isolated pup (between 8.00 and 10.00 a.m.). A period of 5 min was allowed for the animals to adapt to the test room before matching. After the trial, rats were returned to their previous housing conditions (isolated or grouped); on the subsequent day (PND 31), the same matches and studies were made for an additional 10 min. The rationale for 2-day analysis is based on the observation that the subject intermittently continues to solicit play until the lack of social reinforcement results in the extinction of play solicitation behavior. This extinction phenomenon may have played a role in our treated-untreated mixed pairs, since the pattern of responding to play solicitations changed over the 2-day testing period [29].

On each observation day, the following parameters were measured: pinning frequency (the frequency of play behavior, i.e., the number of times an animal lied on its back with its partner standing over it; this behavior was counted for both animals, since both are actively involved in it), sniffing the partner (time, s), frequency of crawls over/under the other, frequency of partner mounting, following the partner (time, s), and locomotion (time, s) [29, 30]. All play behavioral parameters, except pinning, were observed individually.

An ethogram of the play behavior test administered to male rat pups included these parameters. It also included: hiding under wood shaving, body shaking (to remove wood shaving), rearing, rearing plus sniffing at walls/roof, biting the partner, running without interactions, pinning plus sniffing the partner, running at the partner, pinning attempts (pinning did not occur), sniffing at wood shaving, self-grooming, scratching and spinning around each other (at least 360°).

On PND 54, 28 different male rat pups of the control and LPS-treated groups were assigned to one of the following two conditions for adult social interaction analysis: individual housing (isolated-control rat pups: $n = 7$; isolated-treated rat pups: $n = 7$) and group housing, comprising 2 rat pups per cage (control-grouped rat pups: $n = 7$; treated-grouped rat pups: $n = 7$). As observed, some rat pups were isolated to increase their social interaction [31]. The animals were left undisturbed in polypropylene cages ($38 \times 32 \times 16 \text{ cm}^3$) until PND 60.

On PND 60, 1 experimental or control-isolated rat pup was confronted with 1 control or experimental-grouped rat pup, re-

spectively (the difference in body weight was smaller than 10 g). The rationale for socially depriving part of the experimental rats is the same as that for the play behavior test. Thus, prenatal LPS-treated rat pups kept in groups or isolated were always observed for social interaction with the nontreated rat pups (isolated or grouped) to avoid treatment interferences. Observations (filmed procedure) were made for 5 min in a new polypropylene cage (between 8.00 and 10.00 a.m.). A period of 5 min was allowed for the animals to adapt to the test room before the matching. The following parameters were measured: sniffing at the partner (time, s), frequency of crawls over/under the other, frequency of partner mounting, following the partner (time, s), and locomotion (time, s) [29, 30]. All parameters were observed individually.

The plus maze behaviors of offspring were measured on PND 90–95. This test was applied to 14 male rat pups divided into two equal groups (one experimental group and one control group). The device consisted of two opposite open arms (50 cm long $\times$ 10 cm wide) and two opposite closed arms (50 cm long $\times$ 10 cm wide $\times$ 40 cm high) arranged at 90° angles. The floor of the maze was made of wood, painted gray (with acrylic washable covering) and located 50 cm above the floor. The center of the maze was open and the walls of the closed arms started 2 cm from the center of the maze. Each rat was observed using a video camera mounted above the arena to record the behavioral data. Data were collected and analyzed by an Ethovision System software (Noldus Information Technology, Leesburg, Va., USA) installed on an IBM-compatible computer placed in an adjacent room.

For the observations, each animal was individually placed in the center of the maze with the head facing one of the open arms, and the following parameters were measured over a period of 5 min: number of entries into the open arms, number of entries into the closed arms, time spent in the open arms, time spent in the closed arms. The measures that reflect stress/anxiety levels in this test are the percentage of entries into open arms versus closed arms and the percentage of time spent in the open arms versus closed arms [32]. The following formulas were employed for calculation: % open arm entries = [open-arm entries/(open-arm entries + closed-arm entries)] $\times$ 100; % time in the open arms = [time in the open arms/(time in the open arms + time in the closed arms)] $\times$ 100.

To minimize the influence of possible circadian changes on plus maze behaviors, control and experimental animals were alternated. The device was washed with a 5% alcohol/water solution before placing the animals on it to obviate possible biasing effects due to odor clues left by previous rats. Observations were made between 2.00 and 5.00 p.m.

Morphological Analyses of the Brain

On PND 60 (between 2.00 and 4.00 p.m.), 5 male pups from each group, obtained from different litters, were deeply anesthetized with xylazine and ketamine and immediately perfused intracardially with saline solution containing EDTA 0.01 M for 10 min, followed by paraformaldehyde 10% for another 10 min. The brains were removed and postfixed in paraformaldehyde for 24–48 h. Sagittal-medial slides were done and submitted to dehydration, diaphanization and paraffin inclusion. Histological sections were made (5 μ m) and stained using hematoxylin eosin. Slides were analyzed on an optical microscope.

Statistical Analysis

Results were expressed as mean $\pm$ SEM. One male rat pup from each dam (used as unit) was considered in the offspring studies to avoid litter effects. Homoscedasticity was verified through the F test. Normality was verified through Kolmogorov-Smirnov test. Thus, the Student's *t* test (unpaired, two-tailed) was used to compare group data that were parametric. For nonparametric data, the Mann-Whitney U test was employed. On the play behavior test, three-way ANOVA was used to analyze the data of control and experimental groups, with housing conditions and observation days as the factors. In this case, ANOVA, followed by the Holm-Sidak post-hoc test, was also used to compare the homoscedastic data presenting interaction. In all cases, results were considered significant if $p < 0.05$.

Results

Maternal Sickness Behavior

Figure 2 shows that in comparison with the control group, LPS-treated pregnant rats presented decreased locomotion ($p = 0.0035$), rearing ($p = 0.0077$), and self-grooming ($p = 0.0379$) activities in an open field. As depicted in figure 3A, compared with the data of the control group, LPS treatment was not capable of modifying pregnant rats' body temperature, both 1 h ($p = 0.9999$) and 24 h ($p = 0.3741$) after the treatment; however, 48 h after LPS treatment, the dams showed increased body temperature with respect to that measured in the control animals ($p = 0.0158$). Figure 3B shows that food intake was reduced in the experimental group at approximately 24 h ($p < 0.0001$), 48 h ($p = 0.0003$), and 72 h ($p = 0.0116$) after LPS treatment with respect to the data of the control group.

Reproductive Parameters and Offspring Studies

Table 1 shows reproductive parameters of rats exposed to LPS (100 μ g/kg) treatment and control rats on GD 9.5. Thus, prenatal exposure to LPS reduced both maternal weight ($p = 0.0116$) and offspring number ($p = 0.0004$). However, this treatment did not modify the parturition day ($p = 0.3553$), the total body weight of rat pups on PND 2 ($p = 0.1530$), and individual body weight of the offspring on PND 2 ($p = 0.6184$), PND 21 ($p = 0.8922$), and PND 60 ($p = 0.4159$).

No differences were observed between the control and the experimental male offspring data on physical evaluation (data not shown).

Behavioral Tests

Figure 4A–F illustrates the data of play behavior of animals exposed to LPS (100 μ g/kg) and control animals

Fig. 2. Effects of LPS (100 µg/kg on GD 9.5) on open-field behavior of pregnant rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with the control group (Student's *t* test). Values are represented as mean $\pm$ SEM. $n = 8$ for both groups.

on GD 9.5. In comparison with the control group, pinning (fig. 4A) was reduced in the experimental group [$F(36/39) = 9.54$, $p = 0.004$]. However, no differences were detected between the two observation days [$F(36/39) = 0.06$, $p = 0.814$], and between the treatments and the observation days [$F(36/39) = 0.09$, $p = 0.762$]. The multiple

Fig. 3. Effects of LPS (100 µg/kg on GD 9.5) on pregnant rats' body temperature taken 1, 24, 48 h after the treatment (A) and food intake 24, 48, 72 h after the treatment (B). Open circles = Control group; black circles = experimental group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, compared with the control group (Student's *t* test). Values are represented as mean $\pm$ SEM. $n = 8$ for both groups.

comparisons test showed that the animals in the experimental group had lower values in pinning than those in the control group ($p = 0.004$).

Three-way ANOVA showed differences in the sniffing parameter (fig. 4B) between treatments [$F(72/79) = 36.44$, $p < 0.001$], housing conditions [$F(72/79) = 1,080.10$, $p < 0.001$], both treatments and housing conditions [$F(72/79) = 11.88$, $p < 0.001$], and housing conditions and observation days [$F(72/79) = 7.44$, $p = 0.008$]. However, no differences were detected between the two observa-

tion days [$F(72/79) = 1.00$, $p = 0.320$], the treatments and the observation days [$F(72/79) = 0.05$, $p = 0.820$], and the three factors: treatments, conditioning, and observation days [$F(72/79) = 0.61$, $p = 0.439$]. The multiple comparisons test showed that the rats of the experimental group presented lower values of sniffing than those in the control group ($p < 0.001$), and this effect was present in isolated animals ($p < 0.001$) but not in grouped animals ($p = 0.071$). Furthermore, it was also observed that the isolated animals presented larger values on the conditioning parameter than the grouped ones, both on days 30 ($p < 0.001$) and 31 ($p < 0.001$).

Three-way ANOVA showed differences in the crawls over/under parameter (fig. 4C) between treatments [$F(72/79) = 10.91$, $p = 0.001$], housing conditions [$F(72/79) = 161.34$, $p < 0.001$], and treatments and housing conditions [$F(72/79) = 9.19$, $p = 0.003$]. No differences were found between the observation days [$F(72/79) = 0.61$, $p = 0.436$], treatments and observation days [$F(72/79) = 0.26$, $p = 0.611$], housing conditions and observation days [$F(72/79) = 0.61$, $p = 0.436$], and the three factors together: treatments, house conditioning, and observation days [$F(72/79) = 0.001$, $p = 0.973$]. The multiple comparisons test showed that rats prenatally treated with LPS presented lower values in crawls over/under parameter than the control group ($p = 0.001$), and this effect was observed in the isolated ($p < 0.001$) but not in the grouped animals ($p = 0.848$). With respect to the housing conditions factor, it was also observed that the isolated animals presented larger values of the crawls over/under parameter than the grouped ones, both on days 30 ($p < 0.001$) and 31 ($p < 0.001$).

As shown in figure 4D, some differences in the mounting parameter were detected between treatments [$F(72/79) = 5.26$, $p = 0.025$], housing conditions [$F(72/79) = 48.14$, $p < 0.001$], and both treatments and housing conditions [$F(72/79) = 5.52$, $p = 0.021$] (three-way ANOVA). However, no differences were detected between observation days [$F(72/79) = 0.67$, $p = 0.414$], treatments and observation days [$F(72/79) = 0.58$, $p = 0.447$], conditioning and observation days [$F(72/79) = 0.98$, $p = 0.325$], and the three factors together: treatments, housing conditions, and observation days [$F(72/79) = 0.67$, $p = 0.414$]. Application of the multiple comparisons test showed that the rats prenatally treated with LPS presented lower values in mounting than control rats ($p = 0.025$), and this effect was observed in isolated ($p = 0.002$) but not grouped animals ($p = 0.968$). The same observation was made with respect to the housing conditions factor: isolated animals presented larger values of

Table 1. Effects of LPS (100 $\mu\text{g/kg}$ on GD 9.5) on parturition day, weight gain of dams, number and total weight of the offspring, and individual offspring body weights ($n = 10$ for both groups)

	Groups	
	control	LPS-treated
Parturition day	22.20 $\pm$ 0.13	22.40 $\pm$ 0.16
Maternal weight gain during pregnancy, g	16.63 $\pm$ 2.92	6.62 $\pm$ 2.05*
Pups, n	10.80 $\pm$ 0.29	7.60 $\pm$ 0.68***
Total weight of the offspring, g	70.64 $\pm$ 4.92	59.00 $\pm$ 6.06
Offspring individual body weight, g		
PND2	7.61 $\pm$ 0.26	7.80 $\pm$ 0.27
PND21	44.22 $\pm$ 0.97	44.47 $\pm$ 1.54
PND60	276.10 $\pm$ 6.41	267.84 $\pm$ 7.57

Values are represented as means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, compared with the control group (Student's *t* test).

mounting than grouped ones, both on days 30 ($p < 0.001$) and 31 ($p < 0.001$).

Three-way ANOVA showed differences in the partner-following parameter (fig. 4E) between housing conditions [$F(72/79) = 151.98$, $p < 0.001$]. No differences were detected between treatments [$F(72/79) = 3.62$, $p = 0.061$], observation days [$F(72/79) = 2.06$, $p = 0.155$], treatments and housing conditions [$F(72/79) = 2.48$, $p = 0.120$], treatments and observation days [$F(72/79) = 1.05$, $p = 0.308$], housing conditions and observation days [$F(72/79) = 2.74$, $p = 0.102$], and the three factors together: treatments, house conditioning, and observation days [$F(72/79) = 0.41$, $p = 0.522$]. The multiple comparisons test revealed that the housing conditions factor in isolated animals presented higher values than in grouped animals ($p < 0.001$).

Finally, three-way ANOVA showed differences in the locomotion parameter (fig. 4F) between housing conditions [$F(72/79) = 678.91$, $p < 0.001$]. However, no differences were observed between treatments [$F(72/79) = 0.41$, $p = 0.524$], observation days [$F(72/79) = 3.69$, $p = 0.059$], treatments and housing conditions [$F(72/79) = 0.026$, $p = 0.872$], treatments and observation days [$F(72/79) = 0.15$, $p = 0.701$], housing conditions and observation days [$F(72/79) = 0.19$, $p = 0.660$], and the three factors together: treatments, house conditioning, and observation days [$F(72/79) = 0.01$, $p = 0.915$]. The multiple comparisons test showed that the housing condition factor of the isolated animals was higher than that of the grouped ones ($p < 0.001$).

Fig. 4. Effects of prenatal LPS exposure (100 µg/kg on GD 9.5) on the play behavior of rats. Clear bars = Control group; grey bars = experimental group. Values are represented as mean $\pm$ SEM. Litters: n = 10 for both groups. Means followed by different letters are statistically different (three-way ANOVA, $p < 0.05$).

The other parameters mentioned on the ethogram of the play behavior test did not show any differences between treatments (data not shown).

As shown in figure 5, adult social interaction was reduced in prenatal LPS-treated isolated rats in the follow-

ing parameters: crawls over/under ($p = 0.0264$) and mounting ($p = 0.0471$) with respect to the data of the control group, but was not significantly different on sniffing ($p = 0.1714$), following ($p = 0.4174$) and locomotion ($p = 0.3889$). Among the grouped animals, no dif-

Fig. 5. Effects of prenatal LPS exposure (100 $\mu\text{g/kg}$ on GD 9.5) on social interaction and plus maze studies of male rat pups on PND 60. Clear bars = Control group; grey bars = experimental group. Sn = Sniffing the partner; Fo = following the partner; Lo = locomotion; Cr = crawling over/under the partner; Mo = mounting the partner. * $p < 0.05$ (Student's t test) compared with the control group. Values are represented as means $\pm$ SEM. Litters: $n = 7$ for both groups.

ferences were observed between LPS-treated and control animals in all parameters that were analyzed (data not shown).

As shown in figure 5, no differences were observed between the control and the experimental male offspring data for plus maze studies: percent open arm entries ($p = 0.9256$), percent time in the open arms ($p = 0.3541$).

Morphological Analyses of the Brain

Morphological analyses of the brain (optical microscope) did not show differences between LPS-treated animals and those of the control group in any specific part of the brain (data not shown).

Discussion

For more than 23 years, it has been documented that infections and inflammation cause sickness behavior. LPS is a potent sickness behavior inducer [33–35]. The present data partially agree with the sickness behavior literature. We demonstrated that LPS-treated female rats exhibit a decrease in general activity and in the amount of food ingested. However, our treated female rats showed no fever 1 and 24 h after the treatment. In this regard, a significant difference in body temperature between the animals of both groups was observed 48 h after treatment. Even so, the normal body temperature of the rats varied from 35.9 to 37.5°C [36], and hence, our results

obtained at 48 h do not represent fever. In fact, it has been documented that rats have an attenuated febrile response to LPS administered during pregnancy [37].

Offspring viability was also impaired by LPS. LPS was reported to induce spontaneous abortions [38] and intra-uterine fetal death or embryonic resorption [14, 39]. Thus, our observation of a reduced number of stillborn offspring might be due to fetal death or fetus resorption as a consequence of prenatal exposure to LPS.

With respect to offspring, no differences were found among rat pups' birth weight. Shi et al. [20] also showed that prenatal maternal infections on GD 9.5 do not alter pups' body weight in mice. However, Collins et al. [7] observed biphasic effects after LPS administration on GD 8 in pregnant hamsters: an increased body weight in litters prenatally treated with LPS (3 µg/kg) and a decreased body weight when the dose was around 100 µg/kg were observed. The lack of LPS effects on the offspring body weight might be related to the strain differences in LPS sensitivity or, most probably, owing to the small number of fetuses to be nourished as a consequence of embryonic resorption. However, possible maternal compensatory mechanisms cannot be ignored.

Despite LPS-induced maternal injuries, rat pups' physical development was not modified by prenatal exposure to LPS on GD 9.5. Thus, physical impairments were not responsible for the prenatal LPS effects on subsequent behavioral tests shown here.

The prenatal administration of LPS on GD 9.5 decreased the offspring's play behavior on PND 30. In fact, not only pinning, but also soliciting behaviors (mounting, sniffing, and crawls over/under) were decreased due to LPS administration. No interference with motor/exploratory parameters (such as locomotion) was detected. In addition, abnormal play solicitations were only observed among isolated rat pups prenatally treated with LPS on GD 9.5.

Only male rat pups were evaluated in this study because male rats (and males of many other mammals) spend more time on social interaction processes, particularly on play behavior, as compared with females [40, 41].

Social play, one of the earliest forms of non-mother-directed social behavior observed in mammals, has been shown to contain a behavioral pattern that correlates with the social, sexual, and aggressive behaviors displayed by the mammal later in life in an exaggerated or out-of-context fashion [42]. Play solicitation or play signaling is a set of behaviors inviting social play or signaling readiness to engage in social play. Solicitation be-

haviors have been suggested to reflect an appetitive phase of social play (play motivation). When observed in pairs, one rat is usually isolated prior to testing, as it is already known that isolated rats initiate more play than group-housed ones [29]. Play solicitation in isolated rats also occurs irrespective of the grouped rats' willingness or their capacity to become involved in play [42]. Accordingly, we found that the control and experimental isolated rat pups exhibited significantly more play solicitation than the grouped ones. However, exposure to LPS on GD 9.5 reduced play solicitations only in isolated animals. The lack of differences in socially grouped pairs reveals that social isolation was necessary to show injuries caused by prenatal LPS treatment. Thus, social isolation might not be a challenge in socially grouped rats.

In our design, we crossed treated animals with non-treated ones to separately estimate the effects of treatment infection on the behavior of isolated and grouped rats [29] and to prevent that the partner's reduction in socialization could impair the interaction per se. Thus, LPS-treated rats' unwillingness to engage in play was not due to the lack of play solicitation behavior by their partners. Finally, pinning behavior did not change over the 2-day testing period, suggesting that preexposure to the partner was incapable of modifying this behavior. However, crawling over/under, mounting and following related to soliciting behaviors were attenuated.

Abnormal play behavior might indicate a decrease in the pup's motivation, induced by prenatal LPS exposure. In this regard, play behavior increases after an isolation period [43, 44], and a satiation process was observed when this behavior was performed [45].

Interestingly, isolated pups initiated the pinning behavior. Such an event is attributed to the higher motivation in isolated rats to play and initiate socialization [43–45].

In addition, some parameters such as pinning and following measured with the play behavior test could be interpreted as agonistic behaviors or play-fighting [46]. Play-fighting is involved in hierarchy establishment patterns and sexual behavior [47, 48]. This way, even if prenatal LPS treatment did not change some agonistic behaviors, such as biting and pouncing, the treatment impaired pinning and following and might prejudice the social hierarchy of these animals.

Similar to the play behavior test, male isolated offspring exposed to prenatal LPS (100 µg/kg on GD 9.5) presented a decrease in adult social interaction when compared with the control group. This experiment was

carried out to evaluate whether abnormal social interactions during infancy are maintained or reverted in adulthood. Thus, the design was essentially the same as that applied on the play behavior test.

Our result that a single LPS prenatal exposure on GD 9.5 impairs rat pups' play behavior and adult social interaction suggests that maternal inflammation has long-term effects on rat pups.

We believe that all behavioral impairment detected in rat offspring in this study results from LPS treatment, released cytokines and induced maternal sickness behavior.

Maternal immune stimulation affects brain development and causes an altered HHA axis upon reaching adulthood [49]. Moreover, social interaction is a suitable model to evaluate anxiety [50, 51]. Thus, the decreased social interaction observed here might be a consequence of an anxiety stress induced by prenatal LPS treatment. However, social anxiety and anxiety caused by a novel environment, as measured in the plus maze, may have a neurobiologically different basis. Hence, our observations did not disconfirm this hypothesis even though the behavioral data of the plus maze test were negative for anxiety.

In addition, prenatal LPS exposure could impair maternal care and be responsible, at least in part, for the deleterious effects on the pup's behavior. We do not believe that LPS treatment interfered with maternal care, since immunological and behavioral parameters return to normal in most of the rats 72 h after LPS i.p. treatment (100 µg/kg) [52]. So, dams are recovered on delivery. Moreover, an experiment recently performed in our laboratory did not show impairment in maternal behavior of dams that received this treatment (data not published).

Since play behavior is commonly used to study the relationship between injuries produced by infection during pregnancy and in autism [20, 29, 53, 54], we speculate that maternal sickness behavior induced by LPS administered on GD 9.5 might be used as an animal model for this mental illness. To reinforce this hypothesis, many studies associate prenatal maternal infection and cytokine release with autism [55–58].

However, the brain morphology of male rat pups exposed to prenatal LPS was not modified when compared with the control group, particularly that of the cerebellum – one of the most affected brain areas in autism. These findings do not rule out morphological alterations that are analyzed with other specific methodologies.

As previously reported, LPS induces sickness behavior in animals, including the decrease in social behavior [6]. This decrease is considered a behavioral strategy to prevent spread of infectious disease (in case of contagious infection). It is also a way to reduce energy expenditure in order to prioritize disease recovery [33].

Considering this, the impairment of social interaction in pups prenatally treated with LPS found in this study may have evolutionary implications. Eventually, these pups might be more prepared to cope with an environment with higher incidence of contagious pathogens [59]. To better understand this issue, genetic and epigenetic studies are planned to be performed.

In conclusion, prenatal LPS administration (100 µg/kg on GD 9.5) impairs the male offspring's social behavior in infancy and in adulthood through decreased motivational state and/or increased anxiety. While these data may be useful as an animal model for autism, stereotyped behavior and communication impairments must be studied further to better diagnose this neuropsychiatric disorder. This study confirms that behavioral impairment may be attributed to prenatal maternal infection.

Acknowledgments

This research, supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (grant 06/54587-9, and thematic grant 04/14128-0) and CNPq (grant 472083/2007-4 and 301177/2007-4), is part of the Master's Dissertation presented by Thiago Berti Kirsten to the School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, postgraduate program in Experimental and Comparative Pathology. Special thanks are extended to Fernando Y.M. Hosomi and Kalan B. Violin for their assistance in the experiments.

References

- 1 Avitsur R, Pollak Y, Yirmiya R: Different receptor mechanisms mediate the effects of endotoxin and interleukin-1 on female sexual behavior. *Brain Res* 1997;773:149–161.
- 2 Aderem A, Ulevitch RJ: Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406:782–787.
- 3 Saluk-Juszczak J, Wachowicz B: The proinflammatory activity of lipopolysaccharide (in Polish). *Postepy Biochem* 2005;51:280–287.
- 4 Medzhitov R, Janeway C Jr: Innate immunity. *N Engl J Med* 2000;343:338–344.
- 5 Rivest S: Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun* 2003;17:13–19.

- 6 Larson SJ, Dunn AJ: Behavioral effects of cytokines. *Brain Behav Immun* 2001;15:371–387.
- 7 Collins JG, Smith MA, Arnold RR, Offenbacher S: Effects of *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on pregnancy outcome in the golden hamster. *Infect Immun* 1994;62:4652–4655.
- 8 Dantzer R: EuroConference on cytokines in the brain: expression and action of cytokines in the brain and pathophysiological implications. *Brain Behav Immun* 2005;19:263–267.
- 9 Harju K, Ojaniemi M, Rounioja S, Glumoff V, Paananen R, Vuolteenaho R, Hallman M: Expression of toll-like receptor 4 and endotoxin responsiveness in mice during perinatal period. *Pediatr Res* 2005;57:644–648.
- 10 Brown AS: Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophr Bull* 2006;32:200–202.
- 11 Golan H, Lev V, Hallak M, Sorokin Y, Huleihel M: Specific neurodevelopmental damage in offspring following maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology* 2005;48:903–917.
- 12 Hava G, Vered L, Yael M, Mordechai H, Mahoud H: Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. *Dev Psychobiol* 2006;48:162–168.
- 13 Wang X, Rousset CI, Hagberg H, Mallard C: Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11:343–353.
- 14 Xu DX, Chen YH, Wang H, Zhao L, Wang JP, Wei W: Tumor necrosis factor alpha partially contributes to lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal growth restriction and skeletal development retardation in mice. *Toxicol Lett* 2006;163:20–29.
- 15 Fortier ME, Luheshi GN, Boksa P: Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. *Behav Brain Res* 2007;181:270–277.
- 16 Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S: The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med* 2007;25:21–39.
- 17 Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN: The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2006;11:47–55.
- 18 Borrell J, Vela JM, Arevalo-Martin A, Molina-Holgado E, Guaza C: Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats: implications for the etiopathogenesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2002;26:204–215.
- 19 Fortier ME, Joobor R, Luheshi GN, Boksa P: Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine-induced locomotion and startle responses in adult rat offspring. *J Psychiatr Res* 2004;38:335–345.
- 20 Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, Patterson PH: Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J Neurosci* 2003;23:297–302.
- 21 Zuckerman JN, Van Damme P, Van Herck K, Löscher T: Vaccination options for last-minute travellers in need of travel-related prophylaxis against hepatitis A and B and typhoid fever: a practical guide. *Travel Med Infect Dis* 2003;1:219–226.
- 22 Meyer U, Yee BK, Feldon J: The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? *Neuroscientist* 2007;13:241–256.
- 23 Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, Yee BK, Feldon J: The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci* 2006;26:4752–4762.
- 24 Spencer SJ, Mouihate A, Galic MA, Ellis SL, Pittman QJ: Neonatal immune challenge does not affect body weight regulation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293:R581–R589.
- 25 Bernardi MM: Exposição aos medicamentos durante o período perinatal; in Spinoza HS, Górniak SL, Bernardi MM (eds): *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006, pp 807–816.
- 26 DeSesso JM: Comparative features of vertebrate embryology; in Hood RD (ed): *Developmental and Reproductive Toxicology: A Practical Approach*. Boca Raton, CRC Taylor & Francis, 2006.
- 27 Broadhurst PL: Experiments in psychogenetics: applications of biometrical genetics to the inheritance of behavior; in Eysenck HJ (ed): *Experiments in Personality*. London, Routledge & Kegan, 1960, vol 1.
- 28 Panksepp J, Beatty WW: Social deprivation and play in rats. *Behav Neural Biol* 1980;30:197–206.
- 29 Pletnikov MV, Rubin SA, Vasudevan K, Moran TH, Carbone KM: Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behav Brain Res* 1999;100:43–50.
- 30 Schneider M, Koch M: Deficient social and play behavior in juvenile and adult rats after neonatal cortical lesion: effects of chronic pubertal cannabinoid treatment. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:944–957.
- 31 File SE, Seth PA: Review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol* 2003;463:35–53.
- 32 Lister RG: The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987;92:180–185.
- 33 Hart BL: Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev* 1988;12:123–137.
- 34 Pavlov VA, Tracey KJ: Neural regulators of innate immune responses and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2322–2331.
- 35 Dantzer R, Kelley KW: Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun* 2007;21:153–160.
- 36 Sharp PE, Laregina MC: Important biological features; in *The Laboratory Animal Pocket Reference Series: The Laboratory Rat*. Boca Raton, CRC, 1998.
- 37 Fofie AE, Fewell JE: Influence of pregnancy on plasma cytokines and the febrile response to intraperitoneal administration of bacterial endotoxin in rats. *Exp Physiol* 2003;88:747–754.
- 38 Avitsur R, Cohen E, Yirmiya R: Effects of interleukin-1 on sexual attractivity in a model of sickness behavior. *Physiol Behav* 1997;63:25–30.
- 39 Zhao L, Chen YH, Wang H, Ji YL, Ning H, Wang SF, Zhang C, Lu JW, Duan ZH, Xu DX: Reactive oxygen species contribute to lipopolysaccharide-induced teratogenesis in mice. *Toxicol Sci* 2008;103:149–157.
- 40 Meaney MJ, Stewart J, Beatty WW: Sex differences in social play: the socialization of sex roles. *Adv Study Behav* 1985;15:1–56.
- 41 Vanderschuren LJ, Niesink RJ, Van Ree JM: The neurobiology of social play behavior in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21:309–326.
- 42 Panksepp J, Beatty WW: Social deprivation and play in rats. *Behav Neural Biol* 1980;30:197–206.
- 43 Thor HD, Holloway WR Jr: Developmental analysis of social play behavior in juvenile rats. *Bull Psychon Soc* 1984;22:587–590.
- 44 Hole G: The effects of social deprivation on levels of social play in the laboratory rat (*Rattus norvegicus*). *Behav Processes* 1991;25:41–53.
- 45 Willey AR, Varlinskaya EI, Spear LP: Social interactions and 50 kHz ultrasonic vocalizations in adolescent and adult rats. *Behav Brain Res* 2009;202:122–129.
- 46 Parent CI, Meaney MJ: The influence of natural variations in maternal care on play fighting in the rat. *Dev Psychobiol* 2008;50:767–776.
- 47 Meaney MJ, Stewart J: Neonatal-androgens influence the social play of prepubescent rats. *Horm Behav* 1981;15:197–213.
- 48 Reul JM, Stec I, Wiegers GJ, Labeur MS, Linthorst AC, Arzt E, Holsboer F: Prenatal immune challenge alters the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in adult rats. *J Clin Invest* 1994;93:2600–2607.

- 50 File SE, Lister RG: Do the reductions in social interactions produced by picrotoxin and pentylenetetrazole indicate anxiogenic actions. *Neuropharmacology* 1984;23:793–796.
- 51 File SE, Briley M: *New Concepts in Anxiety*. London, McMillan Press, 1991.
- 52 Deak T, Bellamy C, Bordner KA: Protracted increases in core body temperature and interleukin-1 following acute administration of lipopolysaccharide: implications for the stress response. *Physiol Behav* 2005;85:296–307.
- 53 Patterson PH: Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. *Curr Opin Neurobiol* 2002;12:115–118.
- 54 Vojdani A, Pangborn JB, Vojdani E, Cooper EL: Infections, toxic chemicals and dietary peptides binding to lymphocyte receptors and tissue enzymes are major instigators of autoimmunity in autism. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2003;16:189–199.
- 55 Patterson PH: Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behav Brain Res* 2009;204:313–321.
- 56 Cohly HH, Panja A: Immunological findings in autism. *Int Rev Neurobiol* 2005;71:317–341.
- 57 Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA: Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 2005;57:67–81.
- 58 Croonenberghs J, Bosmans E, Deboutte D, Kenis G, Maes M: Activation of the inflammatory response system in autism. *Neuropsychobiology* 2002;45:1–6.
- 59 Curno O, Behnke JM, McElligott AG, Reader T, Barnard CJ: Mothers produce less aggressive sons with altered immunity when there is a threat of disease during pregnancy. *Proc Biol Sci* 2009;276:1047–1054.

Research report

Prenatal lipopolysaccharide reduces motor activity after an immune challenge in adult male offspring

Thiago Berti Kirsten*, Marina Taricano, Jorge Camilo Flório, João Palermo-Neto, Maria Martha Bernardi

Neuroimmunomodulation Research Group, Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Av. Orlando Marques de Paiva, 87, São Paulo, SP 05508-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2009

Received in revised form 5 February 2010

Accepted 4 March 2010

Available online 10 March 2010

Keywords:

LPS

Prenatal

Reflexological development

General activity

Immune challenge

Catalepsy

Stereotypy

Dopamine

ABSTRACT

Prenatal lipopolysaccharide (LPS) exposure causes reproductive, behavioral and neurochemical injuries in both the mother and pups. Previous investigations by our group showed that prenatal LPS administration (100 µg/kg, i.p.) on gestational day 9.5 impaired the male offspring's social behavior in infancy and adulthood. In the present study, we investigated whether these social behavioral changes were associated with motor activity impairment. Male rat pups treated prenatally with LPS or not were tested for reflexological development and open field general activity during infancy. In adulthood, animals were tested for open field general activity, haloperidol-induced catalepsy and apomorphine-induced stereotypy; striatal dopamine levels and turnover were also measured. Moreover, LPS-treated or untreated control pups were challenged with LPS in adulthood and observed for general activity in the open field. In relation to the control group, the motor behavior of prenatally treated male pups was unaffected at basal levels, both in infancy and in adulthood, but decreased general activity was observed in adulthood after an immune challenge. Also, striatal dopamine and metabolite levels were decreased in adulthood. In conclusion, prenatal LPS exposure disrupted the dopaminergic system involved with motor function, but this neurochemical effect was not accompanied by behavioral impairment, probably due to adaptive plasticity processes. Notwithstanding, behavioral impairment was revealed when animals were challenged with LPS, resulting in enhanced sickness behavior.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Prenatal lipopolysaccharide (LPS) exposure causes reproductive, behavioral and neurochemical injuries to both the mother and her pups [6,11,19,25,29,31,56,67,68]. It has been suggested that the effects of maternal LPS exposure on the developing fetal brain is mediated by cytokine induction within the maternal circulation and placenta [1,7,61,63]. Prenatal LPS exposure has also been shown to increase the levels of both cytokines and glucocorticoids in the fetal brain [22,31].

Specifically, it was suggested that infection associated with immunological events in early/middle fetal life (e.g., gestational day [GD] 8–10 in rats and mice) might have a stronger neurodevelopmental impact than late-pregnancy infections. These maternal immune activation during early/middle pregnancy interfere with cell proliferation, differentiation, migration, target selection, and

synapse maturation, eventually leading to multiple brain and behavioral abnormalities in adulthood [45,46,58,60].

Previous investigations by our group showed that prenatal LPS administration (100 µg/kg, i.p.) on GD 9.5 impaired the male offspring's social behavior in infancy and adulthood [35]. In the present study, we investigated whether these social behavioral changes were associated with motor activity impairment, important data to interpret our previous findings. By the way, it's known that motor impairments also impair the performance of several behavioral tasks.

Moreover, prenatal infections might disrupt dopaminergic system activity, inducing an impairment of motor tasks. Interestingly, one of the major physiological functions of central dopaminergic pathways is motor behavior regulation [23,24]. Manipulation of the dopaminergic system influences motor function both qualitatively and quantitatively [49]. Drugs that reduce dopamine (DA) function (such as DA receptor antagonists) decrease motor activity and increase immobility, whereas those that increase DA system activity produce opposite effects, i.e., increase motor movements [4,28,44,51,55]. Consequently, we performed in our laboratory an extensive series of studies showing the relation-

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 1376; fax: +55 11 3091 7829.

E-mail address: thiagok@usp.br (T.B. Kirsten).

ship between central dopaminergic functions and motor function [3,17,18,20,21,27,49,50,52,64,65] as well as between the immune and neurotransmitter systems [8,9,42].

The objective of the present study was to verify if a prenatal maternal infection (100 µg/kg LPS on GD 9.5) impairs the motor activity of male rat pups during infancy and adulthood. Motor activity impairment could explain or contribute to, at least in part, some of the social impairments that may be caused by LPS in these prenatally treated pups [35]. Thus, we evaluated the reflexological development of the pups, the open field general activity in infancy and adulthood, catalepsy induced by haloperidol, stereotyped behavior induced by apomorphine and striatal DA levels and turnover. We also investigated the long-term susceptibility of pups prenatally exposed to this endotoxin to an additional LPS challenge in adulthood. An LPS immune challenge was administered to the male pups prenatally treated with LPS or saline and their general activity was observed once more.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Pregnant Wistar rats from our own colony, weighing 216–263 g each, were used (GD 0: spermatozoa in the vaginal smear). Dams were individually housed in polypropylene cages (38 cm × 32 cm × 16 cm) at a controlled room temperature (22 ± 2 °C), humidity (65–70%), and artificial lighting (12 h light/12 h dark cycle, lights on at 6:00 a.m.) and with free access to Nuvilab® rodent chow (Nuvital company, São Paulo, Brazil) and filtered water. Sterilized and residue-free wood shavings were used as animal bedding. The animals used in this study were maintained in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources of the School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Brazil (protocol no. 925/2006, FMVZ-USP). These guidelines are similar to those of the National Institutes of Health, Bethesda, MD. Experiments were carried out in accordance with the GLP protocols and with quality assurance methods.

2.2. Treatment

LPS (from *Escherichia coli*, Sigma®, Serotype 0127:B8) was dissolved in saline (50 µg/ml of LPS in 0.9% NaCl solution) and was intraperitoneally (i.p.) administered to pregnant rats at a dose of 100 µg/kg on GD 9.5. We applied this treatment because it was reported to produce sickness behavior in dams (decrease in general activity and food ingestion), to impair offspring viability and to impair male offsprings' social behavior in infancy and adulthood [35]. This dose was chosen because it has been shown to induce behavioral and endocrine alterations and to increase cytokine production at the placental level [35,62,67]. GD 9.5 was selected since it coincides with the period of cerebral organogenesis in rats, particularly neural-plate formation [13,43]. The control group consisted of pregnant rats subjected to the same treatment schedule but injected with saline. Each dam was administered 0.1 ml/100 g saline or LPS solution.

2.3. Offspring studies

Pregnant rats were assigned to control and LPS-treated groups to study offspring behavior and neurochemistry. These dams ($n = 17$ for both groups) were allowed to give birth and nurture their offspring normally. No cross-fostering was performed, since cross-fostering, *per se*, alters the behavioral and corticosterone responses to LPS [10,26]. Parturition was considered as postnatal day (PND) 1.

No handling was performed on PND 1; on PND 2, eight offspring (four males and four females) were randomly selected (by anogenital differences, greater in males). Litters of less than eight pups were culled. On PND 21, pups were weaned and males were separated from females. Female pups were used in another experiment.

Nine litters for each group were used in four experiments: (1) reflexological development, open field general activity (2) in infancy and (3) adulthood and (4) catalepsy induced by haloperidol. Eight additional litters for each group were used for three other experiments: (1) stereotypy induced by apomorphine, (2) open field general activity test in adulthood after a LPS challenge and (3) determination of DA levels and turnover in the striatum. For each test, one male pup from each litter was used. Each rat was used once.

All experiments were conducted at the same time of day (9:00–11:00 a.m.) to minimize the influence of possible circadian changes.

2.3.1. Reflexological development

One male pup for each litter was subcutaneously marked with China ink on the right-hind paw on PND 2 and was used for the observation of reflexological development. The reflex testing parameters were surface-righting reflex (when the rat pup regained the normal position after being placed on its back within five 5-s observation periods, beginning on PND 2), palmar grasp reflex (rat pup grasps a

paper clip with their forepaws if stroked, a reflex that usually disappears around PND 6), negative geotaxis test (first day when a 180° turn was assumed within a period of time not exceeding 30 s, after the rat pup was placed face-down on a 45° inclined platform, beginning on PND 5), and adult gait (when the rat pup walks without propping their ventral portion on the floor, beginning on PND 13).

2.3.2. General activity in the open field in infancy

The general activity of juvenile male pups was tested on PND 21. The open field device consisted of a round wooden arena (40 cm in diameter, 25.5 cm high walls) painted gray with an acrylic washable covering [5,15]. For the observations, each male pup was individually placed in the center of the apparatus, and the following parameters were automatically measured using Ethovision software (Ethovision; Noldus Information Technology, Leesburg, VA) over a period of 5 min: total locomotor activity (distance traveled in cm) and rearing frequency (number of times the animal stood on its hind legs). A video camera mounted 100 cm above the arena was used to collect the data that were analyzed by the Ethovision software, installed on an IBM-compatible computer placed in an adjacent room. The device was washed with a 5% alcohol/water solution before placement of the animals, to obviate possible biasing effects from odor clues left by the earlier rats.

2.3.3. General activity in the open field in adulthood

The general activity of male pups prenatally treated or not with LPS was also tested on PND 60. The open field device used consisted of a round wooden arena (90 cm in diameter, 28 cm high walls) painted gray with acrylic washable covering [5]. The methodology of this test and the registered parameters were the same as those used in the open field general activity test in infancy (Section 2.3.2).

2.3.4. Catalepsy induced by haloperidol

On PND 60, male pups prenatally treated with LPS, or not, were employed to study catalepsy induced by haloperidol. Catalepsy was measured 10, 20, 40, 60, 90, 120 and 180 min after i.p. haloperidol administration (2.5 mg/kg—Haldol®, Janssen-Cilag, São Paulo, SP, Brazil). Haloperidol induces a state in which a rat actively maintains static, stable equilibrium but does not spontaneously move [51]. Haloperidol blocks postsynaptic receptors, preventing DA activation [32]. Rats were tested individually for permanence in the upright position, with their forepaws flattened on a horizontal bar placed 11 cm above the bench. If both of the rat's paws dropped from the bar, they were re-positioned as before. Each rat was tested three times per session for catalepsy, and the results were considered as positive when the animal remained at least 30 s in the upright position [66]. Stopwatches were used to score the total seconds of catalepsy.

2.3.5. Stereotypy induced by apomorphine

On PND 60, the male pups prenatally treated with LPS or controls were used to study stereotypy; studies were performed individually in wire cages (30 cm × 15 cm × 19 cm) with food and water provided *ad libitum* and after a 6-h adaptation period. Stereotypy was then induced by subcutaneous administration of 0.6 mg/kg apomorphine hydrochloride (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Apomorphine is an agonist of dopaminergic receptors [47,55]. Stereotypy was quantified at 15, 25, 35, 45, 60 and 70 min after apomorphine administration. The scoring system used was as follows: 0, asleep or stationary; 1, active; 2, predominantly active but with bursts of stereotyped sniffing, rearing, or head bobbing but with locomotor activity still present; 3, constant stereotypical activity such as sniffing, rearing or head bobbing but with locomotor activity still present; 4, constant stereotypical activity limited to one location; 5, constant stereotypical activity but with bursts of licking and/or gnawing and biting; 6, continual licking and/or gnawing of cage grids [59].

2.3.6. General activity in the open field after a challenge

The general activity of adult male pups was also assessed after LPS challenge on PND 60. The methodology of this test was the same as for the open field general activity test in adulthood (Section 2.3.3). However, 90 min before this open field test, the male pups prenatally treated with LPS or saline received a 100 µg/kg dose of LPS i.p. The LPS dose and time interval were chosen because they were reported to cause sickness behavior as well as proinflammatory cytokines and glucocorticoids release following LPS administration [39].

2.3.7. Determination of dopamine levels and turnover in the striatum

On PND 60, male pups prenatally treated with LPS and controls were euthanized under deep CO₂ anesthesia. The brains were rapidly dissected on dry ice and prepared as described previously [16]. Briefly, the striatum was dissected, weighed, and stored at –80 °C until the neurochemical analyses. Following the sample collection, perchloric acid was added to the tissues, which were then homogenized by sonication for the immediate determination of DA levels. DA and its metabolites (3,4-dihydroxyphenylacetic acid [DOPAC] and homovanillic acid [HVA]) were measured by high-pressure liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu, model 6A, Kyoto, Japan) using a C-18 column (Shimapak, ODS, Kyoto, Japan), an electrochemical detector (model 6A, Shimadzu, Kyoto, Japan), a sample injector (15 and 20 µl valve), and an integrator (Chromatopac, Shimadzu, Kyoto, Japan). DA turnover (metabolite/neurotransmitter ratio) was also evaluated. Each sample was run for 18 min. The detection limit was 2 pg for DA and DOPAC, and 20 pg for HVA. The recovery

Table 1

Prenatal effects of LPS exposure (100 µg/kg on GD 9.5) on reflexological development, juvenile open field behaviors, catalepsy induced by haloperidol ($n=9$ for both the groups) and stereotypy induced by apomorphine in male rats ($n=8$ for both the groups, means $\pm$ SEMs).

Parameters	Control group	LPS group	<i>p</i>
Reflexological development			
Surface-righting reflex	2.67 $\pm$ 0.24	2.44 $\pm$ 0.24	0.5301
Palmar grasp reflex	5.11 $\pm$ 0.61	4.78 $\pm$ 0.40	0.6544
Negative geotaxis test	7.33 $\pm$ 0.29	7.78 $\pm$ 0.46	0.4286
Adult gait	15.00 $\pm$ 0.17	15.00 $\pm$ 0.41	0.9642
General activity in the open field in infancy			
Traveled distance (cm)	637.85 $\pm$ 88.66	506.49 $\pm$ 80.66	0.2893
Rearing frequency	7.11 $\pm$ 2.56	5.33 $\pm$ 1.68	0.5701
Catalepsy induced by haloperidol ^a			
10 min	66%	34%	0.3469
20 min	88%	78%	1.0000
40 min	78%	44%	0.3348
60 min	78%	44%	0.3348
90 min	88%	88%	1.5294
120 min	100%	88%	1.0000
180 min	100%	78%	0.4706
Stereotypy induced by apomorphine			
15 min	3.62 $\pm$ 0.18	3.25 $\pm$ 0.16	0.2165
25 min	4.50 $\pm$ 0.46	4.12 $\pm$ 0.35	0.6707
35 min	4.25 $\pm$ 0.37	3.87 $\pm$ 0.29	0.5240
45 min	3.00 $\pm$ 0.38	2.87 $\pm$ 0.48	0.8326
60 min	0.75 $\pm$ 0.49	0.50 $\pm$ 0.38	0.7046
70 min	0	0	–

^a Values are presented in percent of catalepsy. Student's *t*-test for parametric data, Mann–Whitney *U*-test for non-parametric data and Fisher's Exact test for the catalepsy test.

values were higher than 80% for all substances; the coefficients of variation were less than 15%, and the curve linearities were greater than 0.9.

2.4. Statistical analyses

Results were expressed as means $\pm$ SEMs. One male rat pup from each dam (used as unit) was considered in the offspring studies to avoid litter effects. Homoscedasticity was verified through the F or Bartlett's test. Normality was verified through the Kolmogorov–Smirnov test. Thus, Student's *t*-test (unpaired, two-tailed) was used to compare the parametric group data. For non-parametric data, the Mann–Whitney *U*-test was employed. For the catalepsy analysis, Fisher's Exact test was used. For the adult open field general activity test, one-way ANOVA followed by the Tukey test was employed. In all the cases, the results were considered as significant if $p < 0.05$.

3. Results

Prenatal LPS exposure did not affect the basal motor behavior of rats, i.e., without additional inflammatory stimuli. Thus, there were no significant differences in reflexological development, open field general activity of juveniles, catalepsy induced by haloperidol and stereotypy induced by apomorphine, with respect to the control group (Table 1).

However, as depicted in Fig. 1, the one-way ANOVA revealed significant differences in the open field general activity for both locomotor ($F(3/30)=19$, $p=0.0001$) and rearing activities ($F(3/30)=19$, $p=0.0001$), in male rats prenatally treated with LPS or saline and challenged with LPS in adulthood. The multiple comparisons test revealed no differences between the prenatal LPS group and the prenatal saline group, similar to the other motor behavior parameters analyzed above. Moreover, rats prenatally treated with saline and challenged with LPS in adulthood presented with reduced locomotor activity and rearing frequency, relative to the groups not challenged with LPS. In addition, male pups prenatally treated with LPS that received the LPS challenge in adulthood presented a greater decrease in locomotor and rearing activities than the rats prenatally treated with saline and challenged with LPS in adulthood. These data showed that the prenatal infection induced a long-term injury in animal life that could be observed after the immune challenge.

The striatum DA levels, metabolite levels and turnover rate are shown in Table 2. Data from one control rat pup were lost owing to technical reasons. Thus, the number of animals evaluated in this test was reset to seven control rats and eight LPS prenatally treated

Fig. 1. Prenatal effects of LPS exposure (100 µg/kg on GD 9.5) on open field behaviors of male rats analyzed on PND 60, with or without LPS challenge. Co: prenatal saline injection ($n=9$); LPS: prenatal LPS injection ($n=9$); Co+LPS: prenatal saline and adulthood LPS injection ($n=8$); LPS+LPS: prenatal and adulthood LPS injection ($n=8$). Values are means $\pm$ SEMs. Columns with different letters mean statistical differences (one-way ANOVA, followed by the Tukey test $p < 0.05$).

Table 2

Prenatal effects of LPS exposure (100 µg/kg on GD 9.5) on striatal dopamine and metabolite levels (ng/g) and turnover rate in male rats on PND 60 (means ± SEMs).

	Control group (n = 7)	LPS group (n = 8)
DA	9024.58 ± 290.25	7342.60 ± 541.36*
DOPAC	1077.31 ± 45.96	858.81 ± 65.74*
HVA	532.39 ± 21.27	434.76 ± 28.55*
DOPAC/DA	0.119 ± 0.002	0.117 ± 0.002
HVA/DA	0.059 ± 0.002	0.060 ± 0.002
HVA + DOPAC/DA	0.178 ± 0.002	0.177 ± 0.004

* $p < 0.05$ versus the control group (Student's *t*-test).

rats. Male pups prenatally treated with LPS showed reduced DA ($p = 0.0210$), DOPAC ($p = 0.0201$) and HVA ($p = 0.0191$) levels in the striatum, with respect to the control group. However, no differences in the ratio of DOPAC/DA ($p = 0.5142$), HVA/DA ($p = 0.8055$) and HVA + DOPAC/DA ($p = 0.7646$) were observed in the striatum of the animals of the experimental group, compared with controls.

4. Discussion

Prenatal LPS exposure did not affect the basal motor/exploratory behavior of rats. However, a difference was found in the open field data obtained for adult rats observed after an immune challenge with LPS, i.e., they presented with decreased open field general activities. In addition, striatal DA neurochemistry was affected by prenatal LPS exposure, with a decrease observed in the DA and metabolite levels.

These data suggest that the social behavior impairment found in our previous study [35] might have been related to a motivational impairment, since the animals' motor behavior was unaffected at the basal levels.

Furthermore, male rat pups treated prenatally with LPS could present anxiety-like behavior, which could reduce motor activity. To answer this question, in our previous study, these animals were observed on elevated plus maze test [35], developed for measuring anxiety-like behavior [36]. In this case, male rat pups treated prenatally with LPS (100 µg/kg, i.p., on GD 9.5) do not present any changes, in relation to the control group, regarding the percentage of entries into open arms versus closed arms and the percentage of time spent in the open arms versus closed arms [35]. Thus, these animals do not present anxiety-like behavior.

The fact that the prenatally treated rats did not demonstrate impairments in motor behavior at the basal level does not exclude prenatal LPS effects on pups. In fact, recent studies indicate that some behavioral effects caused by prenatal immune activation may not achieve prominence until adulthood [12]. Thus, some plasticity processes might have occurred during the animals' life, masking the possible behavioral changes induced by prenatal LPS, in an adaptive process [48,53,57].

During pregnancy, the fetal brain is developing, and environmental insults may have long-lasting consequences for adult brain function [46]. In fact, prenatal LPS exposure impaired the striatal dopaminergic system in adulthood. Importantly, the DA system is essential for animal survival, and it is known that brain areas related to motor function present high levels of neuronal plasticity [37]. This plasticity, usually at the postsynaptic receptor level, compensates for possible impairments in normal motor function, becoming apparent only when the immune system is challenged.

The neural plasticity also explains the lack of behavioral effects on motor behavior at basal levels despite the reduction on DA and metabolites levels. This way, it was expected that the administration of dopaminergic agonist and antagonist here employed would reveal the motor impairments induced by prenatal LPS exposure. As described, no effects were observed on haloperidol-induced catalepsy and apomorphine-induced stereotypy. Thus, it is possible

that the adaptive changes on motor system were due to interferences in presynaptic mechanisms but not at postsynaptic receptors levels.

Several studies describes that acute LPS administration in adult rodents induces only small and occasional changes in brain dopamine [14]. For example, at 2 h post-LPS administration (100 µg/kg i.p.) in adult rats, there are no changes in striatum DA and metabolites levels in male's brains, and only modest activation in female's brains [54].

In fact, we believe that the acute administration of LPS (on PND 60) may not interfere on brain DA levels, whereas is reasonable to understand dopaminergic changes after a prenatal infection, because the fetal brain is developing.

Even if prenatal LPS administration did not modify the basal motor behavior of rats, rats prenatally treated with LPS showed a decrease in distance traveled and rearing frequency, 90 min after the LPS challenge in adulthood. These behavioral findings might be related to the symptoms of sickness behavior already described for LPS [30,34,38]. LPS-induced sickness behavior is generally accompanied by a decrease in exploratory activity, social behavior, ingestive behavior, sexual behavior and induced anhedonia, and poor learning and cognitive functions [38].

The sickness behavior observed only after the LPS challenge in adulthood in male rat pups treated prenatally with LPS might have occurred because a perinatal stressor disrupted the normal programming of innate resistance to an immune challenge, resulting in enhanced immunological and behavioral responses to immune activation [2]. For example, neonatal stress due to maternal separation can influence the pups' response in adulthood, exacerbating the symptoms of sickness behavior in response to an LPS immune challenge [2]. Regarding this phenomenon, we also observed exacerbated symptoms of sickness behavior in response to an LPS challenge following a prior LPS prenatal treatment.

Concerning, prenatal LPS administration could also be considered a stressor, since LPS exposure induces stress via HPA axis stimulation, releasing corticosterone [22]. This way, both a neonatal stressor and prenatal LPS exposure are early negative events with potential long-lasting consequences on multiple organ systems. Indeed, these stressful events result in behavioral disturbances, endocrine and immunological disorders and an increased susceptibility to disease in humans and a variety of animal species [2].

The mechanism of action of these impairments on prenatally treated rats did not directly involve LPS, as this endotoxin was not found in pups after a prenatal injection [1]. However, the mechanism may involve the proinflammatory cytokines, since increased levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 β and IL-6 were detected in the fetal brain following prenatal LPS administration [7,61,63]. Moreover, due to the decreased striatal DA and metabolite levels found in adulthood, it is possible that the motor system could be modified by prenatal LPS treatment. If this is the case, the neurotransmitter and the brain region involved in motor activity – DA and the striatum, respectively [55,69] – may be impaired by prenatal LPS treatment.

In support of this hypothesis, Ling et al. [40] showed that prenatal LPS treatment of GD 10.5 increased TNF- α in the chorioamniotic fluid, reduced striatal DA, increased DA activity and led to a loss of tyrosine hydroxylase immunoreactive cells. These findings suggest that the rats might have had a permanent loss of DA neurons. In fact, prenatal exposure to LPS, which frequently occurs in humans due to bacterial vaginosis, leads to the birth of animals with fewer than normal DA neurons [41]. In lieu of the proximity of the day of treatment (GD 9.5 to GD 10.5), these data might confirm our behavioral and neurochemical findings of the motor activity decrease.

Glucocorticoids can cross the placenta and affect fetal HPA development, resulting in changes in the HPA axis function that persist throughout life; thus, another explanation for the possible

DA loss might be related to glucocorticoids. In fact, glucocorticoids are able to permanently modify or 'program' the dopaminergic system [33].

In conclusion, prenatal LPS exposure disrupted the dopaminergic system involved with motor function, but this neurochemical effect was not accompanied by behavioral impairment, probably due to adaptive plasticity processes. Notwithstanding, behavioral impairment was revealed when animals were challenged with LPS, resulting in enhanced sickness behavior.

Therefore, this study showed that a prenatal bacterial infection can be considerably harmful for the animal's life, leading to locomotor and exploratory restrictions. Even if the impairments are not initially apparent, a single common bacterial infection in an adult animal can trigger a series of substantial impairments.

Acknowledgments

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant 06/54587-9, and thematic grant 04/14128-0) and CNPq (grants 472083/2007-4 and 301177/2007-4). This research is also part of the Master's thesis being presented by Thiago Berti Kirsten to the Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo. Special thanks are extended to Marcia H. Sukikara for helping with the neurochemical experiments.

References

- [1] Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2006;11(1):47–55.
- [2] Avitsur R, Sheridan JF. Neonatal stress modulates sickness behavior. *Brain Behav Immun* 2009.
- [3] Bernardi MM, De Souza H, Palermo-Neto J. Effects of single and long-term haloperidol administration on open field behavior of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1981;73(2):171–5.
- [4] Bernardi MM, Scavone C, Frussa-Filho R. Differential effects of single and long-term amphetamine and apomorphine administrations on locomotor activity of rats. *Gen Pharmacol* 1986;17(4):465–8.
- [5] Broadhurst PL. Experiments in psychogenetics: applications of biometrical genetics to the inheritance of behaviour. In: Eysenck HJ, editor. *Experiments in personality*, vol. 1. London: Routledge & Kegan Paul; 1960. p. 1–256.
- [6] Brown AS. Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophr Bull* 2006;32(2):200–2.
- [7] Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, Rhodes PG. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr Res* 2000;47(1):64–72.
- [8] Carvalho-Freitas MI, Anselmo-Franci JA, Teodorov E, Nasello AG, Palermo-Neto J, Felicio LF. Reproductive experience modifies dopaminergic function, serum levels of prolactin, and macrophage activity in female rats. *Life Sci* 2007;81(2):128–36.
- [9] Carvalho-Freitas MI, Rodrigues-Costa EC, Nasello AG, Palermo-Neto J, Felicio LF. In vitro macrophage activity: biphasic effect of prolactin and indirect evidence of dopaminergic modulation. *Neuroimmunomodulation* 2008;15(2):131–9.
- [10] Chiavegatto S, Bernardi MM. Prenatal versus postnatal effects on offspring weight gain of rats exposed to diphenhydramine: a critical evaluation of fostering procedures in rats. *Comp Biochem Physiol A: Comp Physiol* 1991;99(1–2):219–21.
- [11] Collins JG, Smith MA, Arnold RR, Offenbacher S. Effects of *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on pregnancy outcome in the golden hamster. *Infect Immun* 1994;62(10):4652–5.
- [12] Coyle P, Tran N, Fung JN, Summers BL, Rofe AM. Maternal dietary zinc supplementation prevents aberrant behaviour in an object recognition task in mice offspring exposed to LPS in early pregnancy. *Behav Brain Res* 2009;197(1):210–8.
- [13] Desesso JM. Comparative features of vertebrate embryology. In: Hood RD, editor. *Developmental and reproductive toxicology: a practical approach*. Boca Raton: CRC Taylor & Francis; 2006.
- [14] Dunn AJ. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. *Clin Neurosci Res* 2006;6(1–2):52–68.
- [15] Faggini BM, Palermo-Neto J. Differential alterations in brain sensitivity to amphetamine and pentylentetrazol in socially deprived mice. *Gen Pharmacol* 1985;16(3):299–302.
- [16] Felicio LF, Florio JC, Sider LH, Cruz-Casallas PE, Bridges RS. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. *Brain Res Bull* 1996;40(4):253–6.
- [17] Felicio LF, Palermo-Neto J, Nasello AG. Perinatal bromopride treatment: effects on motor activity and stereotyped behavior of offspring. *Physiol Behav* 1989;45(6):1081–5.
- [18] Florio JC, Sakate M, Palermo-Neto J. Effects of amitraz on motor function. *Pharmacol Toxicol* 1993;73(2):109–14.
- [19] Fortier ME, Luheshi GN, Boksa P. Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. *Behav Brain Res* 2007;181(2):270–7.
- [20] Frussa-Filho R, Abilio VC, Bergamo M, Palermo-Neto J. Behavioural subsensitivity induced by long-term administration of a low dose of haloperidol to rats. *J Pharm Pharmacol* 1997;49(4):412–5.
- [21] Frussa-Filho R, Palermo-Neto J. Effects of single and long-term droperidol administration on open-field and stereotyped behavior of rats. *Physiol Behav* 1991;50(4):825–30.
- [22] Gayle DA, Belosessky R, Desai M, Amidi F, Nunez SE, Ross MG. Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286(6):R1024–1029.
- [23] Gilliam TC, Kandel ER, Jessel TM. Genes and Behavior. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, editors. *Principles of neural science*. 4th edition New York: McGraw-Hill; 2000. p. 36–62.
- [24] Girault JA, Greengard P. The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol* 2004;61(5):641–4.
- [25] Golan HM, Lev V, Hallak M, Sorokin Y, Huleihel M. Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology* 2005;48(6):903–17.
- [26] Gomez-Serrano M, Tonelli L, Listwak S, Sternberg E, Riley AL. Effects of cross fostering on open-field behavior, acoustic startle, lipopolysaccharide-induced corticosterone release, and body weight in Lewis and Fischer rats. *Behav Genet* 2001;31(5):427–36.
- [27] Gorniak SL, Palermo-Neto J, de Souza-Spinosa H. Effects of a *Palicourea marcgravii* leaf extract on some dopamine-related behaviors of rats. *J Ethnopharmacol* 1990;28(3):329–35.
- [28] Groenewegen HJ. The basal ganglia and motor control. *Neural Plast* 2003;10(1–2):107–20.
- [29] Harju K, Ojanen M, Rounioja S, Glumoff V, Paananen R, Vuolteenaho R, et al. Expression of toll-like receptor 4 and endotoxin responsiveness in mice during perinatal period. *Pediatr Res* 2005;57(5 Pt 1):644–8.
- [30] Hart BL. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev* 1988;12(2):123–37.
- [31] Hava G, Vered L, Yael M, Mordechai H, Mahoud H. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. *Dev Psychobiol* 2006;48(2):162–8.
- [32] Janssen PA. The pharmacology of haloperidol. *Int J Neuropsychiatry* 1967;3(Suppl. 1):10–8.
- [33] Kapoor A, Petropoulos S, Matthews SG. Fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. *Brain Res Rev* 2008;57(2):586–95.
- [34] Kent S, Bluth RM, Kelley KW, Dantzer R. Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13(1):24–8.
- [35] Kirsten TB, Taricani M, Maiorka PC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. *Neuroimmunomodulation* 2010;17(4):240–51.
- [36] Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated plus maze for mice. *J Vis Exp* 2008;(22).
- [37] Kreitzer AC, Malenka RC. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 2008;60(4):543–54.
- [38] Larson SJ, Dunn AJ. Behavioral effects of cytokines. *Brain Behav Immun* 2001;15(4):371–87.
- [39] Lenczowski MJ, Van Dam AM, Poole S, Larrick JW, Tilders FJ. Role of circulating endotoxin and interleukin-6 in the ACTH and corticosterone response to intraperitoneal LPS. *Am J Physiol* 1997;273(6 Pt 2):R1870–7.
- [40] Ling Z, Gayle DA, Ma SY, Lipton JW, Tong CW, Hong JS, et al. In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain. *Mov Disord* 2002;17(1):116–24.
- [41] Ling Z, Zhu Y, Tong CW, Snyder JA, Lipton JW, Carvey PM. Prenatal lipopolysaccharide does not accelerate progressive dopamine neuron loss in the rat as a result of normal aging. *Exp Neurol* 2009;216(2):312–20.
- [42] Lourenco GA, Dorce VA, Palermo-Neto J. Haloperidol treatments increased macrophage activity in male and female rats: influence of corticosterone and prolactin serum levels. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005;15(3):271–7.
- [43] Manson JM, Kang YJ. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes AW, editor. *Principles and methods of toxicology*. 2nd edition New York: Raven Press; 1989. p. 311–59.
- [44] Meyer ME, Cottrell GA, Van Hartesveldt C. Dopamine D1 antagonists potentiate the durations of bar and cling catalepsy and the dorsal immobility response in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1992;41(3):507–10.
- [45] Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, et al. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci* 2006;26(18):4752–62.
- [46] Meyer U, Yee BK, Feldon J. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? *Neuroscientist* 2007;13(3):241–56.
- [47] Monti JM, Jantos H. The roles of dopamine and serotonin, and of their receptors, in regulating sleep and waking. *Prog Brain Res* 2008;172:625–46.
- [48] Nudo RJ. Plasticity *NeuroRx* 2006;3(4):420–7.

- [49] Palermo-Neto J. Dopaminergic systems. Dopamine receptors. *Psychiatr Clin North Am* 1997;20(4):705–21.
- [50] Palermo-Neto J, Frussa-Filho R, Vital MA. Kinetic analysis of GM1 effects on haloperidol-induced dopaminergic supersensitivity. *Gen Pharmacol* 1999;32(2):265–70.
- [51] Pellis SM, Pellis VC. Posture. In: Whishaw IQ, Kolb B, editors. *The behavior of the laboratory rat: a handbook with tests*. New York: Oxford University Press; 2005. p. 121–8.
- [52] Perry JC, Vital MA, Frussa-Filho R, Tufik S, Palermo-Neto J. Monosialoganglioside (GM1) attenuates the behavioural effects of long-term haloperidol administration in supersensitive rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 2004;14(2):127–33.
- [53] Pia HW. Plasticity of the central nervous system—a neurosurgeon's experience of cerebral compensation and decompensation. *Acta Neurochir (Wien)* 1985;77(3–4):81–102.
- [54] Pitychoutis PM, Nakamura K, Tsonis PA, Papadopoulou-Daifoti Z. Neurochemical and behavioral alterations in an inflammatory model of depression: sex differences exposed. *Neuroscience* 2009;159(4):1216–32.
- [55] Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Chemical transmission and drug action in the central nervous system. In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, editors. *Rang and Dale's pharmacology*. 6th edition London: Elsevier Churchill Livingstone; 2007. p. 473–8.
- [56] Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med* 2007;25(1):21–39.
- [57] Rosenzweig MR. Aspects of the search for neural mechanisms of memory. *Annu Rev Psychol* 1996;47:1–32.
- [58] Samuelsson AM, Jennische E, Hansson HA, Holmang A. Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290(5):R1345–1356.
- [59] Setler P, Sarau H, McKenzie G. Differential attenuation of some effects of haloperidol in rats given scopolamine. *Eur J Pharmacol* 1976;39(1):117–26.
- [60] Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, Patterson PH. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J Neurosci* 2003;23(1):297–302.
- [61] Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirmics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci* 2007;27(40):8.
- [62] Spencer SJ, Mouihate A, Galic MA, Ellis SL, Pittman QJ. Neonatal immune challenge does not affect body weight regulation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293(2):R581–9.
- [63] Urakubo A, Jarskog LF, Lieberman JA, Gilmore JH. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. *Schizophr Res* 2001;47(1):27–36.
- [64] Vital MA, Florio JC, Frussa-Filho R, De Lucia R, Tufik S, Palermo-Neto J. Effects of haloperidol and GM1 ganglioside treatment on striatal D2 receptor binding and dopamine turnover. *Life Sci* 1998;62(13):1161–9.
- [65] Vital MB, Frussa-Filho R, Palermo-Neto J. Monosialoganglioside increased the in vivo affinity of D2 receptors for apomorphine in supersensitive rats. *Ann NY Acad Sci* 1998;845:428–9.
- [66] Wang S, Hu LF, Yang Y, Ding JH, Hu G. Studies of ATP-sensitive potassium channels on 6-hydroxydopamine and haloperidol rat models of Parkinson's disease: implications for treating Parkinson's disease? *Neuropharmacology* 2005;48(7):984–92.
- [67] Wang X, Rousset CI, Hagberg H, Mallard C. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11(5):343–53.
- [68] Xu DX, Chen YH, Wang H, Zhao L, Wang JP, Wei W. Tumor necrosis factor alpha partially contributes to lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal growth restriction and skeletal development retardation in mice. *Toxicol Lett* 2006;163(1):20–9.
- [69] Yelnik J. Functional anatomy of the basal ganglia. *Mov Disord* 2002;17(Suppl. 3):S15–21.

Prenatal LPS exposure reduces olfactory perception in neonatal and adult rats

Thiago Berti Kirsten^{a,*}, Gabriela Pena Chaves^b, Marina Taricano^a, Daniel Oliveira Martins^b,
Jorge Camilo Flório^a, Luiz Roberto Giorgetti de Britto^b, Andrea da Silva Torrão^b,
João Palermo-Neto^a, Maria Martha Bernardi^{a,c}

^a Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, 05508–270, São Paulo, SP, Brazil

^b Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, 05508–900, São Paulo, SP, Brazil

^c Health Sciences Institute, Paulista University, Rua Dr. Bacelar, 1212, 04026–002, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 January 2011

Received in revised form 4 April 2011

Accepted 25 April 2011

Keywords:

Cat odor

Immunoblotting

Maternal behavior

Maternal odor

Monoamine levels

Prenatal infection

ABSTRACT

Prenatal lipopolysaccharide (LPS) exposure causes reproductive, behavioral and neurochemical defects in both dams and pups. The present study evaluated male rats prenatally treated with LPS for behavioral and neurological effects related to the olfactory system, which is the main sensorial path in rodents. Pregnant Wistar rats received 100 µg/kg of LPS intraperitoneally (i.p.) on gestational day (GD) 9.5, and maternal behavior was evaluated. Pups were evaluated for (1) maternal odor preference, (2) aversion to cat odor, (3) monoamine levels and turnover in the olfactory bulb (OB) and (4) protein expression (via immunoblotting) within the OB dopaminergic system and glial cells. Results showed that prenatal LPS exposure impaired maternal preference and cat odor aversion and decreased dopamine (DA) levels in the OB. This dopaminergic impairment may have been due to defects in another brain area given that protein expression of the first enzyme in the DA biosynthetic pathway was unchanged in the OB. Moreover, there was no change in the protein expression of the DA receptors. The fact that the number of astrocytes and microglia was not increased suggests that prenatal LPS did not induce neuroinflammation in the OB. Furthermore, given that maternal care was not impaired, abnormalities in the offspring were not the result of reduced maternal care.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Prenatal viral and bacterial infections impair short- and long-term behavior and central nervous system activity of animals [1–3]. Specifically, previous investigations by our group have shown that prenatal treatment with lipopolysaccharide (LPS) (100 µg/kg, intraperitoneally [i.p.]), which mimics bacterial infections, on gestational day (GD) 9.5 in rats, reduces male offspring social behavior in infancy and adulthood, as well as open field general activity after a LPS challenge [4,5]. Moreover, prenatal LPS decreases striatal dopamine (DA) and metabolite levels [4]. The immunological system is also affected, as evidenced by an attenuated response to experimentally induced asthma [44].

It has been suggested that the effects of maternal LPS exposure on the developing fetal brain are mediated by cytokine induction within the maternal circulation and placenta [6–9]. Prenatal LPS exposure has been shown to increase the levels of both cytokines and glucocorticoids in the fetal brain [10,11].

Infections associated with immunological events in early/middle fetal life (e.g., GD 8–10 in rats and mice) might have a stronger neurodevelopmental impact than late-pregnancy infections. Maternal immune activation during early/middle pregnancy may interfere with cell proliferation, differentiation, migration, target selection, and synapse maturation, eventually leading to multiple brain and behavioral abnormalities in adulthood [12–15].

Prenatal infections also modify animal sensory systems. For example, prenatal LPS or polyriboinosinic–polyribocytidylic acid (polyI:C; which mimics viral infections) exposure in rodents impairs the ability of animals to “gate out” sensory and cognitive information, with a disrupted prepulse inhibition of the acoustic startle reflex [16,17].

Although there have been studies investigating the links between prenatal infections and sensory system impairments, the role of prenatal infections in the olfactory system has not yet been elucidated. The aim of the present study was therefore to evaluate behavioral and neurological properties related to the olfactory system in male rats prenatally treated with LPS. The olfactory system was chosen for this investigation for several reasons. First, it is the main sensorial path of rodents, which is virtually blind compared to humans [18]. Second, the dopaminergic system of the olfactory bulb (OB) is necessary for the processing of odorant information from olfactory receptor neurons [19]. Third, the dopaminergic system,

* Corresponding author at: Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, São Paulo, SP 05508–270, Brazil. Tel.: +55 11 3091 1376; fax: +55 11 3091 7829.

E-mail address: thik@hotmail.com (T.B. Kirsten).

particularly of the olfactory tubercle, plays an important role in the control of rewarded/punished behaviors [20–22]. Additionally, an acute LPS administration affects the olfactory dopamine system in adult mice [23]. For these reasons, we investigated LPS-treated pups for (1) maternal odor preference, (2) aversion to cat odor, (3) monoamine levels and turnover in the OB and (4) protein expression (via immunoblotting) within the OB dopaminergic system and glial cells. Maternal behavior was also investigated to exclude the possibility that altered maternal care could be responsible for the behavioral and neurological impairments observed in their offspring [24–26].

2. Material and methods

2.1. Animals

Thirty-two pregnant Wistar rats with 12–13 weeks of age, weighing 216–263 g each, were used (GD 0 defined as when spermatozoa were detected in the vaginal smear). Dams were individually housed in polypropylene cages (38×32×16 cm) at controlled temperature (22±2 °C), humidity (65–70%), and artificial lighting (12-hour light/12-hour dark cycle, lights on at 6:00 AM). Animals had free access to Nuvilab® rodent chow (Nuvital Co., São Paulo, SP, Brazil) and filtered water. Sterilized and residue-free wood shavings were used as animal bedding. Animals were distributed into control and experimental (LPS-treated) groups (n = 8 dams/group for maternal behavior and n = 1 pup/litter, 8 pups total for each offspring study). Dams were allowed to give birth and nurture their offspring normally. The day of birth was considered as post-natal day (PND) 1. No handling was performed on PND 1, but on PND 2, 8 offspring (4 males and 4 females) were randomly selected. No cross-fostering procedure was used. Litters with fewer than 8 pups were culled. The 8 pups were kept with each dam until weaning (PND 21). On PND 21, littermates were separated, co-housed by sex and in the same laboratory conditions as their parents. One male pup from each litter was used for each experiment; the female offspring was separated to be used in other experiments. All experiments were performed between 8:00 and 11:00 AM, and control and LPS-treated rats were tested intermixed. The animals used in this study were kept in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources of the School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Brazil (protocol No. 1398/2008, FMVZ – USP). These guidelines are similar to those of the National Institutes of Health, Bethesda, MD. Experiments were carried out in accordance with the good laboratory practice protocols and with quality assurance methods.

2.2. Treatment

LPS (from *Escherichia coli*, Sigma®, serotype 0127: B8) was dissolved in sterile saline (50 µg/ml LPS in a 0.9% NaCl solution) and administered i.p. to pregnant rats at a dose of 100 µg/kg on GD 9.5. This dose was chosen because it has been reported to (1) elicit sickness behavior in dams, (2) induce endocrine alterations, (3) increase cytokines at the placental level, and (4) impair offspring viability and reduce the social behavior of male offspring during infancy and adulthood [5,27,28]. The control group consisted of pregnant rats submitted to the same treatment schedule but receiving sterile saline (0.9% NaCl) only. Each control dam was treated with 0.1 ml/100 g saline solution.

2.3. Maternal behavior

Maternal behavior testing was performed on PND 5. Pups were removed from the dam at 8:00 AM and placed in another cage away from their mother. Immediately following the separation, the

presence of a nest in the home cage was evaluated. Sixty minutes following maternal separation, all pups were returned to the cage of their mother, and the maternal behavior testing began. The retrieval of the first pup (time, s), the retrieval of all pups (s), grouping (s), crouching (s) and full maternal behavior (s) were scored [29–31]. Dams were scored as displaying full maternal behavior if they retrieved all pups to the nest and displayed nursing behavior with their back arched over the pups for 3 consecutive minutes. If animals were not scored as displaying full maternal behavior following 30 min of continuous observation, they were checked every 15 min for 60 min and then hourly thereafter until full maternal behavior was observed. Events observed following the first 30 min of continuous observation were recorded at the time of the first observation (e.g. if full maternal behavior was first observed at 60 min, the full maternal behavior latency was scored as 60 min). The same criterion was used for all maternal responses.

2.4. Maternal odor preference test

Maternal odor preference testing was performed on PND 7 as described elsewhere [32]. Briefly, one male pup from each experimental and control litter (n = 8 for each group) was examined. The test design was based on studies of associative olfactory learning and consisted of a two-odor choice between areas with nest material or fresh bedding. A polypropylene cage (38×32×16 cm) divided in half by a 2-cm wide neutral zone running the length of the box was used. In each area, 300 mL of fresh or nest bedding was placed in adjacent corners. The pup was placed in the 2-cm neutral zone at the end of the box facing the opposite target beddings. During the 1-min trial, the amount of time the pup (the head or the whole body) spent in each of the two areas was recorded. Animals were tested in five trials with an inter-test interval of 2 min during which the pup was placed in the home cage. In each trial, beddings were switched between the sides of the box. Following each test period, the box was cleaned with 5% ethanol to remove trace odors. Experiments were recorded with a video camera for later analysis. The pups' total time in each area was obtained by combining the times from the five trials.

2.5. Aversive exposure to cat odor test

One prenatally LPS-treated and control (un-treated) adult (PND 60) male rat from each litter (n = 8 for both groups) was used to evaluate the effects of cat odor exposure, which is an aversive olfactory stimuli. Moreover, another eight rats without any treatment were used as neutral group, not exposed to cat odor.

Cat odor was obtained by rubbing a damp cloth (18×22 cm) vigorously against the fur of a domestic female adult cat for 5 min. This procedure was carried out 1 h prior to the experimental session. The cat odor cloth was kept in a sealed plastic bag. Each cloth was used for four exposures only. Damp pieces from the original cloth, not rubbed on the cat, were used for the neutral odor. All odor exposures took place in a separate, small, dimly lit room, and neutral odor exposures always preceded the cat odor exposures in order to prevent any traces of cat odor influencing the neutral odor group. Prior to the first cat odor exposure, the cloth with cat odor was left in the test room for 10 min. Each rat was carried to the exposure room in a home-cage that was placed next to the odor cloth wedged between the cage tops. The cloth was placed at the opposite end from the food and water containers. The duration of the test was 5 min, and the rats were videotaped for later scoring. The number and the time (s) of cloth contact were defined as direct contact or sniffing ≤5 cm from the cloth. The number of sheltering events and the duration (s) of sheltering were defined as when the rat was underneath the food and water compartments. For further details, see Zangrossi and File 1992 and Andrews et al. 1993 [33,34].

2.6. Determination of monoamine levels and turnover in the olfactory bulb

On PND 60, male rats prenatally treated with LPS or controls ($n = 8$ for both groups) were decapitated. Brains were rapidly dissected on dry ice and prepared as described previously [35]. Briefly, the OB was dissected, weighed, and stored at -80°C until used for further analyses. Following sample collection, tissue was placed in a perchloric acid solution and homogenized by sonication for the immediate determination of neurotransmitter and metabolites levels. DA and its metabolites (3,4-dihydroxyphenylacetic acid [DOPAC], and homovanillic acid [HVA]), serotonin (5-HT) and its metabolite 5-hydroxyindolacetic acid (5HIAA) and norepinephrine (NOR) were measured by high-pressure liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu, model 6A, Kyoto, Japan) using a C-18 column (Shimpack, ODS, Kyoto, Japan), an electrochemical detector (model 6A, Shimadzu, Kyoto, Japan), a sample injector (15 and 20 μl valve), and an integrator (Chromatopac, Shimadzu, Kyoto, Japan). DA and 5-HT turnover (metabolite/neurotransmitter ratio) were also evaluated. Each sample was run for 18 min. The detection limit for DA, DOPAC, HVA, 5-HT, 5HIAA and NOR was 2 pg. Recovery values were higher than 80% for all substances, the coefficients of variation were less than 15%, and the curve linearities were greater than 0.9.

2.7. Immunoblotting in the olfactory bulb

Protein expression was analyzed as described elsewhere [36]. Briefly, male rats prenatally treated with LPS or controls ($n = 6-8$ for both groups) were decapitated at PND 60 and the OB were rapidly collected and homogenized in an extraction buffer. Homogenates were subjected to centrifugation and the protein concentration of the supernatant was determined using a protein assay (Bio-Rad®, Hercules, CA, USA). Samples from the homogenate containing 75–100 μg protein were run on an acrylamide gel and electrotransferred to nitrocellulose membranes using a Trans-Blot cell system (Bio-Rad®, Hercules, CA, USA). Nitrocellulose membranes were then blocked and incubated with the following primary antibodies: mouse anti-tyrosine hydroxylase (TH) monoclonal antibody, mouse anti-dopamine D1a receptor monoclonal antibody, rabbit anti-human dopamine receptor D2 polyclonal antibody (Chemicon®, Temecula, CA, USA), mouse anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) monoclonal antibody to mark astrocytes (Sigma®, St. Louis, MO, USA) and mouse anti-rat CD11b/c monoclonal (OX-42) to mark microglia (Pharmingen BD Biosciences®, CA, USA). A loading control of β -actin was used in all experiments with an anti- β -actin antibody (Sigma®, St. Louis, MO, USA). Bound antibodies were visualized using a chemiluminescence kit (ECL Kit; Amersham Biosciences®, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). Lastly, blots were densitometrically analyzed using Scion Image 4.0.2 software (Scion Corporation®, Frederick, MD, USA). Because there were no changes in the expression levels of β -actin under our conditions, the optical densities of TH, D1a, D2, GFAP and OX-42 bands were first normalized in relation to the corresponding β -actin bands in each experiment. Normalized data were subsequently analyzed for changes in protein expression levels in the LPS-treated OB compared to controls for each time point.

2.8. Statistical analyses

Results were expressed as means $\pm$ SEMs. One male rat pup from each dam (used as a unit) was considered in the offspring studies to avoid litter effects. Homoscedasticity was verified through the F or Bartlett's test. Normality was verified through the Kolmogorov–Smirnov test. The Student's *t*-test (unpaired, two-tailed) was used to compare the parametric group data. For the cat odor aversion test, a one-way analysis of variants (ANOVA) followed by the Tukey test was used. In all cases, results were considered significant if $p < 0.05$.

3. Results

Dams from the LPS-treated group retrieved the first pup faster than the controls. However, LPS exposure did not affect any other aspect of maternal behavior, i.e., the retrieval of all other pups, grouping, crouching, full maternal behavior and nest presence (Table 1). Thus, maternal behavior was slightly improved in pregnant rats treated with LPS on GD 9.5.

As depicted in Fig. 1, prenatal treatment with LPS impaired maternal odor preference. Prenatally treated pups spent less time over the nest material than controls in the third and fourth trials and less total time, summed over of the five trials.

As depicted in Fig. 2, prenatal treatment with LPS also impaired the aversive response of adult rats to cat odor. The time in contact with the cloth was reduced in controls, but not in the LPS group, when compared with neutral odor group. The control group and the LPS-treated group showed a reduced number of cloth contacts when compared to the neutral odor group. The number of sheltering events and the time of sheltering were not different between neutral odor, control and LPS-treated groups (number of sheltering events: neutral odor group = 4.87 ± 0.48 , control group = 4.87 ± 0.81 , LPS group = 5.50 ± 0.42 , $p = 0.6978$; time of sheltering: neutral group = 85.25 ± 18.16 , control group = 140.10 ± 15.76 , LPS group = 120.30 ± 13.04 , $p = 0.0663$).

The OB monoamine and metabolite levels and turnover rates are shown in Table 2. Adult male pups prenatally treated with LPS presented a reduction in OB DA levels with respect to the control group. However, no differences in the levels of DOPAC, HVA, 5-HT, 5HIAA, NOR, or in the DOPAC/DA, HVA/DA, and 5HIAA/5-HT ratios, were observed in the OB of the LPS-treated group when compared with controls.

Olfactory bulb protein expression levels are shown in Table 3. No differences in TH, D1a, D2, GFAP and OX-42 expression levels were found between LPS-treated and control groups.

4. Discussion

The present study shows that prenatal LPS exposure impairs behaviors and neurochemical properties related to olfaction. These impairments were not induced by a decrease in maternal care, which was essentially unchanged. Dams treated with LPS, in fact, were more motivated to retrieve the first pup following separation. Consequently, pups of dams treated with LPS received the same or even more attention from their mothers compared to controls. The impairments shown by the pups, therefore, were likely due to actions of maternal immunological mediators released following prenatal LPS exposure, particularly proinflammatory cytokines within the maternal

Table 1

Effects of LPS exposure (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ on GD 9.5) on maternal behavior in rats on PND 5 ($n = 8$ for both groups, data presented as means $\pm$ SEMs).

Parameters	Control group	LPS group	<i>p</i>
1st pup retrieval(s)	30.88 $\pm$ 6.60	12.75 $\pm$ 4.34*	0.0377
2nd pup retrieval(s)	51.38 $\pm$ 5.74	76.75 $\pm$ 24.78	0.3355
3rd pup retrieval(s)	70.25 $\pm$ 6.55	89.63 $\pm$ 24.55	0.4584
4th pup retrieval(s)	112.38 $\pm$ 13.68	121.25 $\pm$ 30.23	0.7930
5th pup retrieval(s)	202.50 $\pm$ 40.88	155.00 $\pm$ 27.28	0.3502
6th pup retrieval(s)	350.63 $\pm$ 63.47	216.00 $\pm$ 49.36	0.1162
7th pup retrieval(s)	424.13 $\pm$ 64.07	274.75 $\pm$ 51.80	0.0913
8th pup retrieval(s)	536.88 $\pm$ 82.80	478.25 $\pm$ 133.00	0.7139
Grouping(s)	544.38 $\pm$ 90.98	509.75 $\pm$ 51.11	0.7450
Crouching(s)	936.50 $\pm$ 53.95	809.38 $\pm$ 76.13	0.1946
Full maternal behavior(s)	1346.88 $\pm$ 48.88	1320.13 $\pm$ 125.00	0.8449
Nest presence	8/8	7/8	–
45 min	7/8	7/8	–
60 min	7/8	7/8	–

* $p < 0.05$ versus the control group (Student's *t*-test).

Fig. 1. Effects of prenatal LPS exposure (100 µg/kg on GD 9.5) on time spent over nest bedding area in the maternal odor preference test in infant male rat pups on PND 7. Gray bars = control group; black bars = LPS group. $n = 8$ pups/group. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ (Student's t test) compared with the control group. Values are represented as means $\pm$ SEM.

circulation and placenta [9]. Importantly, these molecules can also be detected in the fetal brain [7–10].

Infant rats prenatally treated with LPS presented impairment in the maternal odor preference test, spending less time over nest material. These data represent a strict impairment in olfaction because rats have their eyes closed on PND 7 and olfaction is the first sensory system to become functional [18,37].

Prenatal LPS also reduced the cat aversion response in adulthood. LPS prenatally treated rats spent statistically the same amount of time in contact with the cloth with cat odor as the neutral odor group spent in contact with the neutral odor cloth. However, rats in the control (untreated) group reduced the time spent with the cloth with cat odor when compared to the neutral odor group. Aversion to cat odor represents an instinctive, response to the odor of a natural predator [33]. In other words, rats prenatally exposed to LPS did not respond to cat odor as an aversive stimulus. Moreover, the rat olfactory system was impaired both in infancy and adulthood, suggesting that prenatal LPS exposure induced a long-lasting impairment in olfactory function.

Cat odor exposure is a test of anxiety. Normally, rats display anxiogenic responses during a cat odor exposure, such as a decreased contact with the cat odor cloth without habituation after several trials [33]. However, treated rats did not present decreased contact with the cat odor, i.e., they did not display these anxiety-related behaviors. At first, apparently prenatal treatment with LPS disrupted anxiety mechanisms. Indeed, in our previous study, prenatal LPS did not change anxiety parameters in relation to controls when evaluated by activity on the elevated plus maze, which is currently the most popular test of anxiety [5]. Thus, based on maternal odor preference test and determination of monoamine levels and turnover in the OB findings, we believe that an olfactory defect is responsible for the lack of an anxiety response in this model.

Fig. 2. Effects of prenatal LPS exposure (100 µg/kg on GD 9.5) on aversion to cat odor in adult male rats at PND 60. $n = 8$ /group. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.0001$ (one-way ANOVA followed by the Tukey test) compared with the neutral odor group. Values are represented as means $\pm$ SEM.

Table 2

Effects of prenatal LPS exposure (100 µg/kg on GD 9.5) on OB DA and metabolite levels (ng/g) and turnover rates in adult male rats on PND 60 ($n = 8$ for both groups, data presented as means $\pm$ SEMs).

Parameters	Control group	LPS group	<i>p</i>
DA	157.25 $\pm$ 16.98	85.79 $\pm$ 10.74**	0.0032
DOPAC	21.20 $\pm$ 2.87	15.32 $\pm$ 3.84	0.2399
HVA	12.28 $\pm$ 1.44	8.43 $\pm$ 2.13	0.1567
DA + DOPAC + HVA	190.73 $\pm$ 19.86	109.54 $\pm$ 13.40**	0.0044
DOPAC/DA	0.14 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.03	0.3572
HVA/DA	0.08 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.02	0.3754
5-HT	128.57 $\pm$ 5.10	106.64 $\pm$ 13.74	0.1568
5HIAA	137.66 $\pm$ 5.75	114.29 $\pm$ 15.20	0.1726
5HIAA/5-HT	1.08 $\pm$ 0.06	1.09 $\pm$ 0.08	0.9079
NOR	12.89 $\pm$ 1.51	11.98 $\pm$ 1.83	0.7069

** $p < 0.01$ versus the control group (Student's t -test).

The impairment to respond to an attractive olfactory stimulus (maternal odor) and an aversive olfactory stimulus (cat odor) in rats prenatally treated with LPS could be a result of motor impairments. However, our previous study indicated that these animals have normal motor activity when evaluated for reflexological development, open field general activity in infancy and adulthood, catalepsy induced by haloperidol and stereotyped behavior induced by apomorphine [4].

The behavioral indications of olfactory impairments in infant and adult rats prenatally treated with LPS can be explained by decreased DA levels in the OB. This result also reinforces the idea that the olfactory system is impaired in these rats. Moreover, DA plays an important role on olfaction [38,39]. However, besides the observed decrease in DA levels in the LPS-treated group, the metabolite (DOPAC and HVA) levels, as well as the metabolite/neurotransmitter ratio (DA turnover) were not modified. The fact that the turnover of DA was not altered, suggests that dopaminergic system activity was normal in the OB. In addition to decreased DA, the total values of DA and the metabolites (DA + DOPAC + HVA) were also decreased, showing that the DA decrease is the critical factor involved with the olfactory impairment. In other words, the rate of synthesis and degradation was not modified, although the level of the neurotransmitter was lower.

Furthermore, protein expression of the first enzyme in the DA biosynthetic pathway, TH, and the dopamine receptors D1a, and D2 were unchanged in the OB. According to Cave and Baker [19], the expression of TH in the OB is restricted to the glomerular layer, where DA interneurons are found. Thus, DA production by DA interneurons in the OB may not be altered. This being the case, the reduced DA levels found in the OB may not be a consequence of dopaminergic impairment in the OB itself but of dopaminergic impairment in afferent fibers from the olfactory DA system and/or in another brain area, such as subventricular zone and mesolimbocortical system. With respect to this finding, previous analyses by our group demonstrated that prenatal exposure to LPS reduces DA, metabolites levels [4] and

Table 3

Effects of prenatal LPS exposure (100 µg/kg on GD 9.5) on OB protein expressions (normalized optical density/ β -actin ratio) in adult male rats on PND 60 ($n = 6$ –8 for both the groups, data presented as means $\pm$ SEMs).

Protein	Control group	LPS group	<i>p</i>
TH	1.00 $\pm$ 0.12	0.87 $\pm$ 0.13	0.5380
D1	1.00 $\pm$ 0.08	0.99 $\pm$ 0.22	0.9805
D2	1.00 $\pm$ 0.15	0.74 $\pm$ 0.09	0.1106
GFAP	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.14	0.9879
OX-42	1.00 $\pm$ 0.12	1.09 $\pm$ 0.11	0.6162

Student's *t*-test.

TH expression in the striatum (unpublished work). Prenatal LPS also reduces TH expression in the mouse substantia nigra [40]. Moreover, in an animal model of Parkinson's disease, the ablation of dopaminergic inputs caused by the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra resulted in decreased proliferation and loss of TH immunoreactivity in the subventricular zone [41]. Though it is tempting to speculate that these regions are related to the decreased DA levels observed in the OB, we will investigate this regions in our model of prenatal infection in future studies.

Astrocytes and microglia are glial cells that increase in number and become activated following an infection or an immunological challenge, such as an acute administration of LPS [42]. Importantly, astrocytes and glia were not increased in prenatally LPS-treated rats, suggesting that there was no neuroinflammation in the OB of adult rats.

Another explanation for the present findings besides the olfaction impairment is that rats prenatally treated with LPS have impaired motivation. Supporting evidence for this hypothesis comes from the finding that prenatal exposure to LPS impaired the social interest of rats in infancy and adulthood due to motivational impairments [5]. This behavioral change cannot be attributed to motor impairments as the motor activity of these animals is normal [4]. For these reasons, and because maternal and cat olfactory stimuli are linked to a rat's survival and are therefore difficult to ignore, we accept the reduced motivational hypothesis. Furthermore, it is known that in addition to its involvement in motor control, DA is also involved in motivation [43]. The present data showing decreased DA levels is therefore consistent with motivational impairments in rats prenatally exposed to LPS.

5. Conclusions

In conclusion, prenatal LPS exposure impaired maternal preference and aversion to cat olfactory cues and decreased DA levels in the OB. This dopaminergic impairment may involve other brain areas as we found that TH expression was unchanged in the OB. Moreover, the expression of astrocytes and microglia was not altered, suggesting that there was no neuroinflammation in the OB. Furthermore, maternal care was not impaired, indicating that the defects observed in the offspring were not the result of reduced maternal care.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (07/56850-1, 08/53861-5 and thematic grant 09/51886-3), CNPq (grant 301739/2007-2) and Paulista University (grant 7-02-747/2010).

References

- [1] Meyer U, Feldon J, Fatemi SH. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2009;33:1061–79.
- [2] Golan HM, Lev V, Hallak M, Sorokin Y, Huleihel M. Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology* 2005;48:903–17.
- [3] Boksa P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun* 2010;24:881–97.
- [4] Kirsten TB, Taricano M, Florio JC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide reduces motor activity after an immune challenge in adult male offspring. *Behav Brain Res* 2010;211:77–82.
- [5] Kirsten TB, Taricano M, Maiorka PC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. *Neuroimmunomodulation* 2010;17:240–51.
- [6] Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2006;11:47–55.
- [7] Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, Rhodes PG. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr Res* 2000;47:64–72.
- [8] Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci* 2007;27:8.
- [9] Urakubo A, Jarskog LF, Lieberman JA, Gilmore JH. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. *Schizophr Res* 2001;47:27–36.
- [10] Gayle DA, Belosky R, Desai M, Amidi F, Nunez SE, Ross MG. Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:R1024–9.
- [11] Hava G, Vered I, Yael M, Mordechai H, Mahoud H. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. *Dev Psychobiol* 2006;48:162–8.
- [12] Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, et al. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci* 2006;26:4752–62.
- [13] Meyer U, Yee BK, Feldon J. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? *Neuroscientist* 2007;13:241–56.
- [14] Samuelsson AM, Jennische E, Hansson HA, Holmang A. Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R1345–56.
- [15] Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, Patterson PH. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J Neurosci* 2003;23:297–302.
- [16] Borrell J, Vela JM, Arevalo-Martin A, Molina-Holgado E, Guaza C. Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats. Implications for the etiopathogenesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2002;26:204–15.
- [17] Ibi D, Nagai T, Kitahara Y, Mizoguchi H, Koike H, Shiraki A, et al. Neonatal polyI:C treatment in mice results in schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. *Neurosci Res* 2009;64:297–305.
- [18] Slotnick B, Schellinck H, Brown R. Olfaction. In: Whishaw IQ, Kolb B, editors. *The behavior of the laboratory rat: a handbook with tests*. New York: Oxford University Press; 2005. p. 90–104.
- [19] Cave JW, Baker H. Dopamine systems in the forebrain. *Adv Exp Med Biol* 2009;651:15–35.
- [20] Ikemoto S. Involvement of the olfactory tubercle in cocaine reward: intracranial self-administration studies. *J Neurosci* 2003;23:9305–11.
- [21] Ikemoto S, Qin M, Liu ZH. The functional divide for primary reinforcement of D-amphetamine lies between the medial and lateral ventral striatum: is the division of the accumbens core, shell, and olfactory tubercle valid? *J Neurosci* 2005;25:5061–5.
- [22] de Araujo NP, Fukushiro DF, Grassl C, Hipolide DC, Souza-Formigoni ML, Tufik S, Frussa-Filho R. Ethanol-induced behavioral sensitization is associated with dopamine receptor changes in the mouse olfactory tubercle. *Physiol Behav* 2009;96:12–7.
- [23] Ota A, Mori K, Kaneko YS, Nakashima A, Nagatsu I, Nagatsu T. Peripheral lipopolysaccharide administration affects the olfactory dopamine system in mice. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1148:127–35.
- [24] Ward IL, Ward OB, Winn RJ, Bielawski D. Male and female sexual behavior potential of male rats prenatally exposed to the influence of alcohol, stress, or both factors. *Behav Neurosci* 1994;108:1188–95.
- [25] Carlos CP, LEMONICA IP, de Grava Kempinas W, Marques Pereira OC. Does the male reproductive performance depend on the early lactation milk in rats? *Physiol Behav* 1996;59:147–52.
- [26] Darnaudery M, Maccari S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Res Rev* 2008;57:571–85.
- [27] Spencer SJ, Mouihate A, Galic MA, Ellis SL, Pittman QJ. Neonatal immune challenge does not affect body weight regulation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293:R581–9.
- [28] Wang X, Rousset CI, Hagberg H, Mallard C. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2006;11:343–53.

- [29] Bridges RS, Grimm CT. Reversal of morphine disruption of maternal behavior by concurrent treatment with the opiate antagonist naloxone. *Science* 1982;218:166–8.
- [30] Miranda-Paiva CM, Felicio LF. Differential role of cholecystokinin receptor subtypes in opioid modulation of ongoing maternal behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 1999;64:165–9.
- [31] Bernardi MM, Kirsten TB, Matsuoka SM, Teodorov E, Habr SF, Penteadó SH, Palermo-Neto J. Prenatal lipopolysaccharide exposure affects maternal behavior and male offspring sexual behavior in adulthood. *Neuroimmunomodulation* 2009;17:47–55.
- [32] Rainecki C, De Souza MA, Szawka RE, Lutz ML, De Vasconcellos LF, Sanvitto GL, et al. Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. *Neuroscience* 2009;159:31–8.
- [33] Zangrossi Jr H, File SE. Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. *Brain Res Bull* 1992;29:381–8.
- [34] Andrews N, Barnes NM, Steward LJ, West KE, Cunningham J, Wu PY, et al. A comparison of rat brain amino acid and monoamine content in diazepam withdrawal and after exposure to a phobic stimulus. *Br J Pharmacol* 1993;109:171–4.
- [35] Felicio LF, Florio JC, Sider LH, Cruz-Casallas PE, Bridges RS. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. *Brain Res Bull* 1996;40:253–6.
- [36] Chaves GP, Nogueira TC, Britto LR, Bordin S, Torrao AS. Retinal removal up-regulates cannabinoid CB(1) receptors in the chick optic tectum. *J Neurosci Res* 2008;86:1626–34.
- [37] Moraes AP, Schwarz A, Spinosa HS, Florio JC, Bernardi MM. Maternal exposure to diphenhydramine during the fetal period in rats: effects on physical and neurobehavioral development and on neurochemical parameters. *Neurotoxicol Teratol* 2004;26:681–92.
- [38] Davila NG, Blakemore LJ, Trombley PQ. Dopamine modulates synaptic transmission between rat olfactory bulb neurons in culture. *J Neurophysiol* 2003;90:395–404.
- [39] Hsia AY, Vincent JD, Lledo PM. Dopamine depresses synaptic inputs into the olfactory bulb. *J Neurophysiol* 1999;82:1082–5.
- [40] Granholm AC, Zaman V, Smith M, Ramadan R, Godbee J, Umphlet C, Randall P, Bhat NR, Rohrer B, Middaugh LD, Boger HA. Prenatal LPS increases Inflammation in the Substantia Nigra of Gdnf Heterozygous Mice. *Brain Pathol* 2011;21:1750–3639.
- [41] Young SZ, Taylor MM, Bordey A. Neurotransmitters couple brain activity to subventricular zone neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2011;33:1123–32.
- [42] Pang Y, Zheng B, Campbell LR, Fan LW, Cai Z, Rhodes PG. IGF-1 can either protect against or increase LPS-induced damage in the developing rat brain. *Pediatr Res* 2010;67:579–84.
- [43] Ikemoto S. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* 2007;56:27–78.
- [44] Kirsten TB, Oliveira BPS, Ligeiro de Oliveira AP, Kieling K, Tavares de Lima W, Palermo-Neto J, et al. Single early prenatal lipopolysaccharide exposure prevents subsequent airway inflammation response in an experimental model of asthma. *Life Sci* in press.

Sobre o Autismo, Neuroinflamação e Modelos Animais para o Estudo de Autismo: Uma Revisão

Autism, Neuroinflammation and Animal Models for the Study of Autism: A Review

Maria Martha Bernardi¹, Thiago Berti Kirsten², Mácio Oliveira Trindade³

RESUMO

Este artigo busca mostrar a relevância de modelos animais no estudo da síndrome autista por meio de revisão da literatura. Embora eles possam ser discutidos pela sua limitação, a contribuição no entendimento da síndrome e possibilidades de procedimentos que não são possíveis em humanos por razões éticas permite desvendar alguns aspectos dessa desordem. O autismo é um distúrbio psiquiátrico de desenvolvimento que se caracteriza por alterações comportamentais desde a infância, tais como prejuízo na comunicação, na interação social, além de movimentos repetitivos e estereotipados e dificuldades de aprendizado. Esses sintomas podem ser severos ou moderados e/ou parciais, além de nenhuma manifestação ser exclusiva desse transtorno, o que dificulta o diagnóstico. Os achados neuroanatômico-funcionais são inespecíficos, assim como os estudos genéticos. Além da eventual predisposição genética, fatores ambientais, como a neuroinflamação, podem aumentar a incidência do autismo. A corrente de estudos atribuindo distúrbios mentais, inclusive o autismo, a alterações imunes se apóia cada vez mais em inúmeras publicações recentes, envolvendo achados neuroimunes e desenvolvimento de diversos modelos animais. O presente trabalho realizou uma revisão sobre o autismo, discutindo a contribuição dos modelos animais para o estudo desta síndrome, além de discorrer sobre a participação da neuroinflamação como um fator associado à gênese desta patologia.

Unitermos. Autismo, Comportamento Animal, Transtornos do Desenvolvimento Infantil, Modelos Animais.

Citação. Bernardi MM, Kirsten TB, Trindade MO. Sobre o Autismo, Neuroinflamação e Modelos Animais para o Estudo de Autismo: Uma Revisão.

ABSTRACT

This article aims to discuss and review the relevance of animal models to study the autistic syndrome. Whereas the animal models may be discussed by its limitation, the contribution to understand the autistic syndrome and the possible procedures, that are not possible in humans for ethical reasons, contributes to reveal some aspects of this disorder. Autism is a developmental neuropsychiatric disorder characterized by several behavioral changes, such as impaired communication and social interaction, repetitive and stereotyped activity and learning difficulties. These symptoms can be severe or moderate and/or partial, but no event is exclusive to autism disorder, which complicates the diagnosis. The neuroanatomical-functional findings and genetic studies are nonspecific. Besides this possible genetic predisposition, environmental factors, such as neuroinflammation, may induce autism. The current studies attributing the immune alterations to mental disorders, including autism relies increasingly on numerous recent publications involving neuroimmune findings and development of various animal models. This article constitutes a review of autism, discussing the animal models to study this syndrome, and the neuroinflammation contribution in the pathogenesis of autism.

Keywords. Autism, Animal Behavior, Child Development Disorders, Animal Models.

Citation. Bernardi MM, Kirsten TB, Trindade MO. Autism, Neuroinflammation and Animal Models for the Study of Autism: A Review.

Trabalho realizado no Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil.

1. Neurocientista, Doutora, Professor adjunto da Faculdade de Pedagogia do Centro de Ciências e Humanidades, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, SP, Brasil, e pesquisadora do Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil.

2. Biólogo, Mestre, Doutorando do Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada do Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil.

3. Bacharel em Educação, Mestrando do Programa de Educação, Arte e História da Cultura da Universidade Presbiteriana Mackenzie, Professor Assistente do Centro de Ciências e Humanidades da Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo-SP, Brasil.

Endereço para correspondência:

Maria Martha Bernardi
Departamento de Patologia, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade de São Paulo, SP
R. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87
Tel/ Fax.: +55 11 3091 1376 / +55 11 3091 7829,
CEP 05508-000, São Paulo-SP, Brasil.
E-mail: marthabernardi@gmail.com

Revisão

Recebido em: 15/06/10

Aceito em: 22/06/11

Conflito de interesses: não

INTRODUÇÃO

O presente trabalho realizou uma revisão sobre o autismo, discutindo a contribuição dos modelos animais para o estudo desta síndrome, além de discorrer sobre a participação da neuroinflamação como um fator associado a gênese desta patologia.

Os distúrbios do desenvolvimento são um problema de longa data, que afetam famílias e a integração de crianças na sociedade. Nesse sentido, desde o século passado, existe a concepção de que as relações interpessoais seriam os principais determinantes da natureza humana, havendo desde essa época várias reflexões sobre o assunto¹.

O presente trabalho tem como propósito a revisão das principais teorias propostas para explicar as causas da síndrome autista, seu diagnóstico, alterações no sistema nervoso central (SNC) e genéticas, as teorias neuroimunes, bem como os modelos experimentais para o estudo da síndrome, com o objetivo de contribuir para o seu entendimento.

Teorias da síndrome autística

Os Transtornos Invasivos do Desenvolvimento caracterizam-se por prejuízo severo e invasivo em diversas áreas do desenvolvimento: habilidades de interação social recíproca, habilidades de comunicação, ou presença de comportamento, interesses e atividades estereotipados. Os prejuízos qualitativos que definem essas condições representam um desvio acentuado em relação ao nível de desenvolvimento ou idade mental do indivíduo. Estes transtornos incluem o Transtorno Autista, Transtorno de Rett, Transtorno Desintegrativo da Infância, Transtorno de Asperger e Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação (DSM IV)².

O transtorno autista é um distúrbio psiquiátrico de desenvolvimento que se caracteriza por atraso ou total ausência da comunicação verbal (atraso ou ausência de linguagem, linguagem estereotipada ou idiossincrática, incapacidade de iniciar ou sustentar uma conversa). Essas dificuldades podem ser graves, presentes na interação social (ausência de reciprocidade afetiva e pobreza de comportamentos e formas de comunicação não verbais como linguagem gestual, contato visual, expressão facial, etc), padrões de comportamento e interesses restritos (maneirismos, movimentos repetitivos ou estereotipados,

preocupação excessiva com partes ou características não funcionais de objetos ou rotinas, preocupação excessiva e exclusiva por um tema restrito, etc) e ainda pobreza do pensamento abstrato de tipo simbólico e imaginativo. Quase sempre existem importantes dificuldades de aprendizagem e baixo QI. Convém ressaltar que, em algumas crianças autistas, esses sinais e sintomas são severos ou moderados e instáveis, há também aquelas que manifestam apenas alguns deles. Essa ampla variedade de comportamentos expressas nos autistas é o motivo pelo qual tal transtorno é amplamente referido como transtorno do espectro autista (DSM IV – F84.0 – 299.00 e CID 10 F84.0)²⁻⁷.

Devido à diversidade no quadro clínico do autismo, associada ao fato de que nenhum dos aspectos supracitados por si só é exclusivo desse transtorno, seu diagnóstico é eminentemente clínico, sendo composto de várias características, descritas no DSM IV (F84.0 – 299.00)². Nesse sentido, ainda não existem exames complementares que possam validar o diagnóstico clínico⁴.

A detecção da doença pode ocorrer geralmente antes dos três anos de idade, sendo alguns sintomas perceptíveis já aos seis meses de idade⁸, com prevalência de aproximadamente um autista em 150 crianças nascidas⁹. A proporção de autismo entre os sexos masculino e feminino é de 4:1¹⁰, havendo, no entanto, evidências que, em meninas, a síndrome possa se expressar de forma mais severa¹¹.

O termo autismo foi utilizado pela primeira vez por Bleuler em 1911, para denominar pacientes com perda do contato com a realidade, dificultando ou mesmo impossibilitando a sua comunicação¹². A primeira descrição da síndrome foi feita por Leo Kanner, em 1943, por meio de análises clínicas feitas por ele em onze crianças, todas elas apresentando os mesmos sintomas já mencionados¹³.

Algumas teorias tentam explicar as causas do autismo. A teoria psicanalítica apresenta diversas subteorias na tentativa de explicar os fatores causadores e o funcionamento do autismo no aparelho psíquico das crianças. Um dos fatores apontados por ela é que o autismo teria ligação com a depressão materna. Sendo assim, a depressão interferiria com a capacidade materna de envolver-se emocionalmente e cuidar sadiamente da criança, ainda muito pequena, e essa deficiente relação mãe-bebê é que eliciaria o transtorno^{13,14}.

O autismo resultaria da ativação excessiva das primitivas defesas do ego (mediador entre sensações internas e externas) em termos de inibição do desenvolvimento, havendo conflitos constantes e intensos entre o instinto de vida e de morte^{15,16}. Essa situação promoveria altos níveis de ansiedade levando a uma postura esquizoparanóide-*simile*.

Baseada em aspectos evolutivos (teoria evolutiva), o autismo é um subgrupo das psicoses infantis e uma regressão ou uma fixação a uma das fases de desenvolvimento infantil¹⁷. Neste caso, a criança não diferenciaria sensações ou estímulos internos e externos. Assim, a criança não perceberia, de igual maneira, a própria mãe como representante do ambiente externo. A autora supõe que existe um período denominado por ela de “autismo normal” em que pode ou não ocorrer à fixação do distúrbio. Haveria uma predisposição ao autismo desde o nascimento em todas as crianças, e, diante destas condições, a experiência para o bebê de separação materna se tornaria intensamente traumática, levando-o à total desorganização de sensações seguida de depressão. Esse seria o ponto no qual a criança se fixaria¹⁸.

Outra linha teórica denominada afetiva propõe que a criança autista teria inabilidade inata de se relacionar emocionalmente com outras pessoas e, ainda, que ela se originaria de uma disfunção do sistema afetivo¹⁹. Este fato impediria que o autista tivesse capacidade de abstrair e simbolizar. Por esta razão a criança não teria a linguagem bem desenvolvida, relacionamento afetivo, abstração e simbologia, pois não captaria os estímulos corporais verbais e muito menos os não verbais.

Na “teoria da mente”, é proposto que os autistas teriam dificuldades em compreender estados mentais de outros, como por exemplo, desejos, chamados de meta-representações. Assim, a mente de um autista não estaria apta ao convívio social compreensível e compatível com os demais, e tampouco seria organizado de maneira a ordenar percepções internas²⁰. Muitas crianças autistas conseguiriam perceber algumas categorias específicas de reconhecimento, embora não consigam identificar adequadamente os estados mentais mais sutis²¹. Esses autores estudaram o reconhecimento facial por meio da apresentação de quatro figuras (alegria, tristeza, raiva e surpresa) a 30 adultos considerados normais, 51 crianças conside-

radas normais e a 30 crianças diagnosticadas como autistas. Comparados os níveis de acertos entre os três grupos, verificaram-se diferenças significativas entre as respostas das crianças autistas e os demais grupos, com menor reconhecimento facial dos autistas. Os autores atribuem essas diferenças a incapacidade da criança autista de atribuir um significado específico a expressão facial, embora reconheça os elementos que formam determinada expressão. Essa dificuldade da percepção das expressões faciais interferiria diretamente nos relacionamentos sociais.

Nas teorias neuropsicológicas e de processamento da informação haveria uma deficiência cognitiva no autismo²². Crianças autistas mostrariam deficiências cognitivas específicas, tais como: 1) problemas na percepção de ordem e significado, as quais não poderiam ser explicadas por deficiência mental; 2) dificuldades em usar *input* sensorial interno para fazer discriminações na ausência de *feedback* de respostas motoras e 3) tendência a armazenar a informação visual, utilizando um código visual, enquanto as crianças com desenvolvimento normal usavam códigos verbais e/ou auditivos²³.

Diagnóstico do autismo

Um fato importante a se lembrar no autismo é que não se está diante de um único autismo, mas sim de uma gama de formas psicopatológicas, que vai do autismo profundo até a chamada síndrome de Asperger, considerado por alguns autores como um autismo brando²⁴. Assim, o grupo de distúrbios autismo-*simile* é denominado como distúrbio de espectro autista.

Para diagnosticar o autismo, são utilizados critérios descritos no Manual de Diagnóstico e Estatístico da Associação Americana de Psiquiatria (DSM), que evoluiu com o passar dos anos, separando o autismo da esquizofrenia, obtendo nova forma de diagnóstico: autismo ou transtorno autista (DSM IV - F84.0 - 299.00)². No diagnóstico de autismo, existem graus para diferenciação de subgrupos de indivíduos com finalidades práticas e de pesquisa. A principal intenção dos critérios para diagnosticar o autismo e os distúrbios relacionados é reduzir as divergências entre pesquisadores e clínicos em um nível comportamental e biológico. Os critérios para o diagnóstico clínico do autismo também foram estabelecidos pela Classificação Internacional de Doenças (CID 10 F84.0)⁷.

O diagnóstico de autismo requer análise cuidadosa nas avaliações de linguagem e neuropsicológica e exames complementares (como estudos de cromossomos, e neuroimagem). Somente dessa forma, a compreensão da patofisiologia dos distúrbios será possível. As avaliações mais utilizadas para o diagnóstico de autismo são o Sistema Diagnóstico de Observação do Autismo (ADOS) e a Entrevista Diagnóstica de Autismo (ADI), representando, ambas, uma entrevista estruturada bastante completa e um método de observação para avaliar objetivamente as habilidades sociais, de comunicação e de comportamento de indivíduos em todos os graus do autismo. Mais ainda, estão disponíveis instrumentos validados para população brasileira como a CARS (*Childhood Autism Rating Scale*, ou Escala de avaliação para autismo infantil) e ABC (*Autism Behavior Checklist* ou Lista de checagem de comportamento autístico), que auxiliam na identificação de características autísticas, sendo instrumentos multidisciplinares^{25,26}.

Possíveis alterações no sistema nervoso dos autistas

Extensas investigações revelaram o envolvimento de várias regiões cerebrais na gênese do autismo, incluindo o sistema límbico, amígdala, áreas pré-frontais e cerebelo³. As aberrações poderiam ser induzidas em múltiplos períodos pré-natais, especialmente nas regiões cerebrais que se desenvolvem tardiamente na neurogênese. Além disso, nesse caso, regiões cerebrais envolvidas com o autismo tendem a se desenvolver mais lentamente e são mais vulneráveis a distúrbios²⁷.

A respeito desses distúrbios, estudos de autópsia em pacientes diagnosticados com autismo mostraram atrofia do córtex do neo-cerebelo, com perda acentuada de células de Purkinje²⁸. Métodos de neuroimagem também demonstram alteração estrutural do cerebelo^{29,30}. Estudos funcionais mostraram ainda alteração dos padrões de ativação do cerebelo desses pacientes, com hipoativação em tarefas de atenção não motora³¹.

Os estudos de neuroimagem sugerem ainda um padrão anormal de desenvolvimento cerebral em autistas, com um crescimento acelerado durante os primeiros anos de vida, seguido por uma desaceleração em algumas regiões do cérebro, enquanto em outras áreas há uma parada do crescimento³².

O tamanho da cabeça de autistas tende a ser semelhante ao de crianças típicas ao nascer, no entanto, entre dois e quatro anos de idade, 90% dos autistas têm volume cerebral maior do que a média para crianças da mesma idade, e 37% apresentam macrocefalia³².

Foram noticiadas alterações neuroanatômico-funcionais em crianças autistas, detectadas por meio da ressonância nuclear magnética e da tomografia computadorizada por emissão de fóton único⁴. As alterações anatómicas estavam preferencialmente localizadas no corpo caloso, além do septo pelúcido, dos ventrículos cerebrais, do cerebelo, lobo temporal, lobo occipital e hipocampo. As alterações funcionais predominaram no lobo frontal, lobo temporal, lobo parietal e nos núcleos da base.

Outro dado interessante é que pacientes autistas podem apresentar distúrbios na substância branca e desconexão entre regiões cerebrais³³.

Com relação aos níveis de neurotransmissores nestes pacientes, embora com dados algumas vezes bastante contraditórios, a alteração neuroquímica mais prevalente seria da elevação nos níveis de serotonina nas plaquetas. Além disso, observa-se eventual aumento na captação de serotonina e diminuição da ligação a receptores 5-HT₂₅₅³².

Outros estudos apontam para alterações dopaminérgicas associadas ao autismo, ligadas a processos emocionais³⁴. Por exemplo, benefícios clínicos obtidos graças a um agonista do receptor dopaminérgico D₂ suportam o conceito de desregulação do sistema dopaminérgico central nesses pacientes.

Além da serotonina e dopamina, alguns trabalhos tentam associar o autismo com a adrenalina, noradrenalina, ocitocina, vasopressina, glutamato e ácido gama-aminobutírico²⁷.

Pode-se concluir que, da mesma forma que o autismo se manifesta com diferentes graus de intensidade e manifestações comportamentais, diversos quadros neurológicos são relacionados ao autismo, incluindo interessantes achados neuroanatômico-funcionais, porém, com natureza inespecífica e variada. Dessa forma, até agora, nenhuma resposta definitiva foi encontrada quanto ao autismo e alterações no SNC.

Possíveis alterações genéticas nos autistas

A probabilidade de recorrência de autismo em

uma família que já possui uma criança autista é considerada elevada (de 3 a 8%). Em gêmeos monozigóticos, em até 92% dos casos é diagnosticado algum espectro de autismo nas duas crianças³². Nos gêmeos dizigóticos o diagnóstico ocorre em até 24% dos casos²⁷.

Estudos indicam que cerca de 20 genes podem estar envolvidos no autismo^{35,36}. Por exemplo, análises de ligação estudando todo o genoma encontraram sinais positivos de correlação nos cromossomos 2, 7, 1 e 17, particularmente em 2q e 7q. Genes como FOXP2, RELN e HOXA1 parecem estar associados, embora com achados ainda inconsistentes³². Outro estudo revela uma relação entre autismo e a transmissão preferencial de alelos de marcadores genéticos de dois genes transportadores de serotonina³⁷. Porém, esses achados não foram replicados em um estudo posterior³².

A síndrome autística é clinicamente heterogênea e pode ser associada em mais de 10 % dos casos com outras desordens neurológicas e genéticas, como a esclerose tuberosa, X frágil, síndromes de Rett e Down³⁸⁻⁴⁰.

Embora múltiplos cromossomos e genes tenham sido implicados com o autismo, não se chegou a nenhuma conclusão definitiva, uma vez que muitos desses achados são contraditórios, provavelmente graças à grande heterogeneidade das manifestações autistas.

A neuroinflamação na patogênese do autismo

Diversas linhas de pesquisa demonstram que tanto fatores genéticos como ambientais influenciariam o desenvolvimento de anormalidades na circuitaria neural que desencadeia o autismo. Recentemente, muitos trabalhos focam nas conexões entre o sistema imune e sistema nervoso. Existem achados de anormalidades imunes periféricas e, mais recentemente, ativação de neuroglia, do sistema imune no cérebro e no fluído cerebroespinal de pacientes com autismo³³.

Todos os tipos celulares neurais e não neurais que fazem parte do SNC em desenvolvimento, como micróglia e células endoteliais, usam citocinas para sinalizações parácrinas e autócrinas, e, pelo fato de muitas dessas mesmas citocinas também servirem como moduladores imunes, processos de desenvolvimento normais mediados por citocinas podem ser susceptíveis a distúrbios por desregulação imune, como por exemplo, a partir de infecções maternas⁴¹.

A alta prevalência de autistas (1 para cada 150 pessoas) pode ter contribuições de fatores ambientais. Algumas variações genéticas conferem vulnerabilidade a estressores ambientais. Essa influência ambiental inclui alterações patofisiológicas do SNC, incluindo estresse oxidativo, neuroinflamação, disfunção mitocondrial (por exemplo, poluição do ar, metais pesados) e distúrbios bioquímicos. Fatores da dieta e contaminantes alimentares também podem contribuir para este risco. A influência ambiental na fisiologia poderia se iniciar *in utero*, e, em consequência, contribuir para alterações no cérebro e em outros sistemas corporais em desenvolvimento, havendo a possibilidade de envolver mudanças epigenéticas⁴². Assim injúrias pré- ou perinatais, toxicidade ao mercúrio, ou infecções virais persistentes seriam interferências ambientais que aumentariam o risco de autismo com relação aos fatores genéticos por si só^{43,44}.

Foram relatados alguns casos de evidências patológicas de reações imunológicas, especialmente da resposta imune inata no SNC, como infiltração linfocitária e nódulos microgliais^{45,46}. Crianças autistas podem apresentar anormalidades tanto nas funções imunes humoral como celular, como por exemplo, diminuição da produção de imunoglobulinas ou disfunção de células B, T e NK⁴⁷.

Além disso, o deslocamento do subconjunto de linfócitos T *helper* 1 para 2 e a associação com antígeno de leucócito humano sugerem a possibilidade de auto-imunidade contra antígenos cerebrais, contribuindo para a neuropatologia do autismo⁴⁸. Diminuição de subconjuntos de imunoglobulinas e complemento e ações de anticorpos maternos também são propostos como fatores patogênicos⁴⁹.

É importante ressaltar que esses achados imunes não se repetem em muitos dos pacientes, inclusive quando se altera a idade do paciente e o momento da coleta. Desse modo não está claro se as alterações refletiriam uma disfunção imune ou poderiam representar uma regressão que variam com a idade⁵⁰.

Anticorpos agindo diretamente contra estruturas do SNC como no córtex frontal e células endoteliais cerebrais é um fenômeno descrito em pacientes autistas. A relação do autismo com a auto-imunidade é sugerida pela maior prevalência de desordens auto-imunes, como artrite reumatóide e lúpus em famílias com membros autistas³³.

Outro fator imune proposto como causa de autismo foi a vacinação das crianças contra o sarampo, caxumba e rubéola. Porém, esta corrente parece cada vez mais perder força, uma vez que não existem fatos comprovados. Além disso, o autismo vem sendo associado à intercorrências durante o desenvolvimento do feto, com alterações no crescimento e desenvolvimento neuronal e não na infância (período da vacinação infantil)⁵¹. Eventos imune-mediados como as infecções maternas durante a gestação são importantes como potenciais indutores de alterações em longo prazo na estrutura e função do cérebro em desenvolvimento.

Dessa forma, infecções virais pré-natais, incluindo rubéola e citomagalovírus, poderiam danificar o sistema imune imaturo, com produção elevada de citocinas pró-inflamatórias⁵²⁻⁵⁹. O mecanismo pelo qual a infecção viral desencadearia o autismo ainda é incerto, mas é proposto que seria pela (1) infecção direta no SNC, (2) por meio de infecção em outro local do corpo, agindo como gatilho para doença no SNC, (3) por meio de alterações da resposta imune da mãe ou prole, (4) ou pela combinação desses fatores⁵. Isso deve ocorrer, pois o SNC não está totalmente desenvolvido ao nascimento⁶⁰ e é mais suscetível a danos virais⁶¹.

É importante ressaltar que grávidas são consideradas de certo modo como imunossuprimidas, e, portanto, mais suscetíveis a infecções^{62,63}. Além disso, as citocinas poderiam ser diretamente produzidas no cérebro fetal, ou acessar o SNC atravessando a barreira hematoencefálica imatura. Essas citocinas podem alterar o desenvolvimento do cérebro⁶⁴.

Um grupo de pacientes autistas mostrou aumento dos níveis de fator de necrose tumoral α no soro e líquido cerebrospinal, reforçando a associação entre as citocinas e o autismo⁶⁵. Além disso, são encontrados mais monócitos circulantes nesses pacientes⁶⁶. Em outro estudo, níveis elevados de citocinas antiinflamatórias e próinflamatórias foram encontrados em alguns pacientes autistas em algumas regiões cerebrais. Especialmente, as citocinas próinflamatórias resultariam em ativação microglial e neuroinflamação, associadas ao autismo. Já a elevação das citocinas antiinflamatórias teria papel de reparo do tecido injuriado³³.

Em outro estudo, foi constatado que citocinas

apresentam-se altamente elevadas em diversas regiões cerebrais e no líquido cefalorraquidiano de autistas entre 4 e 45 anos de idade⁴¹. Porém, segundo esses mesmos autores, ainda é preciso determinar se um desequilíbrio de uma citocina embrionária desencadeia tais desregulações imunes no cérebro adulto, como esse estado imune alterado é estabelecido, e se intervenções no intuito de frear essa resposta imune seria terapeuticamente benéfica.

Existem evidências da ativação neuroglial na neuropatologia do autismo. Cérebros *post-mortem* de pacientes autistas apresentam processos neuroinflamatórios ativos no córtex cerebral, substância branca e cerebelo, incluindo achados nas técnicas imuno-histoquímicas e *Western blot*⁶⁷. É possível que a ativação microglial presente no cérebro de autistas possa refletir no desenvolvimento anormal das vias fetais em resposta a fatores genéticos ou ambientais, como insultos intra-uterinos³³.

Pacientes autistas podem também apresentar maior atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, uma vez que foi encontrada maior concentração de cortisol na saliva de crianças autistas⁶⁸ e níveis elevados de hormônio adrenocorticotrópico nos adultos com Asperger⁶⁹.

Encarar processos infecciosos pré-natais como indutores do autismo é importante, pois pode ajudar a entender o motivo da alta prevalência do tal distúrbio, já que qualquer indivíduo está constantemente exposto a infecções ao longo da vida, especialmente as gestantes, que são consideradas imunossuprimidas^{62,63}. Reforça ainda a importância do acompanhamento e pronto tratamento de gestantes, caso sejam infectadas. Por fim, esses estudos ajudariam a entender o mecanismo de ação do distúrbio, de modo a aprimorar tratamento a um indivíduo autista, ou, quem sabe, um dia chegar à “cura”. No entanto, vale ressaltar que a causa do autismo, até agora é desconhecida e há vários indícios de ser multigênica e multifatorial.

Modelos experimentais de autismo

Diversos estudos utilizam modelos animais para melhor entender as causas e consequências do autismo. Esses estudos levam em conta os achados comportamentais, neurais, imunes e genéticos encontrados nos autistas (humanos).

Os modelos animais de infecções pré-natais propõem mimetizar tanto infecções bacterianas quanto virais

durante a gestação, principalmente com a administração de lipopolissacarídeo (LPS), vírus influenza e ácido poliinosínico-policitidílico (PolyI:C), injetadas pelas vias intraperitoneal, intravenosa, subcutânea e intranasal em roedores. O número de administrações durante a gestação, o período da gestação e a dose desses agentes infecciosos devem sempre ser levados em conta, pois podem resultar em alterações bastante heterogêneas entre os animais⁷⁰.

Modelos animais de autismo utilizando infecções pré-natais apontam para a importância da ativação imune materna no cérebro fetal em desenvolvimento⁷¹. A ativação imune materna no meio da gestação de camundongos com PolyI:C (um análogo sintético de RNA viral) ou interleucina-10 resulta em prole com comportamentos, histologia e expressão gênica anormal, de modo similar ao de pacientes autistas ou esquizofrênicos^{72,73}. Esses animais apresentam prejuízo sensorio-motor, déficits no teste de inibição pré-pulso e na inibição latente, bem como na redução do número de receptores D1 (dopamina) pré-frontal quando adultos.

No comportamento animal, hiperatividade, reatividade aumentada e estereotipada são comumente consideradas como sinais de autismo, apesar da falta de especificidade e sinais similares a esquizofrenia^{73, 74}. Entre os trabalhos relacionados a comportamentos repetitivos, estereotipados, restrição de interesse e resistência a mudanças, pode-se destacar um estudo que investigou a tarefa exploratória na prancha com furos (*hole-board*) em camundongos em meio a pistas olfativas⁷⁵. Neste caso, camundongos com expressão reduzida do Grin1, que leva a hipofunção do receptor NMDA, apresentaram comportamentos repetitivos, sofrendo menor interferência de pistas olfativas, comparados a animais selvagens. Esses achados apontam para resistência a mudanças e interesses restritos.

Além dessa estereotipia, o autismo também é caracterizado pela alteração nas habilidades de comunicação social, sendo que limitações nessa área só podem ser superadas pelo aumento da sofisticação da análise comportamental em situações sociais.

Nesse sentido, a observação do comportamento de brincar em roedores tem se mostrado importante ferramenta comportamental para o estudo do autismo. Comportamentos autistas foram observados experimentalmente em um modelo com ratos por meio da indução

de doença do vírus Borna neonatal⁷⁶. Nesse experimento, os animais apresentaram diminuição do comportamento de brincar, relacionados a achados de lesões cerebelares. É importante lembrar que roedores nascem mais imaturos que seres humanos, por isso da escolha do tratamento no período neonatal.

Hornig et al.⁷⁷ também fizeram paralelo do autismo com ratos inoculados intracerebralmente com vírus Borna, pouco depois do nascimento. Esses ratos apresentaram comportamentos estereotipados, atividade exploratória desregulada, atraso de crescimento, reflexos de endireitamento aberrantes, respostas motoras assimétricas, apoptose neural predominantemente no hipocampo e cerebelo, e elevação de transcrição de mRNA de interleucina-1 α , -1 β e -6 e de fator de necrose tumoral em distintas regiões de ratos infectados. Além disso, sabe-se que a resposta imune materna a uma infecção pode influenciar o desenvolvimento do feto via aumento nos níveis de citocinas circulantes^{59, 71}.

Apesar dos estudos com sangue de crianças autistas não apontarem para evidências de infecção por vírus Borna, esses modelos animais revelam evidências que infecções virais e da consequente resposta imune podem desregular o desenvolvimento neural e promover anormalidades comportamentais, com similaridades ao autismo⁵.

Modelos animais envolvendo a administração via respiratória do vírus influenza em camundongos no meio da gestação também apresentam algumas anormalidades neuropatológicas e comportamentais similares na prole consistentes com o autismo, como deficiência na inibição pré-pulso, na resposta a alarme sonoro e na interação social⁷⁸. Vale lembrar, que o vírus influenza acomete mais humanos nas estações frias, especialmente no inverno, e, são justamente nesses períodos frios que são registrados as maiores incidências de crianças nascidas com certas desordens neuropsiquiátricas como a esquizofrenia⁷³. Este fato reforça mais uma vez a relação da infecção materna durante a gestação e o autismo.

Além de infecções virais pré-natais, infecções pré-natais bacterianas, que igualmente podem interferir no ambiente intra-uterino, inclusive com a produção de citocinas pró-inflamatórias, tem se mostrado como possíveis indutoras do autismo. O tratamento com LPS, um componente da parede celular de bactérias gram-negativas,

que mimetiza a infecção bacteriana, no meio da gestação de ratas, leva a redução do comportamento de brincar nos filhotes e da interação social quando adultos⁷⁹.

Assim como estudos científicos em humanos geralmente buscam avaliar a percepção do autista por pistas visuais, nos roedores, pode-se focar no sistema olfatório, que é o principal sistema sensorial deles, com funções de reconhecimento ambiental. Em um estudo conduzido em nosso laboratório, o reconhecimento materno por meio de pistas olfatórias foi empregado para investigar os primeiros sinais de relacionamento social filhote-mãe. Filhotes de ratos tratados ou não pré-natalmente com LPS no meio da gestação, foram avaliados quanto ao reconhecimento da maravalha materna por meio da olfação. Os roedores normalmente se encaminham para a maravalha com odor materno, mas a prole tratada com a endotoxina não se encaminhou para a maravalha materna⁸⁰.

Finalmente, modelos experimentais utilizando medicamentos são propostos como modelos animais de autismo. Assim, a administração do ácido valpróico no meio da gestação de ratos, antes do fechamento do tubo neural resulta em anormalidades similares ao autismo⁸¹. Esses animais apresentam menor número de células de Purkinje no *vermis* cerebelar e redução dos hemisférios. Tal exposição poderia ser resultado da administração de medicação anticonvulsivante em mães gestantes.

Com os diversos achados de diferentes modelos animais em diferentes laboratórios, pode-se claramente demonstrar que a ativação imune pré-natal pode causar alterações nas funções do SNC da prole. Ainda se faz necessário aprofundar a caracterização dos fatores ambientais responsáveis por essas alterações cerebrais, bem como investir em estudos com primatas, já que essas desordens neurocomportamentais como o autismo têm forte componentes genéticos. Dessa forma, a extrapolação para humanos será cada vez mais precisa⁷⁰.

O mecanismo de ação exato de como a ativação imune pré-natal resultaria em alterações em longo prazo no SNC relacionadas ao autismo ainda é impreciso, porém diversas evidências de mediadores imunes como citocinas circulantes, elevação dos níveis de citocinas na placenta, e estresse oxidativo no cérebro fetal ajudam a entender tal fenômeno⁷⁰.

CONCLUSÃO

O autismo é um distúrbio psiquiátrico de desenvolvimento importante, ocupando o terceiro lugar entre os distúrbios do desenvolvimento, na frente das malformações congênitas e da síndrome de Down³². Apesar de décadas de pesquisa, muito pouco se sabe sobre a etiologia e/ou patofisiologia do autismo. Esta parece ser resultado de uma complexa combinação de fatores ambientais, neurológicos, imunológicos e genéticos. Seu diagnóstico é difícil principalmente pela ausência de sintomas exclusivos do distúrbio e pela diferença na manifestação, quanto à severidade e variedade de sinais. O diagnóstico é eminentemente clínico, sendo que os diferentes achados neuroanatômico-funcionais e genéticos pouco contribuem para esse diagnóstico.

Os modelos animais já demonstraram claramente que a ativação imune pré-natal pode causar alterações na função do SNC da prole, utilizando para tanto modelos principalmente em roedores. Isto sugere que a associação entre a infecção pré-natal e doenças do SNC em humanos pode, de fato, refletir uma relação causal. Assim é necessária a caracterização criteriosa do grau de modificação do SNC devido à ativação imunológica pré-natal em modelos animais. Experimentos para verificar o mecanismo responsável por essas mudanças incluindo investigações sobre os mediadores da ativação aguda do sistema imune, bem como dos responsáveis pelas alterações em longo prazo do SNC são imprescindíveis. Além disto, pode-se pensar em estender para outras espécies mais próximas do homem a investigação das consequências da inflamação materna pré-natal na sua prole. Para tanto, modelos animais que levam em consideração essa hipótese deverão ser cada vez mais sofisticados e podem se revelar uma eficiente ferramenta para ajudar a entender o autismo e ter importantes implicações clínicas e terapêuticas.

REFERÊNCIAS

1. Camargo SPH, Bosa CA. Competência social, inclusão escolar e autismo. *Psicol Soc* 2009;21:65-74.
2. Manual de diagnóstico e estatística de transtornos mentais (DSM IV) [endereço na Internet]. Porto Alegre: Artes Médicas. (atualizado em: agosto/2011; citado em: agosto/2011). Disponível em: <http://virtualpsy.locaweb.com.br/dsm.php>.

3. Bugalho P, Correa B, Viana-Baptista M. Role of the cerebellum in cognitive and behavioural control: scientific basis and investigation models. *Acta Med Port* 2006;19:257-67.
4. Machado MG, Oliveira HA, Cipolotti R, Santos CA, de Oliveira EF, Donald RM, et al. Anatomical and functional abnormalities of central nervous system in autistic disorder: a MRI and SPECT study. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61:957-61.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2003000600013>
5. Libbey JE, Sweeten TL, McMahon WM, Fujinami RS. Autistic disorder and viral infections. *J Neurovirol* 2005;11:1-10.
<http://dx.doi.org/10.1080/13550280590900553>
6. Klin A, Mercadante MT. [Autism and the pervasive developmental disorders]. *Rev Bras Psiquiatr* 2006;28(Suppl 1):S1-2.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-44462006000500001>
<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-44462006000500002>
7. Classificação dos transtornos mentais e do comportamento da CID-10 [endereço na Internet]. Porto Alegre: Artes Médicas. (atualizado em agosto/2011; citado em: agosto/2011). Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/cid10/v2008/cid10.htm>.
8. Fombonne E. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *J Clin Psychiatry* 2005;66 (Suppl 10):3-8.
9. Fombonne E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr Res* 2009;65:591-8.
<http://dx.doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819e7203>
10. Theoharides TC, Kempuraj D, Redwood L. Autism: an emerging 'neuroimmune disorder' in search of therapy. *Expert Opin Pharmacother* 2009;10:2127-43.
<http://dx.doi.org/10.1517/14656560903107789>
11. Wing L. Wing autistic disorder interview checklist (WADIC). In: Rapin I, editor. *Preschool children with inadequate communication Developmental language disorder, autism, low IQ*. London: Mac Keith Press, 1996, p.247-51.
12. Ajuriahuerra J. *Las Psicosis Infantiles. Manual de Psiquiatria Infantil*. Barcelona: Toray-Masson; 1977, p.673-731.
13. Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *The nervous child* 1943;2:217-50.
14. Eisenberg L, Kanner L. Childhood schizophrenia; symposium, 1955. VI. Early infantile autism, 1943-55. *Am J Orthopsychiatry* 1956;26:556-66.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-0025.1956.tb06202.x>
15. Klein M. On early infantile psychosis: the symbiotic and autistic syndromes. *J Am Acad Child Psychiatry* 1965;4:554-68.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0002-7138\(09\)62158-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-7138(09)62158-0)
16. Klein M. Os progressos da psicanálise (Original publicado em 1932). Rio de Janeiro: Zahar, 1989, p.79-135.
17. Mahler MD. On human symbiosis and the vicissitudes of individuation: Infantile psychosis. New York: International Universities; 1968, 271p.
18. Tustin F. *Autistic states in children*. London: Routledge and Kegan Paul; 1981, 272p.
19. Hobson P. *Autism and the development of mind*. Lawrence Erlbaum; 1993, 246p.
20. Baron-Cohen S. Theory of mind and autism: A fifteen year review. In: Baron-Cohen S, Tager-Flusberg H, Cohen DJ, editors. *Understanding other minds: Perspectives from developmental cognitive neuroscience*. London: Oxford University Press, 2000, p.3-20.
21. Assumpção JFB, Kuczynski E, Sprovieri MH, Farinha V. Reconhecimento facial e autismo. *Arq Neuropsiquiatr* 1999;57:944-9.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X1999000600008>
22. Hermelin B, O'Connor N. *Psychological experiments with autistic children*. New York: New York, 1970, 142p.
23. Bosa C, Callias M. Autismo: breve revisão de diferentes abordagens. *Psicol Reflex Crit* 2000;13:167-77.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-79722000000100017>
24. O'Hare A. Autism spectrum disorder: diagnosis and management. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2009;94:161-8.
<http://dx.doi.org/10.1136/adc.2008.150490>
25. Schopler E, Reichler RJ, DeVellis RF, Daly K. Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *J Autism Dev Disord* 1980;10:91-103.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02408436>
26. Krug DA, Arick J, Almond P. Behavior checklist for identifying severely handicapped individuals with high levels of autistic behavior. *J Child Psychol Psychiatry* 1980;21:221-9.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7610.1980.tb01797.x>
27. Ashwood P, Wills S, Van de Water J. The immune response in autism: a new frontier for autism research. *J Leukoc Biol* 2006;80:1-15.
<http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1205707>
28. Bauman M, Kemper TL. Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. *Neurology* 1985;35:866-74.
29. Courchesne E, Yeung-Courchesne R, Press GA, Hesselink JR, Jernigan TL. Hypoplasia of cerebellar vermal lobules VI and VII in autism. *N Engl J Med* 1988;318:1349-54.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198805263182102>
30. Murakami JW, Courchesne E, Press GA, Yeung-Courchesne R, Hesselink JR. Reduced cerebellar hemisphere size and its relationship to vermal hypoplasia in autism. *Arch Neurol* 1989;46:689-94.
31. Allen G, Courchesne E. Differential effects of developmental cerebellar abnormality on cognitive and motor functions in the cerebellum: an fMRI study of autism. *Am J Psychiatry* 2003;160:262-73.
<http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.160.2.262>
32. Gadia CA, Tuchman R, Rotta NT. Autism and pervasive developmental disorders. *J Pediatr (Rio J)* 2004;80:583-94.
<http://dx.doi.org/10.2223/JPED.1172>
<http://dx.doi.org/10.2223/1172>
33. Pardo CA, Vargas DL, Zimmerman AW. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. *Int Rev Psychiatry* 2005;17:485-95.
<http://dx.doi.org/10.1080/02646830500381930>
34. Salgado-Pineda P, Delaveau P, Blin O, Nieoullon A. Dopaminergic contribution to the regulation of emotional perception. *Clin Neuropharmacol* 2005;28:228-37.
<http://dx.doi.org/10.1097/01.wnf.0000185824.57690.f0>
35. Cook EH, Jr. Genetics of autism. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 2001;10:333-50.
36. Risch N, Spiker D, Lotspeich L, Nouri N, Hinds D, Hallmayer J, et al. A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology. *Am J Hum Genet* 1999;65:493-507.
<http://dx.doi.org/10.1086/302497>
37. Cook EH, Jr., Courchesne R, Lord C, Cox NJ, Yan S, Lincoln A, et al. Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. *Mol Psychiatry* 1997;2:247-50.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4000266>
38. Rapin I, Katzman R. Neurobiology of autism. *Ann Neurol* 1998;43:7-14.
<http://dx.doi.org/10.1002/ana.410430106>
39. Newschaffer CJ, Fallin D, Lee NL. Heritable and nonheritable risk factors for autism spectrum disorders. *Epidemiol Rev* 2002;24:137-53.
<http://dx.doi.org/10.1093/epirev/mxf010>
40. Cohen D, Pichard N, Tordjman S, Baumann C, Burglen L, Excoffier E, et al. Specific genetic disorders and autism: clinical contribution towards their

- identification. *J Autism Dev Disord* 2005;35:103-16.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10803-004-1038-2>
41. Deverman BE, Patterson PH. Cytokines and CNS development. *Neuron* 2009;64:61-78.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.002>
42. Herbert MR. Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol* 2010;23:103-10.
<http://dx.doi.org/10.1097/WCO.0b013e328336a01f>
43. Wing L, Potter D. The epidemiology of autistic spectrum disorders: is the prevalence rising? *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002;8:151-61.
<http://dx.doi.org/10.1002/mrdd.10029>
44. Larsson HJ, Eaton WW, Madsen KM, Vestergaard M, Olesen AV, Agerbo E, et al. Risk factors for autism: perinatal factors, parental psychiatric history, and socioeconomic status. *Am J Epidemiol* 2005;161:916-28.
<http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwi123>
45. Bailey A, Luthert P, Dean A, Harding B, Janota I, Montgomery M, et al. A clinicopathological study of autism. *Brain* 1998;121(Pt 5):889-905.
<http://dx.doi.org/10.1093/brain/121.5.889>
46. Guerin P, Lyon G, Barthelemy C, Sostak E, Chevrollier V, Garreau B, et al. Neuropathological study of a case of autistic syndrome with severe mental retardation. *Dev Med Child Neurol* 1996;38:203-11.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8749.1996.tb15082.x>
47. Warren RP, Margaretten NC, Pace NC, Foster A. Immune abnormalities in patients with autism. *J Autism Dev Disord* 1986;16:189-97.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF01531729>
48. van Gent T, Heijnen CJ, Treffers PD. Autism and the immune system. *J Child Psychol Psychiatry* 1997;38:337-49.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7610.1997.tb01518.x>
49. Dalton P, Deacon R, Blamire A, Pike M, McKinlay I, Stein J, et al. Maternal neuronal antibodies associated with autism and a language disorder. *Ann Neurol* 2003;53:533-7.
<http://dx.doi.org/10.1002/ana.10557>
50. Zimmerman AW. The immune system. In: Bauman M, Kemper TL, editors. *The neurobiology of autism*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 2005. p.371-86.
51. Dantzer R, Kelley KW. Autistic children: a neuroimmune perspective. *Brain Behav Immun* 2008;22:804-5.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2008.03.001>
52. Stubbs EG, Crawford ML. Depressed lymphocyte responsiveness in autistic children. *J Autism Child Schizophr* 1977;7:49-55.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF01531114>
53. Gupta S, Aggarwal S, Roshanravan B, Lee T. Th1- and Th2-like cytokines in CD4+ and CD8+ T cells in autism. *J Neuroimmunol* 1998;85:106-9.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)00021-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00021-6)
54. Singh VK, Warren R, Averett R, Ghaziuddin M. Circulating autoantibodies to neuronal and glial filament proteins in autism. *Pediatr Neurol* 1997;17:88-90.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0887-8994\(97\)00045-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0887-8994(97)00045-3)
55. Singh VK, Lin SX, Newell E, Nelson C. Abnormal measles-mumps-rubella antibodies and CNS autoimmunity in children with autism. *J Biomed Sci* 2002;9(4):359-64.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02256592>
56. Vojdani A, Campbell AW, Anyanwu E, Kashanian A, Bock K, Vojdani E. Antibodies to neuron-specific antigens in children with autism: possible cross-reaction with encephalitogenic proteins from milk, Chlamydia pneumoniae and Streptococcus group A. *J Neuroimmunol* 2002;129(1-2):168-77.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00180-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00180-7)
57. Jyonouchi H, Sun S, Le H. Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. *J Neuroimmunol* 2001;120(1-2):170-9.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5728\(01\)00421-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5728(01)00421-0)
58. Chess S, Fernandez P, Korn S. Behavioral consequences of congenital rubella. *J Pediatr* 1978;93:699-703.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476\(78\)80921-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476(78)80921-4)
59. Yamashita Y, Fujimoto C, Nakajima E, Isagai T, Matsuishi T. Possible association between congenital cytomegalovirus infection and autistic disorder. *J Autism Dev Disord* 2003;33:455-9.
<http://dx.doi.org/10.1023/A:1025023131029>
60. Rosenberger PB. Editorial: Infectious disease and the immature brain. *N Engl J Med* 1975;293:39-40.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJM197507032930110>
61. Sells CJ, Carpenter RL, Ray CG. Sequelae of central-nervous-system enterovirus infections. *N Engl J Med* 1975;293:1-4.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJM197507032930101>
62. Weinberg ED. Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. *Reviews of Infectious Diseases* 1984;6:814-31.
<http://dx.doi.org/10.1093/clinids/6.6.814>
63. Sargent IL. Maternal and fetal immune responses during pregnancy. *Exp Clin Immunogenet* 1993;10:85-102.
64. Munoz-Fernandez MA, Fresno M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Progress in Neurobiology* 1998;56:307-40.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00045-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00045-8)
65. Chez MG, Dowling T, Patel PB, Khanna P, Kominsky M. Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. *Pediatr Neurol* 2007;36:361-5.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2007.01.012>
66. Sweeten TL, Posey DJ, McDougall CJ. High blood monocyte counts and neopterin levels in children with autistic disorder. *Am J Psychiatry* 2003;160:1691-3.
<http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.160.9.1691>
67. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 2005;57:67-81.
<http://dx.doi.org/10.1002/ana.20315>
68. Jansen LM, Gispens-de Wied CC, van der Gaag RJ, van Engeland H. Differentiation between autism and multiple complex developmental disorder in response to psychosocial stress. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:582-90.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1300046>
69. Tani P, Lindberg N, Matto V, Appelberg B, Nieminen-von Wendt T, von Wendt L, et al. Higher plasma ACTH levels in adults with Asperger syndrome. *J Psychosom Res* 2005;58:533-6.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychores.2004.12.004>
70. Boksa P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. *Brain Behav Immun* 2010;[in press].
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2010.03.005>
71. Patterson PH. Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. *Curr Opin Neurobiol* 2002;12:115-8.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388\(02\)00299-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00299-4)
72. Meyer U, Yee BK, Feldon J. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? *Neuroscientist* 2007;13:241-56.
<http://dx.doi.org/10.1177/1073858406296401>

73. Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci* 2007;27:10695-702.
<http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007>
74. Fortier ME, Luheshi GN, Boksa P. Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. *Behav Brain Res* 2007;181:270-7.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2007.04.016>
75. Moy SS, Nadler JJ, Poe MD, Nonneman RJ, Young NB, Koller BH, et al. Development of a mouse test for repetitive, restricted behaviors: relevance to autism. *Behav Brain Res* 2008;188:178-94.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2007.10.029>
76. Pletnikov MV, Rubin SA, Vasudevan K, Moran TH, Carbone KM. Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behav Brain Res* 1999;100(1-2):43-50.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328\(98\)00111-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328(98)00111-9)
77. Hornig M, Weissenböck H, Horscroft N, Lipkin WI. An infection-based model of neurodevelopmental damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12102-7.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.21.12102>
78. Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, Patterson PH. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J Neurosci* 2003;23:297-302.
79. Kirsten TB, Taricano M, Maiorka PC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. *Neuroimmunomodulation* 2010;17:240-51.
<http://dx.doi.org/10.1159/000290040>
80. Taricano M. Efeitos da administração pré-natal de LPS no aprendizado e/ou memória na prole de ratas (dissertação). São Paulo: Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo; 2010, 104p.
81. Ingram JL, Peckham SM, Tisdale B, Rodier PM. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol Teratol* 2000;22:319-24.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0892-0362\(99\)00083-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0892-0362(99)00083-5)

Hypoactivity of the Central Dopaminergic System and Autistic-Like Behavior Induced by a Single Early Prenatal Exposure to Lipopolysaccharide

Thiago B. Kirsten,^{1*} Gabriela P. Chaves-Kirsten,² Lucas M. Chaible,¹ Ana C. Silva,¹ Daniel O. Martins,² Luiz R.G. Britto,² Maria L.Z. Dagli,¹ Andrea S. Torrão,² João Palermo-Neto,¹ and Maria M. Bernardi^{1,3}

¹Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

²Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³Health Sciences Institute, Paulista University, São Paulo, Brazil

The aim of the present study was to evaluate the behavioral patterns associated with autism and the prevalence of these behaviors in males and females, to verify whether our model of lipopolysaccharide (LPS) administration represents an experimental model of autism. For this, we prenatally exposed Wistar rats to LPS (100 µg/kg, intraperitoneally, on gestational day 9.5), which mimics infection by gram-negative bacteria. Furthermore, because the exact mechanisms by which autism develops are still unknown, we investigated the neurological mechanisms that might underlie the behavioral alterations that were observed. Because we previously had demonstrated that prenatal LPS decreases striatal dopamine (DA) and metabolite levels, the striatal dopaminergic system (tyrosine hydroxylase [TH] and DA receptors D1a and D2) and glial cells (astrocytes and microglia) were analyzed by using immunohistochemistry, immunoblotting, and real-time PCR. Our results show that prenatal LPS exposure impaired communication (ultrasonic vocalizations) in male pups and learning and memory (T-maze spontaneous alternation) in male adults, as well as inducing repetitive/restricted behavior, but did not change social interactions in either infancy (play behavior) or adulthood in females. Moreover, although the expression of DA receptors was unchanged, the experimental animals exhibited reduced striatal TH levels, indicating that reduced DA synthesis impaired the striatal dopaminergic system. The expression of glial cell markers was not increased, which suggests that prenatal LPS did not induce permanent neuroinflammation in the striatum. Together with our previous finding of social impairments in males, the present findings demonstrate that prenatal LPS induced autism-like effects and also a hypoactivation of the dopaminergic system. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: animal model; autism-like effects; dopamine; gestation; infection

Autism is a developmental brain disorder that was first described by Kanner in 1943. Social deficits, communication abnormalities, repetitive behaviors, and cognitive inflexibility are characteristic features of autism (Landrigan, 2010).

Several neuropsychiatric disorders have a strong genetic basis. Various chromosomes and genes may generate the phenotypic expression of autism (Gadia et al., 2004; Muhle et al., 2004; James, 2008; Landrigan, 2010). However, several autistic patients do not exhibit any genetic changes, and these findings have not been replicated in other experimental studies. These conflicting results suggest that genetic alterations do not fully explain autism. In addition to the proposed genetic basis of autism, environmental factors, such as oxidative stress, neuroinflammation, mitochondrial dysfunction, biochemical disorders, maternal dietary factors, food contaminants, and viral prenatal infections, can impair the developing brain and cause neuropsychiatric disorders (Wing and Potter, 2002; Larsson et al., 2005; Boksa, 2010; Herbert, 2010; Bambini-Junior et al., 2011). In

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Contract grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Contract grant number: 08/53861-5; Contract grant number: 09/51886-3; Contract grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Contract grant number: 301739/2007-2; Contract grant sponsor: Paulista University; Contract grant number: 7-02-747/2010.

*Correspondence to: Thiago Berti Kirsten, Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo, SP 05508-270, Brazil. E-mail: thik@hotmail.com

Received 28 February 2012; Revised 2 April 2012; Accepted 17 April 2012

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.23089

particular, the fetal inflammatory response to intrauterine infection appears to contribute to neonatal brain injury and subsequent neurological disability (Meyer et al., 2011). Epidemiological studies have indicated an association between maternal infection during pregnancy and an increased risk for central nervous system (CNS) disorders in the offspring, including schizophrenia, autism, and cerebral palsy (Meyer et al., 2009; Boksa, 2010). Thus, environmental factors may play an important role in the onset and establishment of autism symptoms (Meyer et al., 2009).

Our previous investigations have shown that the prenatal treatment of rats with lipopolysaccharide (LPS; 100 µg/kg, intraperitoneally [i.p.], on gestational day [GD] 9.5), which mimics infection by gram-negative bacteria, reduces the social behavior of male offspring in infancy (play behavior) and adulthood (Kirsten et al., 2010b). These social interaction impairments are one of the classical symptoms of autism and are considered to be an autistic-like manifestation in experimental models of autism (Herbert, 2010).

Prenatal infection on GD 9.5 falls within a critical period for brain organogenesis. Infections associated with immunological events in the early/middle fetal stages (e.g., GD 8–10 in rats and mice) might have a stronger impact on neurodevelopment than late-stage pregnancy infections. Maternal immune activation during early/middle pregnancy may interfere with cell proliferation, differentiation, migration, target selection, and synapse maturation, eventually leading to multiple brain and behavioral abnormalities in adulthood (Shi et al., 2003; Meyer et al., 2006b, 2007; Samuelsson et al., 2006).

The aim of the present study was to verify whether our model of LPS administration (Kirsten et al., 2010b) represents an experimental model of autism. We have already demonstrated that prenatal LPS exposure reduces the social behavior of male offspring (Kirsten et al., 2010b). In the present study, we investigated possible changes in other behaviors that have been linked to autism, such as communication and learning and memory (cognition). We also investigated the prevalence of the behavioral changes in males and females, because autism is more prevalent in males, with a mean male:female prevalence ratio of 4.2:1 (Fombonne, 2009; Theoharides et al., 2009). Furthermore, we investigated the neurological mechanisms that might underlie the behavioral alterations observed. Currently, the exact mechanism of action that triggers the development of autism remains unclear. We have previously shown that prenatal LPS exposure decreases striatal dopamine (DA) and metabolite levels (Kirsten et al., 2010a). In this study, we extend our investigation to the role of the striatal dopaminergic system in the animal model of autism by evaluating the protein and gene expression of tyrosine hydroxylase (TH) and the DA receptors. Changes in glial cell markers were also assessed because of the neuroimmune activation triggered by LPS (Larson and Dunn, 2001; Dunn, 2006).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Forty pregnant Wistar rats between 12 and 13 weeks of age and weighing 216–263 g were used (GD 0 was defined as the day when spermatozoa were detected in the vaginal smear). The dams were individually housed in polypropylene cages (38 × 32 × 16 cm) at a controlled temperature (22°C ± 2°C) and humidity (65–70%) with artificial lighting (12-hr light/12-hr dark cycle, lights on at 6:00 AM). The animals had free access to Nuvilab rodent chow (Nuvital Co., São Paulo, Brazil) and filtered water. Sterilized and residue-free wood shavings were used for animal bedding. The animals were divided into control (saline-treated) and experimental (LPS-treated) groups (n = 20 dams/group). The dams were allowed to give birth and nurture their offspring normally. The day of birth was recorded as postnatal day (PND) 1. No handling was performed on PND 1, but on PND 2 eight offspring (four males and four females) were randomly selected for the following studies. No cross-fostering procedure was used. Litters with fewer than eight pups were culled. The eight randomly selected pups remained with each dam until weaning (PND 21). On PND 21, littermates were separated and cohoused by sex under the same conditions as their parents. One or two males or females from each litter were used for each experiment, using different animals in each experiment. All of the experiments were performed between 8:00 and 11:00 AM, and the testing of the control and the LPS-treated rats was intermixed. The animals used in this study were kept in accordance with the guidelines of the Committee on the Care and Use of Laboratory Animal Resources of the School of Veterinary Medicine, University of São Paulo (protocol No. 1398/2008, FMVZ-USP). These guidelines are based on those of the U.S. National Institutes of Health. The experiments were performed in accordance with good laboratory practice protocols and with quality-assurance methods.

Treatment

LPS (from *Escherichia coli*; Sigma, St. Louis, MO; serotype 0127: B8) was dissolved in sterile saline (50 µg/ml LPS in a 0.9% NaCl solution) and administered i.p. to pregnant dams at a dose of 100 µg/kg on GD 9.5. This dose was chosen because it has been shown to 1) elicit sickness behavior, 2) induce endocrine alterations in dams, 3) increase cytokines at the placental level, and 4) impair the offspring birth rate and reduce the social behavior of male offspring during infancy and adulthood (Wang et al., 2006; Spencer et al., 2007; Kirsten et al., 2010b). The control group consisted of pregnant rats that received only sterile saline (0.9% NaCl) with the same treatment schedule as the LPS animals. Each control dam was treated with 0.1 ml/100 g saline solution.

Ultrasonic Vocalization

Impaired communication of the pups with their mothers, a typical symptom of autism, was assessed via ultrasonic vocalization. On PND 11, one male pup from each experimental and control litter (n = 10 for each group) was examined for ultrasonic vocalization following maternal isolation. Rodent pups emit vocalizations (band frequency of 30–50

kHz) when isolated from their mothers, and these vocalizations are thought to solicit maternal interactions (Insel et al., 1986; Ise et al., 2008). PND 11 was chosen because 1) ultrasonic call production is relatively temperature independent during the second week of life compared with the first week, 2) high within-litter variability in call emission is observed at this time point, and 3) there is substantial evidence of intraindividual stability in call emission at this time point (Brunelli et al., 1996, 1997).

Immediately after the pups were isolated from their nests and mothers, they were individually placed in a polypropylene cage (30 × 20 × 12 cm), covered with bedding, and brought to a testing room (at controlled temperature, 22°C ± 2°C) that was separate from the housing room. The ultrasonic vocalizations were detected using an ultrasonic microphone (Pettersen model D940 ultrasound detector) that was tuned to a range centered at 40 kHz and placed 10 cm away from the bedding. The vocalizations were recorded as a digital WAV file (HP Pavilion dv5 notebook PC). The latency to the first ultrasonic vocalization (time, sec) and the number of ultrasonic vocalizations over a period of 5 min were measured. An observer who was blind to the treatment groups and hypotheses analyzed the digital recordings.

Play Behavior

Play behavior was assessed in female pups to evaluate whether the social impairment that had been previously found in male pups (Kirsten et al., 2010b) could also be found in females. Play behavior was analyzed as previously described (Kirsten et al., 2010b). Briefly, on PND 21, 48 female rat pups from the control and LPS-treated groups (two pups from each litter) were assigned to one of the following two conditions for play behavior analysis: individual housing (isolated-control rat pups, $n = 12$; isolated-treated rat pups, $n = 12$) and group housing consisting of three rat pups per cage (grouped-control rat pups, $n = 12$; grouped-treated rat pups, $n = 12$). The rationale behind the social isolation was to increase the motivation to initiate play behavior (Panksepp and Beatty, 1980). The animals were undisturbed in the polypropylene cages (38 × 32 × 16 cm) until PND 30. Play behavior was evaluated at PND 30 because this behavior has been shown to peak at this time point (Pletnikov et al., 1999). On PND 30, a treated- or control-isolated rat pup was confronted with a control- or treated-grouped rat pup, respectively (the difference in weight was less than 10 g). Their behaviors were recorded for 10 min in the cage of the isolated pup. A period of 5 min was allowed for the animals to adapt to the testing room prior to matching. The following parameters were measured: pinning frequency (the frequency of play behavior, i.e., the number of times an animal laid on its back with its partner standing over it; this behavior was counted for both animals because both were active participants), the time spent sniffing the partner (time, sec), the frequency of crawls over/under the other animal, the frequency of partner mounting, the duration of time spent following the partner (time, sec), and locomotion (time, sec). All of the play behavioral parameters except for pinning were observed individually for the isolated animals.

Adult Social Interaction

Female rats were also evaluated for adult social interactions. Social interactions were analyzed as previously reported (Kirsten et al., 2010b). Briefly, on PND 54–59, 24 female rat pups from the control and LPS-treated groups (one pup from each experimental and control litter, $n = 12$ for each group) were isolated immediately after confirmation of the estrous phase (vaginal smear detection). The animals were left undisturbed in polypropylene cages (38 × 32 × 16 cm) for 6 days. On PND 60–65, a treated- or control-isolated rat in estrous was confronted with an adult naïve female rat in estrous that had been previously grouped (the difference in body weight was smaller than 10 g). Their behaviors were recorded for 5 min in a new polypropylene cage with bedding. A period of 5 min was allowed for the animals to adapt to the testing room prior to matching. The following parameters were measured: the time spent sniffing the partner (time, sec), the frequency of crawls over/under the other animal, the frequency of partner mounting, the time spent following the partner (time, sec), and locomotion (time, sec). All of the parameters were observed individually for the isolated animals.

T-Maze

Impairments in learning and memory, which are also typical symptoms of autism, were examined using the T-maze spontaneous alternation test adapted from Baker et al. (2008), Stangherlin et al. (2008), and Timofeeva et al. (2008). On PND 60–67, two adult male rats from each experimental and control litter were evaluated. In addition to the prenatal LPS and saline (SAL) groups, two other groups were tested in the T-maze 90 min after an additional LPS challenge (100 µg/kg, i.p.). Thus, there were four groups in this experiment ($n = 8$ for each group): SAL, prenatal saline injection; LPS, prenatal LPS injection; SAL + LPS, prenatal saline and adult LPS injection; and LPS + LPS, prenatal and adult LPS injection. We challenged animals with LPS 90 min before the T-maze test, because it is known that brain areas related to memory function present high levels of neuronal plasticity (Kreitzer and Malenka, 2008). This plasticity compensates for possible impairments in normal behavioral function, becoming apparent only when the immune system is challenged. The LPS challenge dose and the time interval were chosen because they have been reported to cause sickness behavior and the release of proinflammatory cytokines and glucocorticoids (Lenczowski et al., 1997).

The T-maze was made of black-painted wood with three arms in a T-shape (90° of inclination) configuration. The T-maze was elevated 1 m from the floor. The arms were 10-cm wide, and the walls were 30-cm high. One of the arms had a 20-cm long start area separated from the continuation of the arm by a removable wall. The remainder of the stem of the maze was 45-cm long. The two other arms (left and right) were the choice arms and were 40-cm long. The testing room was a small room with dim lighting. The rats were placed in the start area for 10 sec. At this point, the barrier was raised, and the rat was permitted to explore the maze for 90 sec. Initially, each rat had a forced-choice trial in which the right arm was blocked. After 20–30 min, the rat had a

free-choice trial (both arms were open for exploration). After 4–5 hr, the rat had another forced choice in which the left arm was blocked. Finally, after 20–30 min, the rat had another free-choice trial. Before each trial, the apparatus was washed with a 5% ethanol/water solution to eliminate possible biasing effects from odor clues left by the previous rats. All of the trials were filmed for later analysis. The first choice of the rat in the free-choice trials was evaluated, i.e., whether the rat entered the left or the right arm first. If the rat entered the arm that was previously blocked, it was considered a hit based on the model of spontaneous alternation. This model is based on the natural proclivity of rats to alternate the choice of the visited goal-arm in each trial over a series of successive trials (Dudchenko, 2004). If the rat entered the arm that was previously unblocked, it was considered a miss. Thus, for statistical analyses, two misses in the two free-choice trials represented a score of 0, one hit and one miss received a score of 1, and two hits represented a score of 2. Additionally, the rearing frequency (the number of times the animal stood on its hind legs) was measured in the first trial to evaluate whether the animal had any exploratory/motor alterations.

Immunohistochemistry in the Striatum

The protein expression of markers of the striatal dopaminergic system and glial cells was qualitatively analyzed by using immunohistochemistry. On PND 60, one adult male rat from each experimental and control litter ($n = 6$ –8 for both groups) was deeply anesthetized with ketamine and xylazine and perfused through the heart with phosphate-buffered saline (PBS) and 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4). The brains were removed from the skull, post-fixed for 4 hr, and subsequently transferred to a 30% sucrose solution in PB to ensure cryoprotection. Coronal sections (30 μ m) of the frozen brains were cut on a sliding microtome and subjected to immunohistochemistry. Free-floating sections were incubated overnight with a mouse anti-TH monoclonal antibody, a mouse anti-DA D1a receptor monoclonal antibody, a rabbit anti-human DA receptor D2 polyclonal antibody (Chemicon, Temecula, CA), a mouse antiglial fibrillary acidic protein (GFAP) monoclonal antibody to label astrocytes (Sigma), and a mouse anti-rat CD11b/c monoclonal antibody (OX-42) to label microglia (Pharmingen BD Biosciences, San Jose, CA). All of the antibodies were diluted 1:1,000 in PB containing 0.3% Triton X-100. Detection was performed by using previously described conventional immunoperoxidase protocols (Chaves et al., 2008). The tissue was analyzed with a light microscope, and digital images were collected and mounted in Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA).

Immunoblotting in the Striatum

Protein levels were quantitatively analyzed as previously described (Chaves et al., 2008; Raineki et al., 2009). Briefly, one adult male rat from each experimental and control litter ($n = 6$ –8 for both groups) was decapitated at PND 60, and the striatum was rapidly collected and homogenized in an extraction buffer. The homogenates were subjected to centrifugation, and the protein concentration of the supernatant was

determined using a protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA). The samples from the homogenate (75 μ g of protein) were run on an acrylamide gel and electrotransferred to nitrocellulose membranes using a Trans-Blot cell system (Bio-Rad). The nitrocellulose membranes were then blocked and incubated with the same primary antibodies as described above (TH, D1a, D2, GFAP, and OX-42). In all of the experiments, an anti- β -actin antibody (Sigma) was used as a loading control. Bound antibodies were visualized using a chemiluminescence kit (ECL Kit; Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). Finally, the blots were densitometrically analyzed in Scion Image 4.0.2 (Scion Corporation, Frederick, MD). Because there were no changes in the expression levels of β -actin, the optical densities of the TH, D1a, D2, GFAP, and OX-42 bands were normalized to the corresponding β -actin bands in each experiment. The normalized data were subsequently analyzed for changes in protein expression in the LPS-treated striatum compared with the controls.

Real-Time PCR in the Striatum

Quantitative real-time PCR was used to analyze the gene expression of TH and the D1a and D2 receptors in the striatum of one adult male rat from each experimental and control litter ($n = 6$ –8 for both groups). The tissue was isolated on ice, and the mRNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). The corresponding cDNA was synthesized using Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) and oligo(dT) primers. Real-time PCR was performed using the TaqMan gene expression assay kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. The primers and probe sets employed were specific for TH (Applied Biosystems; catalog No. Rn00562500_m1), the D1a receptor (catalog No. Rn03062203_s1), the D2 receptor (catalog No. Rn01418275_m1), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; catalog No. Rn99999916_s1). Analysis of the relative gene expression data was performed according to the method of Livak and Schmittgen (2001) using the GAPDH gene as an internal control for normalization.

Statistical Analyses

Mother was the experimental unit, and one or two males or females from each litter were used for each experiment, thus with different animals in each experiment. The results are expressed as mean $\pm$ SEM. Homoscedasticity was verified using an F-test or Bartlett's test. Normality was verified by a Kolmogorov-Smirnov test. Student's *t*-test (unpaired, two-tailed) was used to compare the parametric group data. For the T-maze score analysis, a Kruskal-Wallis test was used, followed by a Dunn test. For the rearing frequency, a one-way ANOVA was used, followed by Tukey's test. In all cases, the results were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

The male pups from the LPS-treated group emitted fewer ultrasonic vocalizations than their respective controls ($P = 0.0239$; Fig. 1). The latency to the first ultra-

Fig. 1. Effects of prenatal LPS exposure (100 µg/kg on GD 9.5) on the number of ultrasonic vocalizations of the infant male rat pups on PND 11. Gray bar, control (SAL) group; black bar, LPS group; $n = 10$ pups/group. * $P < 0.05$ (Student's t -test) compared with the control group. Values are mean $\pm$ SEM.

TABLE I. Effects of Prenatal LPS Exposure (100 µg/kg on GD 9.5) on Play Behavior and Adult Social Interactions in Female Rats ($n = 12$ for both groups; data are mean $\pm$ SEM)

Parameters	Control group	LPS group
Play behavior in infancy		
Pinning frequency	4.08 $\pm$ 0.83	4.00 $\pm$ 0.91
Sniffing the partner (sec)	246.75 $\pm$ 27.83	230.50 $\pm$ 25.95
Frequency of crawls over/under the other animal	14.17 $\pm$ 2.39	15.50 $\pm$ 1.72
Partner mounting frequency	1.92 $\pm$ 0.47	2.67 $\pm$ 0.41
Following the partner (sec)	18.22 $\pm$ 1.74	16.45 $\pm$ 1.57
Locomotion (sec)	229.56 $\pm$ 30.97	218.59 $\pm$ 27.59
Social interaction in adulthood		
Sniffing the partner (sec)	68.26 $\pm$ 9.30	62.70 $\pm$ 9.01
Frequency of crawls over/under the other animal	9.42 $\pm$ 1.53	7.67 $\pm$ 0.86
Partner mounting frequency	2.50 $\pm$ 0.48	1.58 $\pm$ 0.60
Following the partner (sec)	19.79 $\pm$ 2.71	17.10 $\pm$ 2.42
Locomotion (sec)	38.41 $\pm$ 4.24	44.17 $\pm$ 6.58

sonic vocalization did not differ between the control group (28.70 $\pm$ 20.23) and the LPS-treated group (26.20 $\pm$ 15.80; $P = 0.9235$).

The play behavior and the adult social interaction of the female rats prenatally treated with LPS were not different from those of the control animals (Table I).

The performance in the T-maze spontaneous alternation task was different between groups (KW < 14.66), suggesting that the spatial learning and memory of the male rats that had been prenatally treated with LPS was impaired (Fig. 2). There were no differences in the hit scores among the SAL (1.0 [0.0–2.0]), LPS (2.0 [0.0–2.0]), and SAL + LPS (0.0 [0.0–2.0]) groups. However, the LPS + LPS group (0.0 [0.0–1.0]) had significantly fewer hits than the SAL group ($P < 0.05$) and particularly fewer than the LPS group ($P < 0.01$). The rearing frequency in the T-maze was decreased in the SAL + LPS (1.63 $\pm$ 0.71) and the LPS + LPS (2.25 $\pm$ 0.65)

Fig. 2. Effects of prenatal LPS exposure (100 µg/kg on GD 9.5) on the hit score in the T-maze spontaneous alternation test of the adult male rat pups on PND 60. SAL, prenatal saline injection; LPS, prenatal LPS injection; SAL + LPS, prenatal saline injection and LPS injection in the adults; LPS + LPS, prenatal and adult LPS injections; $n = 8$ pups/group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ (Kruskal-Wallis test followed by a Dunn test). Values are percentages of hits and misses.

groups compared with the SAL (7.50 $\pm$ 0.89) and LPS (9.25 $\pm$ 0.65) groups ($F_{3,28} = 27.11$, $P < 0.0001$). The rearing frequency data indicate that the LPS challenge in adulthood, but not prenatal LPS exposure itself, impaired exploratory activity.

In the qualitative immunohistochemistry analysis, there were no apparent changes in the expression of TH, GFAP, OX-42 or the D1a and D2 dopamine receptors (Supp. Info. Fig. 1). In addition, there were no morphological changes in the astrocytes or microglia.

As depicted in Figure 3, prenatal treatment with LPS impaired the dopaminergic protein levels in the striatum. Adult male rats that had been prenatally treated with LPS demonstrated a reduction of striatal TH levels with respect to the control group ($P = 0.0009$). However, no differences were found for D1a, D2, GFAP, or OX-42 ($P > 0.05$).

There were no differences in the striatal gene expression of TH, D1a, or D2 between the LPS-treated and the control groups. The normalized ratios for TH, D1, and D2 in the controls were 1.15 $\pm$ 0.31, 1.20 $\pm$ 0.31, and 1.14 $\pm$ 0.24, respectively, and were 1.06 $\pm$ 0.23, 1.01 $\pm$ 0.15, and 0.95 $\pm$ 0.20, respectively, in the LPS group ($P > 0.05$).

DISCUSSION

The present results show that prenatal LPS exposure impaired communication in male pups and learning and memory in male adults. However, we observed different results for different genders in the social interactions evaluations in infancy and adulthood; i.e., previously we showed that prenatal LPS impaired the social interactions of male rats (Kirsten et al., 2010b), and here we showed no impairments in females. Social deficits, communication abnormalities, and cognitive inflexibility

Fig. 3. Effects of prenatal LPS exposure (100 $\mu\text{g/kg}$ on GD 9.5) on the striatal protein levels (normalized optical density/ β -actin ratio), which were analyzed by immunoblotting in the adult male rats on PND 60. Gray bars, control (SAL) group; black bars, LPS group. TH, tyrosine hydroxylase; D1a, dopamine D1a receptor; D2, dopamine D2 receptor; GFAP, glial fibrillary acidic protein; OX-42, marker for microglia; $n = 6-8$ rats/group. *** $P < 0.001$ (Student's t -test) compared with the control group. Values are mean $\pm$ SEM.

are characteristic features of autism (Landrigan, 2010). The behavioral impairments measured in this study were more pronounced in males than in females, which is in agreement with the higher prevalence of autism in men than in women (Fombonne, 2009). The reason for this higher prevalence in males is still unknown. Thus, prenatal LPS exposure on GD 9.5 seems to induce autism-like effects in rats.

In this context, there are several publications correlating experimental animal models with maternal immunological activation and the emergence of neuropsychiatric disorders, such as schizophrenia and autism. A well-established model is based on prenatal treatment with the viral-mimic inflammatory agent polyribonucleosinic-polyribocytidilic acid (poly[I:C]), a synthetic analog of double-stranded RNA. Early/middle (GD 9) and late (GD 17) prenatal poly(I:C) exposure in mice is a powerful experimental tool for inducing and studying the distinct brain and behavioral abnormalities that are relevant to the positive and negative/cognitive symptoms of schizophrenia, respectively (Meyer et al., 2006a,b, 2008; Meyer and Feldon, 2012).

Prenatal/perinatal exposure to numerous pathogens, including rubella, measles, and cytomegalovirus, has been implicated in the etiology of autism, suggesting that the infection-associated risk of autism might not be pathogen specific (Meyer et al., 2011). This hypothesis is supported by a hospital study suggesting that maternal exposure to various viral or bacterial infections significantly increased the risk of autism-spectrum disorders in children, an effect that seemed unrelated to hospitalization per se (Atladdottir et al., 2010). Thus, acute fetal neuroinflammation, together with its effects on early neurodevelopmental processes, may facilitate the devel-

opment of the psychopathological and neuropathological phenotypes of autism (Meyer et al., 2011).

It has been suggested that the effects of maternal LPS exposure on the developing fetal brain are mediated by cytokine induction within the maternal circulation and placenta (Cai et al., 2000; Urakubo et al., 2001; Ashdown et al., 2006; Smith et al., 2007). Prenatal LPS exposure has been shown to increase the levels of both cytokines and glucocorticoids in the fetal brain (Gayle et al., 2004; Hava et al., 2006).

In the T-maze, no differences were seen in the animals whose mothers had been treated with saline or LPS. Moreover, differences were seen when the LPS group was treated 90 min before the trial with LPS (LPS + LPS group). It could be proposed that only the LPS challenge was responsible for the behavioral impairments in the T-maze and not the prenatal LPS, because it is known that acute LPS exposure causes sickness behavior quickly and impairs learning and cognitive function (Larson and Dunn, 2001). However, the fact that the SAL + LPS group (challenged with LPS 90 min before the test) did not present differences compared with the SAL and LPS groups, unlike the LPS + LPS group, which presented higher miss rates compared with SAL and LPS groups, shows that prenatal LPS exposure was critical to express the behavioral impairments in the T-maze, but not the LPS challenge 90 min before the test.

Our present findings show that prenatal LPS impaired the learning and memory of rats after immune challenge. We believe that we found impairments only after the LPS challenge because it is known that brain areas related to memory function present high levels of neuronal plasticity (Kreitzer and Malenka, 2008). This plasticity compensates for possible impairments in normal

behavioral function, being revealed only when the immune system is challenged.

Another typical symptom of autism is the occurrence of repetitive and restricted behaviors (Moy et al., 2008). Although T-maze spontaneous alternation test is used to evaluate the learning and spatial memory (Dudchenko, 2004), it is possible to discuss the present findings of misses in the spontaneous alternation test as repetitive and restricted behaviors, because the LPS + LPS group mostly visited the same arm that had been blocked in the previous sessions. Before the T-maze test was suggested as a test of repetitive/restricted behavior, we tried some classical repetitive/restricted behavior tests, which were not adequate to show the stereotype related with autism symptoms (Kirsten et al., 2010a). Given the limitation of the existent tests, we propose that the T-maze spontaneous alternation test could be used to test repetitive/restricted behavior, because it does not use an "inducer." In addition, the T-maze test is trustworthy to examine repetitive behavior in autism experimental models, because it allows analysis of the different dimensions of repetitive behavior, such as repetitive motor actions, resistance to change, and insistence on sameness (Szatmari et al., 2006; Moy et al., 2008). In fact, several autistic children insist that routines always occur in the same way; for example, they refuse to change a known path (Mirenda et al., 2010).

In addition to the behavioral experiments, we also analyzed the brain tissue of LPS-exposed animals by using various techniques, including histological analysis (hematoxylin and eosin); determination of monoamine levels and turnover (high-pressure liquid chromatography); and qualitative, semiquantitative (immunohistochemistry), and quantitative protein (immunoblotting) and gene (real-time PCR) expression throughout the brain, including the cerebellum, striatum, hypothalamus, frontal cortex, hippocampus, and olfactory bulb. We discovered that prenatal exposure to LPS decreases striatal DA and metabolite levels without altering the serotonergic and noradrenergic systems (Kirsten, 2008; Kirsten et al., 2010a,b, 2011; Taricano, 2010). Our present results show a reduction in striatal TH expression in LPS-treated animals. These results, combined with our previous quantification of the decrease in striatal DA and metabolite levels, suggest that the striatal dopaminergic system is impaired in the LPS-treated rats. This striatal dopaminergic system impairment most likely is due to an impairment in DA synthesis, because TH is the first enzyme in the DA biosynthetic pathway (Baker et al., 2003).

In this regard, prenatal LPS increases the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF)- α in the chorioamniotic fluid (Ling et al., 2002). LPS is a potent inducer of tumor necrosis factor- α , which kills DA neurons in culture (McGuire et al., 2001).

Our immunoblotting results revealed a 24% decrease in TH levels in rats that had been prenatally treated with LPS. However, the same results were not observed with immunohistochemistry. This difference might be due to the peculiarities of the immunohistochemistry technique, as reviewed by Leong and col-

leagues (2010). Immunohistochemistry is fundamentally a qualitative technique, especially when labeling a molecule as diffuse as TH in the striatum.

The PCR technique detected TH mRNA in the striatum of the rats. TH mRNA can originate from small, intrinsic striatal dopaminergic circuitry (Huot and Parent, 2007), which was not changed following prenatal LPS exposure. Different animal models, such as those used for Parkinson's disease (PD), show a massive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc), which causes a large decrease in the DA levels in the striatum. These studies also show an increase in the number of intrinsic TH⁺ neurons in the DA-depleted striatum (Porritt et al., 2000). The lack of variation in TH mRNA concurrent with the decrease in TH protein expression levels in the striatum of the LPS-treated group led us to speculate that our results could be a consequence of events occurring in the SNc as in Parkinson's disease (PD). In the present study, because the reduction of DA was discrete, it might not have been sufficient to alter the gene expression (mRNA) of TH in the striatum. The small reduction of DA in the striatum may also explain the lack of variation in the expression of D1 and D2 receptors, because we expected an increase in these receptors similar to that reported in PD (Guttman, 1992).

In our study, the exposure to LPS was prenatal, and no apparent changes occurred in glial cells in adulthood, indicating a lack of a permanent neuroinflammatory processes in the striatum of adult rats. Thus, the behavioral impairments described here were a consequence not of an adult neuroinflammatory processes but probably of a prenatal neuroinflammation.

We found here that prenatal LPS exposure induced hypoactivation of the dopaminergic system. There are several neurological hypotheses for autism, the most widespread of which is hyperserotonemia (Narita et al., 2002). However, serotonin levels have been shown to be unaffected by prenatal LPS exposure (Kirsten, 2008). A dopaminergic hypothesis also exists, which suggests that hyperactivation of the dopaminergic system leads to autism (Nakasato et al., 2008). The fact that autism is defined as having a "broader phenotype" (Volkmar et al., 2004) may explain the varied neurological manifestations that have been reported. The importance of establishing an experimental model of autism with prenatal LPS is an extra step toward understanding this disorder better, keeping in mind that the exact mechanisms by which autism develops are still unknown. Taken as a whole, our previous studies (Kirsten et al., 2010a,b) and the present data experimentally reproduced the most important aspects of the autism disorder symptoms (social deficits, communication abnormalities, cognitive inflexibility, repetitive/restricted behavior, with these impairments being more pronounced in males than in females) after a single maternal immune activation. Moreover, our studies also include the hypoactivity of the dopaminergic system as one possible aspect explaining autism-spectrum disorder.

We believe that our present behavioral findings of prenatal LPS inducing social deficits, communication

abnormalities, cognitive inflexibility, repetitive/restricted behavior, with these impairments being more pronounced in males than in females, suggest autism-like effects in rats. However, we cannot completely discard the possibility that these results are associated with other neurodevelopmental brain disorders, including schizophrenia, cerebral palsy, and mental retardation (Meyer et al., 2009; Boksa, 2010). In this regard, prenatal LPS treatment has also been widely used as a “schizophrenia-relevant” model as described by Fortier’s and Romero’s groups (Fortier et al., 2004; R. Romero et al., 2007; E. Romero et al., 2010). However, the prenatal LPS treatments with the Fortier and Romero groups are, respectively, at the end of (GD 18 and 19) and throughout (GD 0 to 20) gestation. In our model, the LPS treatment was given in a single dose and early (GD 9.5), similar to other experimental autism models with different treatments, such as thalidomide or valproic acid (Schneider et al., 2008; Narita et al., 2010). There is also considerable epidemiological evidence that links failures in early fetal brain development (i.e., around the first few weeks of gestation) to a higher risk for autism (Arndt et al., 2005; Libbey et al., 2005; Miller et al., 2005). Thus, early, middle, and late gestational periods correspond to different windows with differing vulnerability for offspring behavioral dysfunction and neuropathology and for the acute cytokine responses in the fetal brain (Meyer et al., 2006b). The timing of the immune challenge with respect to the gestational age and neurologic development of the fetus may be crucial in the elicited response, including for different neurodevelopmental brain disorders (Meyer et al., 2007; Burd et al., 2012).

In conclusion, prenatal LPS exposure on GD 9.5 impaired communication in the pups and learning and memory in the adults and induced repetitive/restricted behavior. In addition, male (Kirsten et al., 2010b), but not female, social interactions in infancy and adulthood were affected. Thus, prenatal LPS exposure may induce autism-like effects in rats. With the behavioral findings of autism-like effects and together with our previous data (Kirsten et al., 2010a), we showed that these rats prenatally exposed to LPS present striatal dopaminergic hypoactivation, i.e., a reduction in TH, DA, and metabolite levels. We believe that these data may improve our understanding of autism and associated diseases.

REFERENCES

- Arndt TL, Stodgell CJ, Rodier PM. 2005. The teratology of autism. *Int J Dev Neurosci* 23:189–199.
- Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. 2006. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 11:47–55.
- Atladdottir HO, Thorsen P, Ostergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M, Parner ET. 2010. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 40:1423–1430.
- Baker H, Kobayashi K, Okano H, Saino-Saito S. 2003. Cortical and striatal expression of tyrosine hydroxylase mRNA in neonatal and adult mice. *Cell Mol Neurobiol* 23:507–518.
- Baker S, Chebli M, Rees S, Lemarec N, Godbout R, Bielajew C. 2008. Effects of gestational stress: 1. Evaluation of maternal and juvenile offspring behavior. *Brain Res* 1213:98–110.
- Bambini-Junior V, Rodrigues L, Behr GA, Moreira JC, Riesgo R, Gottfried C. 2011. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters. *Brain Res* 1408:8–16.
- Boksa P. 2010. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun* 24:881–897.
- Brunelli SA, Keating CC, Hamilton NA, Hofer MA. 1996. Development of ultrasonic vocalization responses in genetically heterogeneous National Institutes of Health (N:NIH) rats. I. Influence of age, testing experience, and associated factors. *Dev Psychobiol* 29:507–516.
- Brunelli SA, Vinocur DD, Soo-Hoo D, Hofer MA. 1997. Five generations of selective breeding for ultrasonic vocalization (USV) responses in N:NIH strain rats. *Dev Psychobiol* 31:255–265.
- Burd I, Balakrishnan B, Kannan S. 2012. Models of fetal brain injury, intrauterine inflammation, and preterm birth. *Am J Reprod Immunol* 67:287–294.
- Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, Rhodes PG. 2000. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr Res* 47:64–72.
- Chaves GP, Nogueira TC, Britto LR, Bordin S, Torrao AS. 2008. Retinal removal up-regulates cannabinoid CB₁ receptors in the chick optic tectum. *J Neurosci Res* 86:1626–1634.
- Dudchenko PA. 2004. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 28:699–709.
- Dunn AJ. 2006. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. *Clin Neurosci Res* 6:52–68.
- Fombonne E. 2009. Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr Res* 65:591–598.
- Fortier ME, Joobar R, Luheshi GN, Boksa P. 2004. Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine-induced locomotion and startle responses in adult rat offspring. *J Psychiatr Res* 38:335–345.
- Gadia CA, Tuchman R, Rotta NT. 2004. Autism and pervasive developmental disorders. *J Pediatr* 80(Suppl):S83–S94.
- Gayle DA, Beloesky R, Desai M, Amidi F, Nunez SE, Ross MG. 2004. Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R1024–R1029.
- Guttman M. 1992. Dopamine receptors in Parkinson’s disease. *Neurol Clin* 10:377–386.
- Hava G, Vered L, Yael M, Mordechai H, Mahoud H. 2006. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. *Dev Psychobiol* 48:162–168.
- Herbert MR. 2010. Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol* 23:103–110.
- Huot P, Parent A. 2007. Dopaminergic neurons intrinsic to the striatum. *J Neurochem* 101:1441–1447.
- Insel TR, Hill JL, Mayor RB. 1986. Rat pup ultrasonic isolation calls: possible mediation by the benzodiazepine receptor complex. *Pharmacol Biochem Behav* 24:1263–1267.
- Ise S, Nagano N, Okuda S, Ohta H. 2008. Corticotropin-releasing factor modulates maternal separation-induced ultrasonic vocalization in rat pups via activation of CRF1 receptor. *Brain Res* 1234:59–65.
- James SJ. 2008. Oxidative stress and the metabolic pathology of autism. In: Zimmerman AW, editor. *Autism: current theories and evidence*. Totowa, NJ: Humana Press. p 245–268.

- Kanner L. 1943. Autistic disturbances of affective contact. *Nerv Child* 2:217–250.
- Kirsten TB. 2008. Avaliação comportamental e neuroquímica da prole masculina de ratas expostas pré-natalmente ao lipossacarídeo (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 123 p.
- Kirsten TB, Taricano M, Florio JC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. 2010a. Prenatal lipopolysaccharide reduces motor activity after an immune challenge in adult male offspring. *Behav Brain Res* 211:77–82.
- Kirsten TB, Taricano M, Maiorka PC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. 2010b. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. *Neuroimmunomodulation* 17:240–251.
- Kirsten TB, Chaves GP, Taricano M, Martins DO, Florio JC, Britto LR, Torrao AS, Palermo Neto J, Bernardi MM. 2011. Prenatal LPS exposure reduces olfactory perception in neonatal and adult rats. *Life Sci* 104:417–422.
- Kreitzer AC, Malenka RC. 2008. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60:543–554.
- Landrigan PJ. 2010. What causes autism? Exploring the environmental contribution. *Curr Opin Pediatr* 22:219–225.
- Larson SJ, Dunn AJ. 2001. Behavioral effects of cytokines. *Brain Behav Immun* 15:371–387.
- Larsson HJ, Eaton WW, Madsen KM, Vestergaard M, Olesen AV, Agerbo E, Schendel D, Thorsen P, Mortensen PB. 2005. Risk factors for autism: perinatal factors, parental psychiatric history, and socioeconomic status. *Am J Epidemiol* 161:916–928.
- Lenczowski MJ, Van Dam AM, Poole S, Larrick JW, Tilders FJ. 1997. Role of circulating endotoxin and interleukin-6 in the ACTH and corticosterone response to intraperitoneal LPS. *Am J Physiol* 273:R1870–R1877.
- Leong TY, Cooper K, Leong AS. 2010. Immunohistology—past, present, and future. *Adv Anat Pathol* 17:404–418.
- Libbey JE, Sweeten TL, McMahon WM, Fujinami RS. 2005. Autistic disorder and viral infections. *J Neurovirol* 11:1–10.
- Ling Z, Gayle DA, Ma SY, Lipton JW, Tong CW, Hong JS, Carvey PM. 2002. In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain. *Mov Disord* 17:116–124.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(−Delta Delta C(T))} method. *Methods* 25:402–408.
- McGuire SO, Ling ZD, Lipton JW, Sortwell CE, Collier TJ, Carvey PM. 2001. Tumor necrosis factor alpha is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons. *Exp Neurol* 169:219–230.
- Meyer U, Feldon J. 2012. To poly(I:C) or not to poly(I:C): Advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. *Neuropharmacology* 62:1308–1321.
- Meyer U, Feldon J, Schedlowski M, Yee BK. 2006a. Immunological stress at the maternal–foetal interface: a link between neurodevelopment and adult psychopathology. *Brain Behav Immun* 20:378–388.
- Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, Yee BK, Feldon J. 2006b. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci* 26:4752–4762.
- Meyer U, Yee BK, Feldon J. 2007. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? *Neuroscientist* 13:241–256.
- Meyer U, Nyffeler M, Yee BK, Knuesel I, Feldon J. 2008. Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. *Brain Behav Immun* 22:469–486.
- Meyer U, Feldon J, Fatemi SH. 2009. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 33:1061–1079.
- Meyer U, Feldon J, Dammann O. 2011. Schizophrenia and autism: both shared and disorder-specific pathogenesis via perinatal inflammation? *Pediatr Res* 69:26R–33R.
- Miller MT, Stromland K, Ventura L, Johansson M, Bandim JM, Gillberg C. 2005. Autism associated with conditions characterized by developmental errors in early embryogenesis: a mini review. *Int J Dev Neurosci* 23:201–219.
- Mirenda P, Smith IM, Vaillancourt T, Georgiades S, Duku E, Szatmari P, Bryson S, Fombonne E, Roberts W, Volden J, Waddell C, Zwaigenbaum L. 2010. Validating the Repetitive Behavior Scale—Revised in young children with autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord* 40:1521–1530.
- Moy SS, Nadler JJ, Poe MD, Nonneman RJ, Young NB, Koller BH, Crawley JN, Duncan GE, Bodfish JW. 2008. Development of a mouse test for repetitive, restricted behaviors: relevance to autism. *Behav Brain Res* 188:178–194.
- Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. 2004. The genetics of autism. *Pediatrics* 113:e472–e486.
- Nakasato A, Nakatani Y, Seki Y, Tsujino N, Umino M, Arita H. 2008. Swim stress exaggerates the hyperactive mesocortical dopamine system in a rodent model of autism. *Brain Res* 1193:128–135.
- Narita M, Oyabu A, Imura Y, Kamada N, Yokoyama T, Tano K, Uchida A, Narita N. 2010. Nonexploratory movement and behavioral alterations in a thalidomide or valproic acid-induced autism model rat. *Neurosci Res* 66:2–6.
- Narita N, Kato M, Tazoe M, Miyazaki K, Narita M, Okado N. 2002. Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal thalidomide- and valproic acid-exposed rat: putative animal models for autism. *Pediatr Res* 52:576–579.
- Panksepp J, Beatty WW. 1980. Social deprivation and play in rats. *Behav Neural Biol* 30:197–206.
- Pletnikov MV, Rubin SA, Vasudevan K, Moran TH, Carbone KM. 1999. Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behav Brain Res* 100:43–50.
- Porritt MJ, Batchelor PE, Hughes AJ, Kalnins R, Donnan GA, Howells DW. 2000. New dopaminergic neurons in Parkinson's disease striatum. *Lancet* 356:44–45.
- Raineki C, De Souza MA, Szawka RE, Lutz ML, De Vasconcellos LF, Sanvitto GL, Izquierdo I, Bevilacqua LR, Cammarota M, Lucion AB. 2009. Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. *Neuroscience* 159:31–38.
- Romero E, Guaza C, Castellano B, Borrell J. 2010. Ontogeny of sensorimotor gating and immune impairment induced by prenatal immune challenge in rats: implications for the etiopathology of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 15:372–383.
- Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. 2007. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med* 25:21–39.
- Samuelsson AM, Jennische E, Hansson HA, Holmang A. 2006. Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA_A dysregulation and impaired spatial learning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R1345–R1356.
- Schneider T, Roman A, Basta-Kaim A, Kubera M, Budziszewska B, Schneider K, Przewlocki R. 2008. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology* 33:728–740.
- Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, Patterson PH. 2003. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J Neurosci* 23:297–302.
- Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirmics K, Patterson PH. 2007. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci* 27:10695–10702.

- Spencer SJ, Mouihate A, Galic MA, Ellis SL, Pittman QJ. 2007. Neonatal immune challenge does not affect body weight regulation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R581–R589.
- Stangherlin EC, Luchese C, Pinton S, Rocha JB, Nogueira CW. 2008. Sub-chronical exposure to diphenyl diselenide enhances acquisition and retention of spatial memory in rats. *Brain Res* 1201:106–113.
- Szatmari P, Georgiades S, Bryson S, Zwaigenbaum L, Roberts W, Mahoney W, Goldberg J, Tuff L. 2006. Investigating the structure of the restricted, repetitive behaviours and interests domain of autism. *J Child Psychol Psychiatry* 47:582–590.
- Taricano M. 2010. Efeitos da administração pré-natal de LPS no aprendizado e/ou memória na prole de ratas (dissertação). São Paulo: Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo. 103 p.
- Theoharides TC, Kempuraj D, Redwood L. 2009. Autism: an emerging “neuroimmune disorder” in search of therapy. *Expert Opin Pharmacother* 10:2127–2143.
- Timofeeva OA, Roegge CS, Seidler FJ, Slotkin TA, Levin ED. 2008. Persistent cognitive alterations in rats after early postnatal exposure to low doses of the organophosphate pesticide, diazinon. *Neurotoxicol Teratol* 30:38–45.
- Urakubo A, Jarskog LF, Lieberman JA, Gilmore JH. 2001. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. *Schizophr Res* 47:27–36.
- Volkmar FR, Lord C, Bailey A, Schultz RT, Klin A. 2004. Autism and pervasive developmental disorders. *J Child Psychol Psychiatry* 45:135–170.
- Wang X, Rousset CI, Hagberg H, Mallard C. 2006. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin Fetal Neonatal Med* 11:343–353.
- Wing L, Potter D. 2002. The epidemiology of autistic spectrum disorders: is the prevalence rising? *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8:151–161.