

**AMANDA FLORENTINA DO NASCIMENTO**

**MODULAÇÃO IMUNOLÓGICA DA RELAÇÃO MÃE E FILHOTE**

**SÃO PAULO**

**2012**

# **AMANDA FLORENTINA DO NASCIMENTO**

Modulação imunológica da relação mãe e filhote

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

**Departamento:**

Patologia

**Área de Concentração:**

Patologia Experimental e Comparada

**Orientador:**

Prof. Dr. Luciano Freitas Felício

**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 Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2593  
FMVZ

Nascimento, Amanda Florentina do  
Modulação imunológica da relação mãe e filhote / Amanda Florentina do Nascimento. -- 2012.  
90 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - 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: Prof. Dr. Luciano Freitas Felício.

1. Lipopolissacarídeo. 2. Dopamina. 3. Mãe-filhote. 4. Comportamento maternal.  
5. Comportamento doentio. I. Título.



*Comissão de Ética no uso de animais*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Modulação imunológica da interação mãe e filhote", protocolado sob o nº 1881/2010, utilizando 90 (noventa) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 24/03/2010.

We certify that the Research "Immunological modulation of the mother-pup interaction", protocol number 1881/2010, utilizing 90 (ninety) rats, under the responsibility Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 03/24/2010.

São Paulo, 1º de junho de 2012

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: NASCIMENTO, Amanda Florentina

Título: **Modulação imunológica da relação mãe e filhote.**

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

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca Examinadora

Prof.Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

À Deus ...

Autor e sustentador da existência  
e inspirador da minha vida!

Aos meus pais, Basílio e Josenita,  
pelas asas e âncoras que me deram  
e pela presença sempre constante;

Ao meu companheiro e amigo Francinério,  
por sempre estar ao meu lado,  
apoiando - me sempre em minhas escolhas;

A minha família,  
por todo incentivo, amor,  
carinho e compreensão;

Ao Professor Dr Luciano Freitas Felício,  
que me concedeu a honra,  
e o privilegio de tê-lo como orientador;

A Professora Dra Maria Martha Bernardi,  
que me privilegiou com seu arrimo,  
gabarito e parâmetros.

Aos animais do laboratório,  
utilizados em meu experimento!

## **AGRADECIMENTOS**

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

A Dra. Glaucie Jussilane Alves e Professora Dra. Cristina de Oliveira M. Salles Gomes por suas preciosas colaborações na elaboração desta dissertação.

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

Aos colegas do departamento de patologia, Thiago Kirsten, Esther Ricci, Thiago Marinho, Aline Mello, Marianne Klein, Taíssa Sandini e Mariana Sayuri, pela ajuda.

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

Aos funcionários do Laboratório de histologia: Cláudio e Luciano pela confecção dos cortes histológicos.

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

Aos funcionários do Biotério (VPT-FMVZ-USP): Claudia, Idalina, Ana, Nelson e Mauro por  
toda a dedicação.

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

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

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

Aos funcionários da FMV-USP por toda a atenção.

**A FAPESP 2010/01855-1, pelo apoio financeiro concedido.**

## **“ A beleza da maternidade ”**

Dentre as tantas belezas do universo:  
Como o luar, o por do sol, a aurora boreal...  
Uma merece destaque em prosa e verso!  
Pois é nobre, bela e muito especial.

É a beleza que auxilia a própria vida  
em seu início, em seus primeiros passos...  
Preparando os seres para os labores da vida,  
fossilizando hereditários instintos e traços.

Tal beleza é a maternidade em sua ternura  
Com o vigor e complexidade de seus cuidados;  
Repletos de zelo, direção, correção e candura...

Ela está presente em seres afáveis e em feras,  
até entre ratos que vivem desolados,  
ela é na existência uma das coisas mais belas!!!

**(Cicero Cavalcante Amaral)**

## RESUMO

NASCIMENTO, A. N. **Modulação imunológica da relação mãe e filhote.** [Immunological modulation of the mother-pup interaction]. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O comportamento maternal (CM) em mamíferos tem características específicas. O período logo após o parto é particularmente sensível a alterações fisiológicas que podem modular a expressão deste comportamento importante. Mudanças comportamentais observadas em animais doentes são consideradas comportamento doentio (CD). A exposição ao LPS, uma endotoxina derivada da parede de uma bactéria gram negativa, durante a gravidez pode causar doenças mentais. A fim de investigar, uma possível relação entre CM e CD, os animais foram tratados com LPS. Para o estudo do CM e agressivo, quarenta ratas foram divididos em quatro grupos, dois controles e dois grupos experimentais, com dez animais cada. O grupo experimental recebeu 100µg/kg de LPS por via i.p, e grupo controle o veículo de endotoxina, após quarenta e oito horas de administração de LPS, ou seja, no quinto dia de lactação, as observações começaram. Para escolha deste dia, ratas virgens e ratas lactantes foram divididas em quatro grupos, dois controles e dois experimentais, com dez fêmeas cada. O peso corporal, consumo de água, ração, e a temperatura corporal foram medidas para cento e vinte horas. As fêmeas do grupo controle foram observadas da mesma forma, mas foram tratados com o veículo do LPS. Observamos que: 1) Em ratas virgens e lactantes o tratamento com LPS modificou a temperatura e peso corporal, consumo de água e ração; 2) No período de lactação houve redução da latência para busca do primeiro filhote. Na prole verificou-se que: 3) Houve alteração no padrão de vocalização dos filhotes cujas mães foram expostas ao LPS no terceiro dia de lactação; 4) houve alteração no *burst* e fagocitose de enutrofilos no vigésimo primeiro dia de lactação após desafio com a endotoxina indicativo de maior resposta ao LPS. Concluiu-se que a exposição de ratos ao LPS facilita o comportamento maternal, mas promove alterações na sua prole relacionadas à interação entre mãe-filhote e aumento na resposta a um desafio imunológico.

Palavras-chave: Lipopolissacarídeo. Dopamina. Mãe-filhote. Comportamento maternal. Comportamento doentio.

## ABSTRACT

NASCIMENTO, A. F. **Immunological modulation of the mother-pup interaction.** [Modulação imunológica da relação mãe e filhote]. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Maternal behavior (MB) in mammals has specific characteristics. The time period just after parturition is particularly sensitive to physiological changes that can modulate the expression of this important behavior. Behavioral changes observed in sick animals, are considered as sick behavior (SB). Exposure to LPS, an endotoxin derived from the wall of a gram negative bacteria, during pregnancy might cause mental diseases. In order to investigate, a possible relationship between MB and SB, animals were treated with LPS. For the study of MB and maternal aggressive behavior, 40 rats were divided in 4 groups, 2 control and 2 experimental groups. The experimental group received 100µg/kg LPS by ip, and control group the vehicle of endotoxin, after 48 hours of LPS administration the observations of SB began. For choice these days, 20 virgin and 20 lactating rats were divided in 4 groups, 2 control and 2 experimental. They received ip 100µg/kg. Body weight, water and feed consumption, and body temperature were measured for 120h. Control females were observed in the same way, but they were treated with vehicle of LPS. The results showed that: 1) In 48 hours after the LPS treatment, virgin and lactating rats showed increased body temperature, loss of body weight, increased water consumption and decreased food consumption, 2) In 48 hours after the treatment with LPS, lactating rats showed reduced latency to retrieve the first pup to the nest. In the offspring of mothers treated with LPS it was found that: 3) Pups from mothers treated with LPS on the 5th day of lactation showed changes in the vocalization pattern; 4) Those pups showed changes in oxidative burst and phagocytosis on 21th day of lactation. It is concluded that exposure of rats to LPS promoted changes in the in the interaction between mother and pups.

Keywords: Lipopolysaccharide. Dopamine. Nucleus accumbens. Behavior maternal. Unhealthy behavior.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Temperatura corporal de ratas virgens lactantes. ....	39
Figura 2 -	Consumo de ração de ratas virgens. ....	40
Figura 3 -	Consumo de água de ratas virgens. ....	41
Figura 4 -	Peso de ratas virgens. ....	42
Figura 5 -	Temperatura corporal de ratas lactantes. ....	45
Figura 6 -	Consumo de ração de ratas lactantes. ....	46
Figura 7 -	Consumo de água de ratas lactantes. ....	47
Figura 8 -	Peso de ratas lactantes. ....	48
Figura 9 -	Locomoção de ratas lactantes. ....	51
Figura 10 -	Levantar de ratas lactantes. ....	52
Figura 11 -	Imobilidade de ratas lactantes. ....	53
Figura 12 -	Bolos fecais de ratas lactantes. ....	54
Figura 13 -	Latência para o primeiro ataque, tempo total de ataques e número de ataques de ratas lactantes. ....	58
Figura 14 -	Vocalização ultrassônica. ....	63
Figura 15 -	Locomoção de ratas lactantes. ....	66
Figura 16 -	Levantar de ratas lactantes. ....	67
Figura 17 -	Imobilidade de ratas lactantes. ....	68
Figura 18 -	Bolos fecais de ratas lactantes. ....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comportamento maternal em ratas lactantes.....	56
Tabela 2 - Contagem diferencial de leucócitos .....	61
Tabela 3 - <i>Burst</i> e Fagocitose de leucócitos .....	71

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1	COMPORTAMENTO MATERNAL (CM)	16
1.2	FEBRE E LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)	16
1.3	LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) E OS SISTEMAS NERVOSO E IMUNE	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>20</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>22</b>
3.1	ANIMAIS	22
3.2	PRODUTOS BIOLÓGICOS	23
3.3	CORANTES CELULARES	23
3.4	MEDICAMENTOS, REAGENTES E SOLUÇÕES	23
3.5	REAGENTES E ESTÍMULOS PARA ANÁLISE DO <i>BURST</i> OXIDATIVO	24
<b>3.5.1</b>	<b>Preparo das Soluções:</b>	<b>24</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Preparo dos Reagentes</b>	<b>25</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Preparo dos Estímulos</b>	<b>26</b>
3.6	O CITÔMETRO DE FLUXO	28
<b>4</b>	<b>PROCEDIMENTOS</b>	<b>29</b>
4.1	AValiaÇÃO DAS MÃES	29
<b>4.1.1</b>	<b>Avaliação do peso corporal, consumo de água e ração</b>	<b>29</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Avaliação da atividade geral em campo aberto</b>	<b>29</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Avaliação do CM em ratas lactantes</b>	<b>30</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Avaliação do comportamento agressivo maternal em ratas lactantes:</b>	<b>30</b>
4.2	COM A PROLE	31
<b>4.2.1</b>	<b>Atividade Geral Em Campo Aberto Em Filhotes</b>	<b>32</b>

4.2.2	Vocalização Ultrassônica .....	32
4.2.3	Análise Histopatológica.....	33
4.2.4	Contagem Diferencial De Leucócitos.....	33
4.2.5	Avaliação do <i>Burst</i> Oxidativo e da Fagocitose de Neutrófilos por Citometria de Fluxo na prole.....	33
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
6	DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS .....	37
6.1	EXPERIMENTO - 1.....	37
6.1.1	Delineamento experimental .....	37
6.1.2	Resultados .....	37
6.2	EXPERIMENTO - 2.....	43
6.2.1	Delineamento experimental .....	43
6.2.2	Resultados .....	43
6.3	EXPERIMENTO - 3.....	49
6.3.1	Delineamento experimental .....	49
6.3.2	Resultados .....	49
6.4	EXPERIMENTO - 4.....	55
6.4.1	Delineamento experimental .....	55
6.4.2	Resultados .....	55
6.5	EXPERIMENTO - 5.....	57
6.5.1	Delineamento experimental .....	57
6.5.2	Resultados .....	57
6.6	EXPERIMENTO – 6.....	59
6.6.1	Delineamento experimental .....	59
6.6.2	Resultados .....	59

6.7 EXPERIMENTO – 7 .....	60
<b>6.7.1 Delineamento experimental</b> .....	60
<b>6.7.2 Resultados</b> .....	60
6.8 EXPERIMENTO – 8 .....	62
<b>6.8.1 Delineamento experimental</b> .....	62
<b>6.8.2 Resultados</b> .....	62
6.9 EXPERIMENTO – 9 .....	64
<b>6.9.1 Delineamento experimental</b> .....	64
<b>6.9.2 Resultados</b> .....	64
6.10 EXPERIMENTO – 10 .....	70
<b>6.10.1 Delineamento experimental</b> .....	70
<b>6.10.2 Resultados</b> .....	70
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	72
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	83
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	84

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O COMPORTAMENTO MATERNAL (CM)

O CM consiste de uma série de cuidados que os membros adultos de uma determinada espécie realizam em torno dos indivíduos reprodutivamente imaturos, para auxiliar na propagação de sua espécie. O controle do CM envolve fatores neuroendócrinos e sensoriais. Os hormônios gestacionais preparam o animal para agir de forma maternal para com os filhotes enquanto que os neurotransmissores o regulam durante a fase de manutenção e lactação (ROSENBLATT; MAYER; SIEGEL, 1985; NUMAN, 1994; MATTSON; KLAPPER, 2001).

### 1.2 FEBRE E LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

A febre é definida como um estado de elevação da temperatura corporal, fazendo parte de uma complexa reação fisiológica de defesa dos organismos multicelulares contra a invasão de patógenos ou corpos estranhos (MACKOWIAK et al., 1980). O modelo de febre clássico e amplamente empregado envolve a utilização do lipopolissacarídeo (LPS), principal componente da parede celular de bactérias Gram-negativas. A administração sistêmica ou intracerebroventricular (icv) de LPS produz febre em espécies endotérmicas (como camundongos, ratos, coelhos, gatos, cães, macacos) e alterações comportamentais para promover aumento da temperatura corporal em ectotérmicos, por estimular a preferência por ambientes com temperatura mais elevada (FRAIFELD; KAPLANSKI, 1997).

### 1.3 LIPOPOLISSACARIDEO (LPS) E OS SISTEMAS NERVOSO E IMUNE

Segundo Alves e Palermo Neto (2007) o estudo das interações entre os sistemas imune (SI) e nervoso central (SNC) tem despertado o interesse de inúmeros grupos de pesquisa. Esse interesse e os dados dos trabalhos realizados acabaram por resultar na concepção de uma grande área de pesquisa conhecida como Psiconeuroimunologia ou Neuroimunomodulação. Esta área estuda os mecanismos através dos quais esses sistemas trocam informações, influenciando-se mutuamente, com evidentes implicações fisiológicas e patológicas.

Besendovisky e Del Rey (1991), também avaliaram as interações entre os sistemas nervoso e imune. Esses autores demonstraram que a imunização de animais com diferentes antígenos induzia mudanças neuroendócrinas e de atividade no SNC. Portanto, substâncias ou produtos originários de processos imune/inflamatórios teriam efeitos sobre a atividade do SNC.

Todas essas alterações seriam causadas ao organismo pelas citocinas liberadas no processo inflamatório e envolveriam uma série de sintomas que se enquadram e podem ser definidos como comportamento doentio (AVITSUR; WEIDENFIELD; YERMEYA, 1999).

O lipopolissacarídeo, ou LPS é um constituinte pertencente às paredes celulares de bactérias gram-negativas. Consiste num lipídio complexo, denominado lipídio A, ao qual está ligado um polissacarídeo constituído de um núcleo (ou core) e de uma série terminal de unidades repetidas. Ele é extremamente tóxico para animais, apresentando efeito em concentrações menores que 1 nM (ADEREM; ULEVITCH, 2000) sendo denominado endotoxina das bactérias gram-negativas, uma vez que está firmemente ligado à superfície celular, sendo liberado apenas quando as células são lisadas. Com a clivagem do LPS em lipídio A e polissacarídeo, demonstra-se que toda a toxicidade, decorrente da 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).

Segundo Kirsten (2008), quando o LPS entra em contato com o organismo, seja a partir de uma bactéria gram-negativa como a *Escherichia coli*, ou pela administração direta do LPS, inicia-se uma série de respostas no organismo infectado, podendo atuar em células como os monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas e células endoteliais, mas, sem dúvidas, os macrófagos são as principais estruturas onde o mecanismo de ação do LPS é deflagrado. Por

isso, pela liberação de citocinas, o LPS é usado já há muitos anos como ativador de resposta imune, principalmente na resposta imune inata, inespecífica, com os macrófagos. Normalmente, as citocinas atuam em nosso organismo a fim de combater diversos patógenos. No sistema imune ela atua no já descrito reconhecimento de partículas invasoras, bem como em respostas adaptativas ou reações homeostáticas (AVITSUR; WEIDENFIELD; YERMEYA, 1999; ADEREM; ULEVITCH, 2000).

Na função cerebral, as citocinas influenciam neurotransmissores centrais como noradrenalina, dopamina, serotonina, GABA, acetilcolina, neuropeptídeos, dentre outros. Atuam também na diferenciação e crescimento neuronal, e modificação da plasticidade sináptica (DUNN, 2006; HAVA et al., 2006). Ativam ainda, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) estimulando a liberação do fator liberador de corticotrofina do hipotálamo, e hormônio adrenocorticotrofina (ACTH) da hipófise, resultando em aumento de glicocorticóides na corrente sanguínea periférica. Podem também inibir o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, por bloquear a secreção de hormônios sexuais tais como o hormônio gonadotrófico, hormônio luteinizante, hormônio folículo estimulante e esteróides ovarianos, interferindo na modulação do comportamento reprodutivo (AVITSUR; WEIDENFIELD; YERMEYA, 1997; MEYER et al., 2005).

Segundo Kirsten (2008) já está também bastante estabelecido que processos inflamatórios e infecções bacterianas ou virais em gestantes levam a interferências no ambiente fetal, podendo resultar em diversos danos a prole. Assim, Shi et al. (2003) administraram o vírus influenza humano em camundongos fêmeas no 9,5º dia de gestação e analisaram posteriormente sua ninhada. Os filhotes apresentaram redução na interação social e hiperansiedade. Inicialmente, propôs-se que seria uma ação do vírus direta no cérebro. No entanto, não foi encontrado qualquer vestígio de RNA viral no cérebro destes indivíduos. Propôs-se então que as citocinas seriam responsáveis pelas modificações comportamentais. Esses estudos mostram que danos comportamentais permanentes e severos podem ser causados não só por problemas genéticos, drogas ingeridas durante a gestação e outros, mas também simplesmente por infecções bacterianas, as quais tantas mulheres grávidas são expostas constantemente.

O LPS em si não é capaz de chegar até o cérebro e ao feto, pois Ashdown et al. (2006) administraram LPS radioativo (<sup>125</sup>I-LPS) em ratas prenhes, e não detectaram o LPS nestes locais. Além disto, estes autores verificaram a indução de citocinas no plasma materno, fato

este que indica que o LPS age diretamente nas células placentárias para induzir a expressão desses mediadores inflamatórios.

Diversos estudos com administração de vários tipos de citocinas demonstram problemas gestacionais similares àqueles da administração do LPS (ROMERO et al., 2007). Os trabalhos envolvendo a gestação e citocinas são algumas vezes contraditórios. Aparentemente as citocinas atravessam a barreira placentária, porém em um estudo realizado em cultura, é mostrado que pouca quantidade de citocinas parece ser capaz de atravessar o âmnio, o córion e as decíduas intactas. Ainda não se sabe exatamente como as citocinas chegam até o feto. O mais provável é que novas citocinas sejam produzidas pelo próprio feto, quer seja a partir de algumas citocinas que conseguiram chegar até o feto, quer seja por algum outro processo de sinalização (URAKUBO et al., 2001; MEYER et al., 2005; LEVITON; DAMMANN; DURUM, 2005). A partir daí as citocinas no ambiente fetal vão interferir no equilíbrio dinâmico do indivíduo, chegando até seus cérebros e afetando seu desenvolvimento *in utero*, ativando o eixo HPA e causando comportamento doentio, mais ou menos similar ao que acontece com um indivíduo tratado diretamente com LPS (ASHDOWN et al., 2006).

O rato, diferentemente do ser humano, nasce imaturo sendo que sua primeira semana de vida representa os últimos estágios intrauterinos da vida de um bebê humano. Poucos trabalhos se preocuparam em examinar os efeitos da ativação do sistema imune neste período e suas consequências em períodos mais tardios da vida. Recentemente, Tenk, Kavaliers e Ossenkopp (2008) demonstraram que a ativação imune com LPS durante o período precoce pós-natal altera o dimorfismo sexual no comportamento exploratório na idade adulta, quando as proles femininas e masculinas são desafiadas com a mesma endotoxina, sendo um indício importante de diferenças sexuais na susceptibilidade a infecções.

Foi, pois o objetivo deste trabalho investigar os efeitos da administração do LPS durante a lactação nas ratas e em sua prole. Avaliou-se também estas respostas comportamentais frente a um novo desafio imune para melhor caracterizar possíveis diferenças na sensibilidade ao LPS. O período de tratamento para as mães foi no terceiro dia de lactação.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as adaptações comportamentais e neuroimunológicas no CM de ratas e de sua prole decorrentes de uma inflamação experimental produzida pelo LPS.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a influência da administração de LPS em ratas virgens na temperatura e peso corporal, bem como no consumo de água e ração.
- Investigar a influência da administração de LPS em ratas lactantes na temperatura, peso corporal, consumo de água e ração.
- Investigar a influência da administração de LPS em ratas lactantes na atividade geral em campo aberto tratadas no terceiro dia de lactação e observadas no quinto e nono dia de lactação.
- Investigar a influência da administração de LPS no Comportamento maternal de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação e observadas no quinto dia de lactação.
- Investigar a influência da administração de LPS no Comportamento maternal agressivo de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação e observadas no quinto dia de lactação.
- Investigar as possíveis alterações histopatológicas da prole das ratas lactantes tratadas com 100 µg/kg de LPS i.p 3<sup>o</sup> dia da lactação.

- Verificar se o tratamento de mães com 100 µg/kg de LPS i.p poderia alterar a contagem diferencial de leucócitos no PND5 da prole dos filhotes.
- Verificar se o tratamento de mães com 100 µg/kg de LPS i.p poderia alterar a vocalização Ultrassônica no PND5.
- Verificar se o tratamento de mães com 100 µg/kg de LPS i.p poderia alterar o *Burst* Oxidativo e a Fagocitose de Neutrófilos.
- Verificar se o tratamento de mães com 100 µg/kg de LPS i.p poderia alterar a atividade geral no PND21 da prole desafiadas com 50 µg/kg de LPS duas horas antes das observações.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos e fêmeas Wistar de mesma origem, obtidos por meio de cruzamentos sucessivos do biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ - USP. Todos os procedimentos foram submetidos à Comissão de Bioética da FMVZ e aprovados. Estes animais foram alojados em até quatro animais, em gaiolas de polipropileno medindo 32 X 38 X 16 cm com água e alimento *ad libidum* durante todo o procedimento experimental. Os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ), controlados por ar condicionado e sistema de exaustão e ciclo de 12 horas de claro e escuro, sendo a luz acesa às 7:00 horas. Inicialmente as ratas foram colocadas com machos (2 X 1) até a detecção da prenhez. Esta detecção da prenhez foi feita no começo da manhã (7:00 - 8:00 horas), por meio do lavado vaginal. Este procedimento consiste em introduzir uma pipeta plástica contendo salina (cloreto de sódio 0,9%) na vagina da rata, mas não muito profundamente para evitar a indução de pseudo-prenhez, colhendo a secreção vaginal. Logo após esta etapa, o conteúdo líquido da pipeta foi colocado em uma lâmina de vidro e observado ao microscópio óptico procurando por espermatozóides junto ao material biológico da fêmea. Quando constatada a presença de espermatozóides, foi considerado como dia de prenhez (GD) 0 daquela fêmea. Esses animais foram então separados aleatoriamente como pertencentes ao grupo controle e experimental, acondicionados individualmente em gaiolas moradia, e ali permanecerão durante toda a gestação. Depois da etapa de acasalamento os machos foram descartados. Ao nascimento da prole foi feita a padronização das ninhadas em 8 filhotes por fêmea, sendo na medida do possível 4 fêmeas e 4 machos. O período de amamentação foi de 21 dias. Após o nascimento das proles as fêmeas lactantes foram empregadas para avaliação do comportamento maternal, maternal agressivo, medida de atividade geral em campo aberto e avaliação da temperatura, peso corporal, consumo de água e ração. As proles dessas fêmeas foram utilizadas para avaliação histológica, avaliação do peso, e da medida da atividade celular.

### 3.2 PRODUTOS BIOLÓGICOS

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

### 3.3 CORANTES CELULARES

Utilizado para corar as lamínas na contagem diferencial de leucócitos

- ✓ ROSENFELD (Merck®)

### 3.4 MEDICAMENTOS, REAGENTES E SOLUÇÕES

- ✓ Solução salina: solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) estéril a 0,9%.
- ✓ Solução de LPS: solução na concentração de 50,100 OU 200 mg / ml de LPS em solução aquosa de NaCl estéril a 0,9%.
- ✓ Diacetato 2',7'-Diclorofluoresceína (DCFH-DA/ Molecular Probes, Eugene, OR)- empregado na citometria de fluxo. Este reagente foi mantido congelado (-20° C), e protegido da luz, sendo dissolvido em PBS no momento de uso;
- ✓ EDTA (Sigma®)- utilizado na técnica de fagocitose, na concentração de 3 mM, com o objetivo de interromper a reação após o período de incubação das amostras;
- ✓ Heparina (Liquemine®-Roche)- utilizado para evitar a coagulação das amostras de sangue após a coleta;

- ✓ Iodeto de Propídio (PI) (Sigma®)- utilizado na técnica de citometria de fluxo, responsável pela emissão de fluorescência vermelha das amostras captadas pelo citômetro;
- ✓ NaCl 0,2% e 1,6%- Soluções utilizadas com o objetivo de romper as hemácias presentes nas amostras;
- ✓ NaCl 0,85% e NaCl 0,9% - Soluções utilizadas na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus*;
- ✓ PBS (Phosphate-buffered saline, pH=7,2-7,4)-Solução utilizada nas técnicas de *burst* oxidativo e fagocitose;
- ✓ PBS glicosado - Solução utilizada na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus*;
- ✓ PMA - Miristato-acetato de forbol-(Calbiochem®)- utilizado como estímulo para desencadear o *burst* oxidativo de macrófagos e neutrófilos.

### 3.5 REAGENTES E ESTÍMULOS PARA ANÁLISE DO *BURST* OXIDATIVO

Preparado das soluções, dos reagentes e do estímulo do *Burst* oxidativo.

#### 3.5.1 Preparo das Soluções

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

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

PBS 1x:

No momento do uso, dilui-se 100 ml da solução estoque 10x concentrada e completa-se com H<sub>2</sub>O destilada para um volume de 1000 ml.

PBS glicosado:

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

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

Pesa-se 2g, 8,5g, 9g e 16g respectivamente de NaCl e completa-se cada solução com 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada.

### 3.5.2 Preparo dos Reagentes:

DCFH-DA 25 mM-Soluções Estoque

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

### Solução de DCFH-DA

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

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

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

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

E assim por diante...

### Solução de EDTA 3mM

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

### 3.5.3 Preparo dos Estímulos:

#### Solução de PMA

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

### Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923-SAPI

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

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

- ✓ cultivar bactérias viáveis em ágar sangue por 48 horas;
- ✓ colocar as colônias de bactérias em tubos de ensaio estéreis, em um fluxo laminar próprio para bactérias;
- ✓ ressuspendê-las em NaCl 0,85% e centrifugá-las por 10 minutos a 2500 rpm;
- ✓ “inativar” as bactérias a 60°C por 30 minutos;
- ✓ lavar 3 x com NaCl 0,85% e após cada lavada, centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm;
- ✓ ajustar a concentração das bactérias de modo tal que sua leitura no espectrofotômetro (Uv/Visível) a uma absorvância de 620 nm tenha um valor que varie entre 2.4 a 2.7. Estes valores, nesta absorvância, são aqueles em que as bactérias, em suspensão, apresentam uma turbidez que corresponde ao n° 8 escala de Mc.Farland. Para a leitura no citômetro é necessário que as bactérias estejam nestas concentrações.
- ✓ preparar uma solução de iodeto de propídio a 5 %;
- ✓ centrifugar nas mesmas condições, desprezar o sobrenadante e adicionar 25 µl da solução de iodeto de propídio a 5%;
- ✓ incubar a temperatura ambiente por 30 minutos, no escuro; lavar a suspensão de bactéria marcada mais 3x com NaCl 0,85% e centrifugando após cada lavagem por 10 minutos a 2500 rpm;
- ✓ ressuspender a bactéria em 5 ml de PBS glicosado (livre de Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup>);
- ✓ “aliquotar” em eppendorfs de 2 ml, proteger da luz e congelar ‘a -80°C;
- ✓ descongelar imediatamente antes do uso.

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

### 3.6 O CITÔMETRO DE FLUXO

Foi utilizado um citômetro de fluxo (FACScalibur Becton Dickinson Immunocytometry Sistem, San Jose, Ca, USA) conectado com um computador (Macintosh Apple, CA, USA). Foram analisados 10.000 eventos utilizando-se o software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA).

As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades *FSC* – *Forward Scatter* e *SSC side Scatter* do aparelho que avaliam o tamanho e a complexidade interna, dos mesmos respectivamente. A fluorescência verde do DCFH será mensurada a  $530\pm 30$  nm (detector FL1) sendo aquela de cor vermelha do *S. aureus* marcado com o iodeto de propídeo mensurada a  $585\pm 42$  nm. A fluorescência verde emitida pelo DCFH será usada para estimar o *burst* oxidativo das células analisadas em diferentes situações de estimulação. A fagocitose foi estimada pela intensidade média de fluorescência/célula emitida pelo PI. A porcentagem de fagocitose (porcentagem de neutrófilos que fagocitaram as bactérias) foi calculada através do número de neutrófilos e macrófagos fluorescentes divididos pelo número total destas células e multiplicado por 100. As fluorescências do PI e do DCFH foram analisadas utilizando-se compensação de fluorescências para corrigir quaisquer interferências de sinais emitidos pelos mesmos. Através do Cell Quest Pro<sup>®</sup> foram analisadas as populações de interesse em cada experimento (neutrófilos), excluindo-se as populações de linfócitos e monócitos por meio da análise dos *gates*. Além disso, para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo *branco* usado como controle de refringência basal da célula a ser analisada.

## **4 PROCEDIMENTOS**

### **4.1 AVALIAÇÃO DAS MÃES**

Avaliações realizadas com as mães.

#### **4.1.1 Avaliação peso corporal, consumo de água e ração.**

Foram avaliados a temperatura, o peso corporal, o consumo de água e ração das fêmeas lactantes, de duas horas até cento e vinte horas após a administração da endotoxina. Para avaliação da temperatura corporal foi utilizado um termômetro clínico digital de ouvido, onde todos os dias por volta das 10hs da manhã foram aferidos e anotados as temperaturas de cada animal, foram avaliadas também o consumo de água e ração e peso, onde durante os cinco dias por volta do mesmo horário foram medidas e pesadas as quantidades de água, ração ingerido e o peso de cada animal.

#### **4.1.2 Avaliação da atividade geral em campo aberto**

A atividade geral de fêmeas lactantes foi observada em campo aberto. Neste teste os animais foram colocados em um campo aberto sempre durante um mesmo período do dia. Cada animal foi colocado individualmente no centro do aparelho de campo aberto, sendo observado por 3 minutos. O fundo deste aparelho é dividido em vinte e cinco partes aproximadamente iguais. Entre um animal e outro, o aparelho foi limpo com solução de álcool a 5% para evitar-se a interferência do odor do animal anterior. Foram observados a frequência de locomoção, de levantar e a defecação por meio do número de bolos fecais. Definiu-se como unidade de locomoção o ato de o animal penetrar com as quatro patas em uma das divisões do chão da arena; unidade de levantar corresponde à postura de o animal

permanecer apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima, podendo ou não tocar com as patas dianteiras as paredes do campo aberto; cada bolo de fezes produzido pelo animal durante o período de teste foi registrado como unidade de defecação. O registro da frequência dos parâmetros foi feito por intermédio de um contador manual. O tempo de imobilidade, também chamado de *freezing* também foi medido, sendo este definido quando o animal não apresenta locomoção e movimentos de farejar. Este parâmetro foi medido com o auxílio de um cronômetro.

#### **4.1.3 Avaliação do CM em ratas lactantes.**

O teste comportamental foi realizado no quinto dia da lactação com grupos de 10 animais/grupo. Inicialmente foi anotada a posição dos filhotes e da mãe na gaiola moradia, aproximadamente às 8hs. De acordo com a apresentação foi classificado com a presença ou ausência de formação do ninho na gaiola moradia. Logo após, a ninhada foi retirada da gaiola, sendo colocada em outra gaiola sem maravalha e permaneceu por 1 hora. Os filhotes foram colocados na gaiola divididos em quadrantes e o comportamento materno foi observado por 60 minutos. A observação do comportamento materno foi realizada medindo-se: 1) latência (s) para busca do primeiro e do último filhote (REC); latência (s) para carregar o primeiro e o último filhote; tempo entre carregar o primeiro e o último filhote; número de filhotes no ninho; comportamento maternal total (CMT), o que significa ficar em posição de amamentação sobre o filhote por pelo menos 2 minutos consecutivos. As ratas que não apresentaram o comportamento maternal durante os 10 primeiros minutos do teste foram retiradas do experimento, da mesma forma que as mães que tiveram menos de 8 filhotes (4 fêmeas e 4 machos) por ninhada.

#### **4.1.4 Avaliação do comportamento agressivo maternal em ratas lactantes:**

O teste de comportamento agressivo maternal foi usado para avaliar o comportamento de defesa da mãe frente a um intruso. Para tanto, um intruso macho de menor peso corporal

que a fêmea foi colocado na caixa na presença da mãe e seus filhotes entre as 13h00 e 15h00, por 10 minutos. O teste foi realizado logo após a observação do comportamento maternal e gravado por uma câmera digital. Posteriormente, os comportamentos ofensivos, defensivos, exploratórios e maternais foram analisados em vídeo pelo pesquisador. Após os 10 minutos de teste o rato intruso foi devolvido a gaiola de origem e recolocado no biotério, juntamente com a gaiola da mãe e seus filhotes (NEUMANN *et al.*, 2005).

Os seguintes parâmetros maternais foram avaliados:

- ✓ A latência para buscar do primeiro e último filhote, que foram distribuídos pelos 3 cantos opostos à área do ninho;
- ✓ A latência para carregar o primeiro e o último filhote;
- ✓ Tempo entre carregar o primeiro e o último filhote;
- ✓ Numero de filhotes no ninho em porcentagem;
- ✓ O CM total (CMT), que significa apresentar a postura de aleitamento sobre os filhotes por 3 minutos consecutivos em porcentagem.

## 4.2 COM A PROLE

Procedimentos realizados com a prole.

#### **4.2.1 Atividade Geral em Campo Aberto em Filhotes**

A atividade geral dos filhotes foi observada em campo aberto. Os filhotes foram colocados em um campo aberto sempre durante um mesmo período do dia. Cada animal escolhido foi colocado individualmente no centro do aparelho de campo aberto, sendo observado por 3 minutos. O campo aberto para filhotes de ratos foi construído segundo o modelo descrito por Broadhurst (1960), e adaptado para filhotes de ratos e para camundongos, e consiste de uma arena de madeira, medindo 40 cm de diâmetro x 40 cm de altura, pintada de branco. O fundo deste aparelho é dividido em vinte e cinco partes aproximadamente iguais. Entre um animal e outro, o aparelho é limpo com solução de álcool a 5% para evitar-se a interferência do odor do animal anterior. Observou-se a frequência de locomoção, de levantar e a defecação foi avaliada por meio da contagem do número de bolos fecais. Foi definido como unidade de locomoção o ato de o animal penetrar com as quatro patas em uma das divisões do chão da arena; unidade de levantar corresponde à postura de o animal permanecer apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima, podendo ou não ter tocar com as patas dianteiras as paredes do campo aberto; cada bolo de fezes produzido pelo animal durante o período de teste foi registrado como unidade de defecação. O registro da frequência dos parâmetros foi feito por intermédio de um contador manual. O tempo de imobilidade também foi medido sendo que a imobilidade é definida quando o animal não apresenta locomoção e sem movimentos de farejar. Este parâmetro foi medido com o auxílio de um cronômetro.

#### **4.2.2 Vocalização Ultrassônica**

Neste teste um filhote de cada grupo foi colocado em uma gaiola pequena de polipropileno, gaiola de camundongo (30X20X13cm), foi levado para a sala de teste. A qual fica isolada, longe dos outros animais, para não ouvir vocalizações. Imediatamente após a colocação do animal na gaiola, a vocalização começou a ser gravada. O teste durou cinco minutos. Este teste foi feito no período da manhã. Das 9h30 às 10h30 os animais foram

mantidos em sala com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ). A distância do microfone ao chão da caixa foi de 10 cm e a frequência ultrassônica foi de 40KHz. Foram medidos os seguintes parâmetros: Latência para a primeira vocalização e número de vocalizações em 5 minutos.

#### **4.2.3 Análise Histopatológica**

Foram empregados um filhote de cada grupo, o quais foram sacrificados em câmara  $\text{CO}_2$ . Em seguida foram feitos cortes sagitais, e decapitação. Estes fragmentos foram fixados em formol a 10% durante 48 horas, após este período esta solução foi substituída por álcool 70% permanecendo no mesmo por 24 horas. Após o período de fixação foram processados para inclusão em parafina e coloração pela hematoxilina–eosina (H.E) para observação de possíveis alterações inflamatórias a microscopia óptica.

#### **4.2.4 Contagem Diferencial de Leucócitos**

Utilizou-seum filhote de cada grupo. A coleta de sangue foi realizada por decapitação desses filhotes, logo após o sacrifício em câmara  $\text{CO}_2$ . A contagem de diferencial de leucócitos foi determinada por meio da contagem global dessas células com extensão sanguínea coradas por May-Grunwald modificado por Rosenfeld. A contagem diferencial informou as quantidades relativas dos diferentes tipos de leucócitos no sangue periférico.

#### **4.2.5 Avaliação do *Burst* Oxidativo e da Fagocitose de Neutrófilos por Citometria de Fluxo na prole**

As células utilizadas para o estudo no citômetro de fluxo foram coletadas imediatamente após a eutanásia dos animais em câmara de  $\text{CO}_2$ . O sangue foi coletado através da veia porta hepática das ratas, com auxílio de seringas e agulhas previamente

umedecidas em solução aquosa de etilenodiamino-tetracética-dissódica (EDTA) a 10%, sendo colocadas imediatamente em banho de gelo. Foram usadas amostras sanguíneas de 100 µl para a análise da atividade fagocítica.

O preparo das amostras foi realizado de acordo com (HASUI; HIRABAYASHI; KOBAYASHI, 1989), da seguinte maneira:

Uma bateria de 5 tubos foram, montada e numerada de “A” até “E” para cada animal. Cada tubo (de acordo com a letra) receberam uma substância diferente, obedecendo-se sempre a uma mesma ordem.

Desta forma, todos os tubos de “A” a “E” receberam alíquotas, que correspondem a  $2 \times 10^5$  cel/100µl de sangue. Os tubos com as letras “B”, “D” e “E” receberam 200µl da solução de DCFH-DA 3 mM cada. Todos os tubos de letra “C” e “D” receberam 100µl da solução de SAPI (100ng). Os tubos de letra “E”, por sua vez, receberam 100µl de PMA (100ng).

Como as amostras deveram ter o volume final de 1100 µl, todos os tubos serem completados com PBS 1x. Sendo assim, todos os tubos “A” receberam 1000 µl de PBS, os tubos “B” 800 µl, os “C” 900 µl e finalmente os tubos “D” e “E” receberão 700 µl.

Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria sob agitação a 37°C por 30 minutos. Depois da incubação, foram adicionados 2 ml de EDTA 3 mM em todos os tubos para interromper a reação, sendo os mesmos centrifugados posteriormente a 1200 rpm por 10 minutos.

Assim, foi desprezado o sobrenadante após a centrifugação; as células foram, então, ressuspensas por agitação manual, realizando-se a seguir a lise hipotônica das amostras com soluções de NaCl a 0,2% e 1,6%. Primeiramente, foi colocado em cada tubo 2 ml de NaCl 0,2% durante 20 segundos. Imediatamente após este período, foi colocado mais 2 ml de NaCl 1,6% para tornar a solução isotônica novamente. Após centrifugação foram realizadas novas lises hipotônica (uma segunda vez) com NaCl 0,2% e após, com NaCl 1,6%, seguindo-se todo o procedimento descrito acima. Após esta segunda lise, os tubos foram centrifugados pela última vez sendo os sobrenadantes desprezados; as células resultantes foram ressuspensas em 1 ml de EDTA gelado.

Após todo este procedimento, foi realizada a leitura das amostras no citômetro de fluxo; os tubos “A”, “C” e “D” serão utilizados para a avaliação da Fagocitose, enquanto que os tubos “B” e “E” foram utilizados na avaliação do *Burst* Oxidativo.

Cada amostra passara pelo citômetro apenas 1 vez, e de cada uma, foram adquiridos 10.000 eventos (células). A fluorescência foi obtida padronizando-se o número de eventos para cada tubo A, B, C, D e E. Os valores referentes ao *Burst* oxidativo das amostras foram avaliados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pela população de neutrófilos. Este valor de média geométrica foi fornecido pelo aparelho sendo utilizado para indicar a intensidade de fluorescência das células.

Com relação à atividade fagocítica, foi verificado a porcentagem de fagocitose, ou seja, o número de neutrófilos que fagocitaram o *LPS* marcado com PI e, conseqüentemente que emitam fluorescência verde, divididos pelo número total destas células multiplicadas por 100.

Foi avaliada, também, a intensidade de fagocitose (quantidade de bactérias fagocitadas) por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência vermelha emitida pelos neutrófilos.

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICAS

Empregou-se o teste t de Student para comparação de dados de 2 grupos. A ANOVA de 2 vias foi utilizada para análise de dados de várias observações, levando-se em conta os dias e tratamentos. Quando a ANOVA detectou diferenças, o teste de Bonferroni foi usado para análises *post hoc*. As porcentagens obtidas da análise destes comportamentos foram analisadas pelo teste do qui quadrado. O limite de significância foi estabelecido como 5%.

## 6 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS

### 6.1 EXPERIMENTOS – 1

Avaliação da temperatura e peso corporal bem como do consumo de água e ração de ratas virgens tratadas com 100µg/Kg de LPS por via i.p.

#### 6.1.1 Delineamento experimental

Foram empregadas 20 (vinte) ratas virgens divididas em dois grupos: um controle e outro experimental, com 10 (dez) animais cada. Os animais do grupo experimental receberam 100µg/Kg , i.p. e aquelas do grupo controle, o veículo do LPS pela mesma via.

Foram avaliados a temperatura, peso corporal, o consumo de água e ração, por duas horas e por cento e vinte horas após a administração da endotoxina.

#### 6.1.2 Resultados

A figura 1 ilustra a temperatura corporal de ratas virgens tratadas com 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p. e observadas por 120 horas. A Anova de 2 vias indicou a existência de diferença com relação ao tratamento [ $F^{1/3} = 3,22$ ,  $P = 0,075$ ] e não entre os dias de observação [ $F^{1/3} = 3,62$ ,  $P = 0,002$ ], havendo interação entre os fatores [ $F^{1/3} = 7,43$ ,  $P = < 0,0001$ ]. O teste de Bonferroni mostrou que às duas horas, a temperatura das ratas do grupo experimental foi significativamente menor que daqueles do grupo controle. Por outro lado, nestas ratas ocorre aumento significativo da temperatura à 48 e 72 horas comparadas àquelas do grupo controle.

A figura 2 ilustra o consumo de ração de ratas virgens tratadas com 100µg/Kg de LPS ou solução salina à 0,9% administradas por via i.p. e observadas por 120 horas. A Anova de 2

vias indicou a existência de diferenças com relação ao tratamento [ $F_{1/3} = 13,39$ ,  $P = 0,0004$ ] e dias de observação [ $F_{1/3} = 41,05$ ,  $P < 0,0001$ ] havendo interação entre os fatores [ $F_{1/3} = 3,25$ ,  $P = 0,0053$ ]. O teste de Bonferroni mostrou que às vinte e quatro horas, o consumo de ração das ratas do grupo experimental foi significativamente menor que daqueles do grupo controle.

A figura 3 ilustra o consumo de água de ratas virgens tratadas com  $100\mu\text{g/Kg}$  de LPS ou solução salina à 0,9% administradas por via i.p e observadas por 120 horas. A Anova de 2 vias indicou a existência de diferença com relação ao tratamento [ $F_{1/3} = 2,37$ ,  $P = 0,126$ ] e não entre os dias de observação [ $F_{1/3} = 88,13$ ,  $P < 0,0001$ ] havendo interação entre os fatores [ $F_{1/3} = 9,14$ ,  $P < 0,001$ ]. O teste de Bonferroni mostrou que as quarenta oito horas, o consumo de água das ratas do grupo experimental foi significativamente maior que daqueles do grupo controle.

A figura 4 ilustra o peso de ratas virgens tratadas com  $100\mu\text{g/Kg}$  de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p e observadas por 120 horas. A Anova de 2 vias indicou diferença com relação ao tratamento [ $F_{1/3} = 0,20$ ,  $P = 0,66$ ] e não indicou diferença nos dias de observação [ $F_{1/3} = 1,81$ ,  $P = 0,10$ ] havendo interação entre os fatores [ $F_{1/3} = 0,10$ ,  $P = 0,99$ ]. O teste de Bonferroni mostrou que às quarenta e oito horas, o peso das ratas do grupo experimental foi significativamente menor que daqueles do grupo controle.

Figura 1 - Temperatura corporal de ratas virgens que receberam 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p. observadas duas horas após o tratamento e por mais 5 dias. \* P< 0.05 em relação aos animais do grupo controle. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni

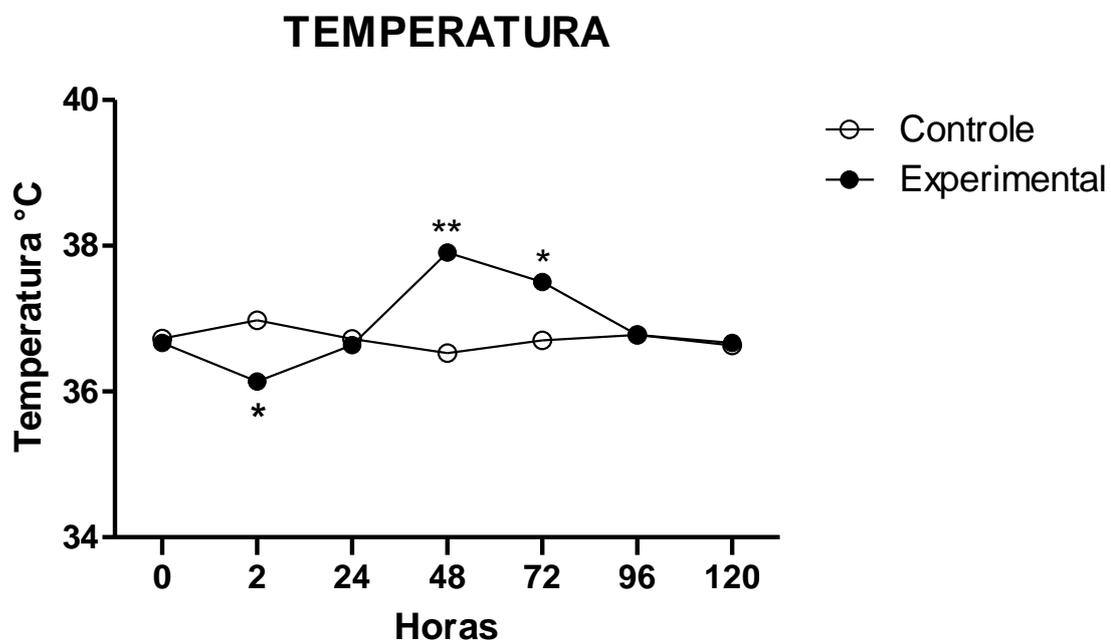


Figura 2 - Consumo de ração de ratas virgens que receberam 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p observadas duas horas após o tratamento e por mais 5 dias. \* P< 0.05 em relação aos animais do grupo controle. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni

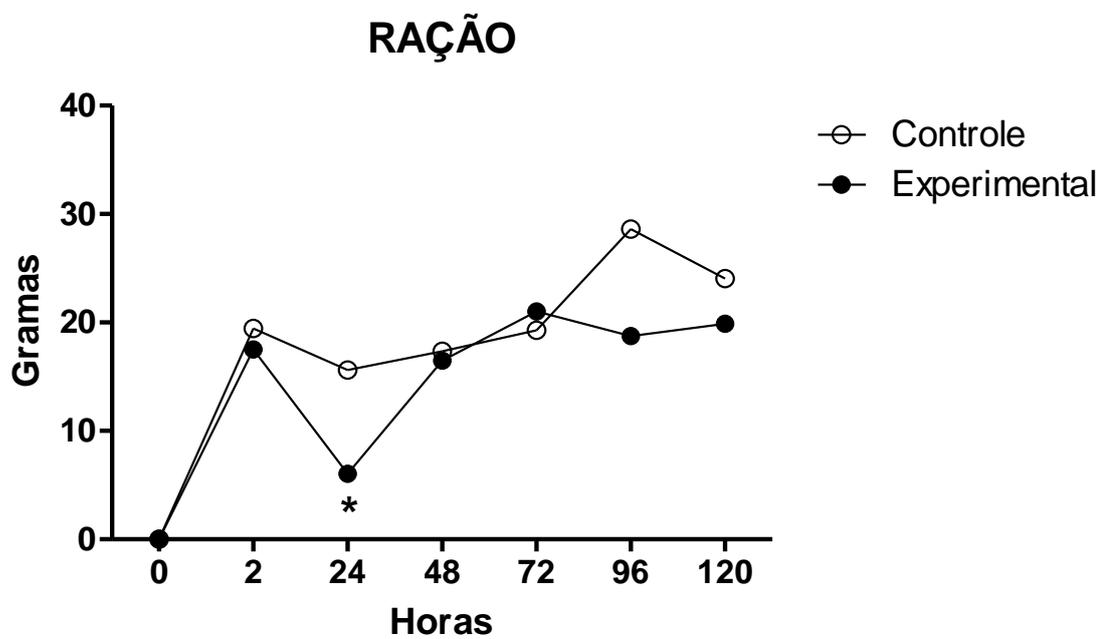


Figura 3 - Consumo de água de ratas virgens que receberam 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p e observadas duas horas após o tratamento e por mais 5 dias. \* P< 0.05 em relação aos animais do grupo controle. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni

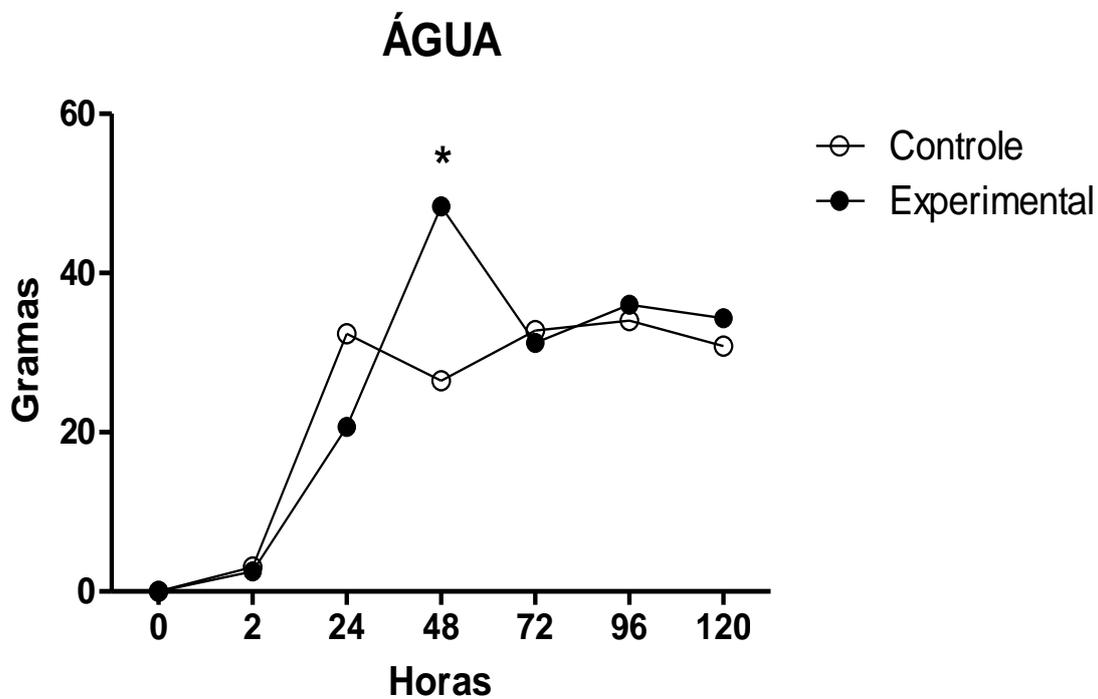
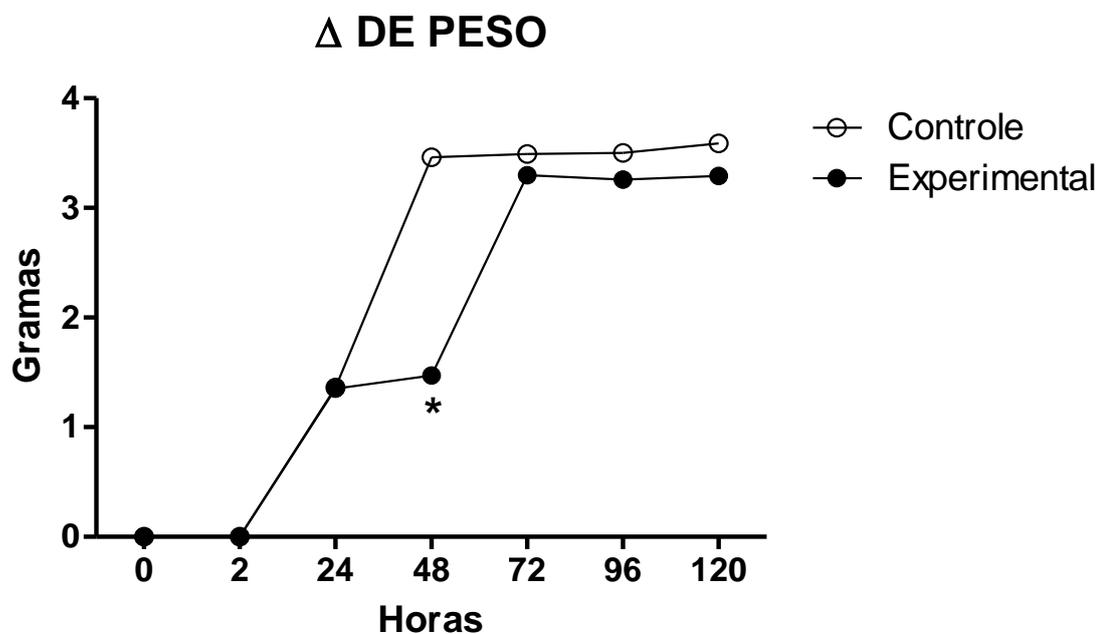


Figura 4 - Delta do peso de ratas virgens que receberam 100 $\mu$ g/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p e observadas duas horas após o tratamento e por mais 5 dias. \* P< 0.05 em relação aos animais do grupo controle. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni



## 6.2 EXPERIMENTO – 2

Avaliação da temperatura e peso corporal bem como do consumo de água e ração de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação com 100µg/Kg de LPS por via i.p.

### 6.2.1 Delineamento experimental

Foram empregadas 20 (vinte) ratas lactantes divididas em dois grupos: um controle e outro experimental, com 10 (dez) animais cada. Os animais do grupo experimental receberam no terceiro dia de lactação 100µg/Kg, i.p. e aquelas do grupo controle, o veículo do LPS pela mesma via.

Foram avaliados a temperatura, peso corporal, o consumo de água e ração, por duas horas e por cento e vinte horas após a administração da endotoxina.

### 6.2.2 Resultado

A figura 5 ilustra a temperatura corporal de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação com 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p. e observadas por 120 horas. A Anova de 2 vias indicou a existência de diferença com relação ao tratamento [ $F_{1/3} = 241,95$ ,  $P = < 0,0001$ ], entre os dias de observação [ $F_{1/3} = 100,65$ ,  $P < 0,0001$ ], havendo interação entre os fatores [ $F_{1/3} = 49,66$ ,  $P = < 0,0001$ ]. O teste de Bonferroni mostrou que a temperatura das ratas do grupo experimental teve um aumento significativo de temperatura as 24 e 48 horas comparadas àquelas do grupo controle.

A figura 6 ilustra o consumo de ração de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação com 100µg/Kg de LPS ou solução salina à 0,9% administradas por via i.p. e observadas por 120 horas. A Anova de 2 vias indicou a existência de diferenças com relação ao tratamento [ $F_{1/3} = 50,10$ ,  $P = < 0,0001$ ] e dias de observação [ $F_{1/3} = 464,23$ ,  $P < 0,0001$ ] havendo interação entre os fatores [ $F_{1/3} = 9,59$ ,  $P = < 0,0001$ ]. O teste de Bonferroni mostrou

que às 48 horas, o consumo de ração das ratas do grupo experimental foi significativamente menor que daqueles do grupo controle.

A figura 7 ilustra o consumo de água de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação com 100µg/Kg de LPS ou solução salina à 0,9% administradas por via i.p e observadas por 120 horas. A Anova de 2 vias indicou a existência de diferença com relação ao tratamento [ $F_{1/3} = 0,77$ ,  $P = 0,3814$ ], entre os dias de observação [ $F_{1/3} = 227,14$   $P < 0,0001$ ] havendo interação entre os fatores [ $F_{1/3} = 227,14$ ,  $P < 0,001$ ]. O teste de Bonferroni mostrou que as 48 horas, o consumo de água das ratas do grupo experimental foi significativamente maior que daqueles do grupo controle.

A figura 8 ilustra o peso de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação com 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p e observadas por 120 horas. A Anova de 2 vias não indicou diferença com relação ao tratamento [ $F_{1/3} = 0,56$ ,  $P = 0,4549$ ], indicou diferença nos dias de observação [ $F_{1/3} = 93,35$   $P < 0,0001$ ] não havendo interação entre os fatores [ $F_{1/3} = 1,78$ ,  $P = 0,1087$ ]. O teste de Bonferroni mostrou que às quarenta e oito horas, o peso das ratas do grupo experimental foi significativamente menor que daqueles do grupo controle.

Figura 5 - Temperatura de ratas lactantes que receberam 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS ou solução salina a 0,9% administrada por via i.p no 3.º dia de lactação, observadas duas horas após o tratamento e por mais 5 dias. \* $P < 0.05$  em relação aos animais do grupo controle. ANOVA de duas via seguida pelo teste de Bonferroni

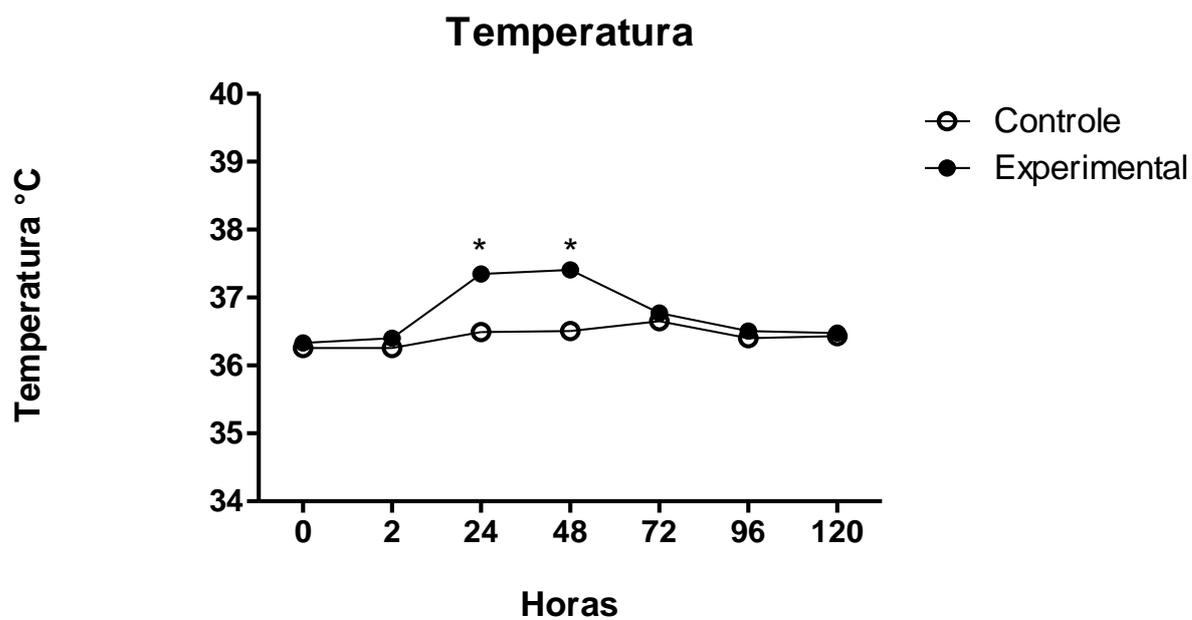


Figura 6 - Consumo de ração de ratas lactantes que receberam 100 µg/kg de LPS ou solução salina a 0,9% administrada por via i.p no 3.º dia de lactação, observadas duas horas após o tratamento e por mais 5 dias. \*P< 0.05 em relação aos animais do grupo controle. ANOVA de duas via seguida pelo teste de Bonferroni

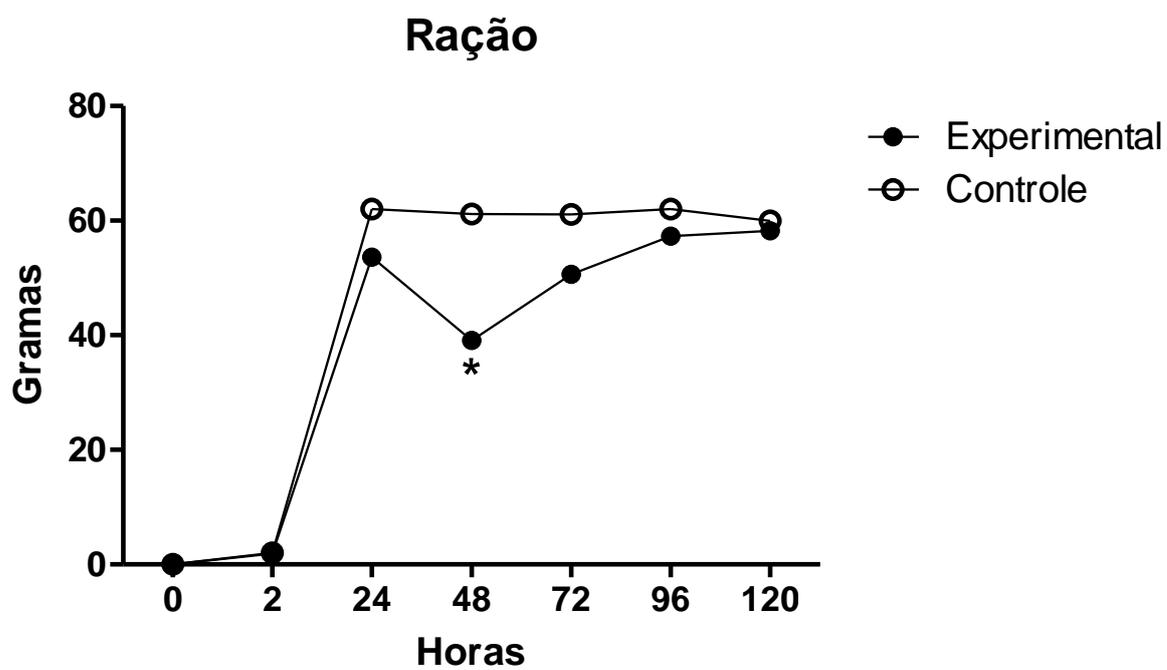


Figura 7 - Consumo de ração de ratas lactantes que receberam 100 µg/kg de LPS ou solução salina a 0,9% administrada por via i.p no 3.º dia de lactação, observadas duas horas após o tratamento e por mais 5 dias. \*P< 0.05 em relação aos animais do grupo controle. ANOVA de duas via seguida pelo teste de Bonferroni

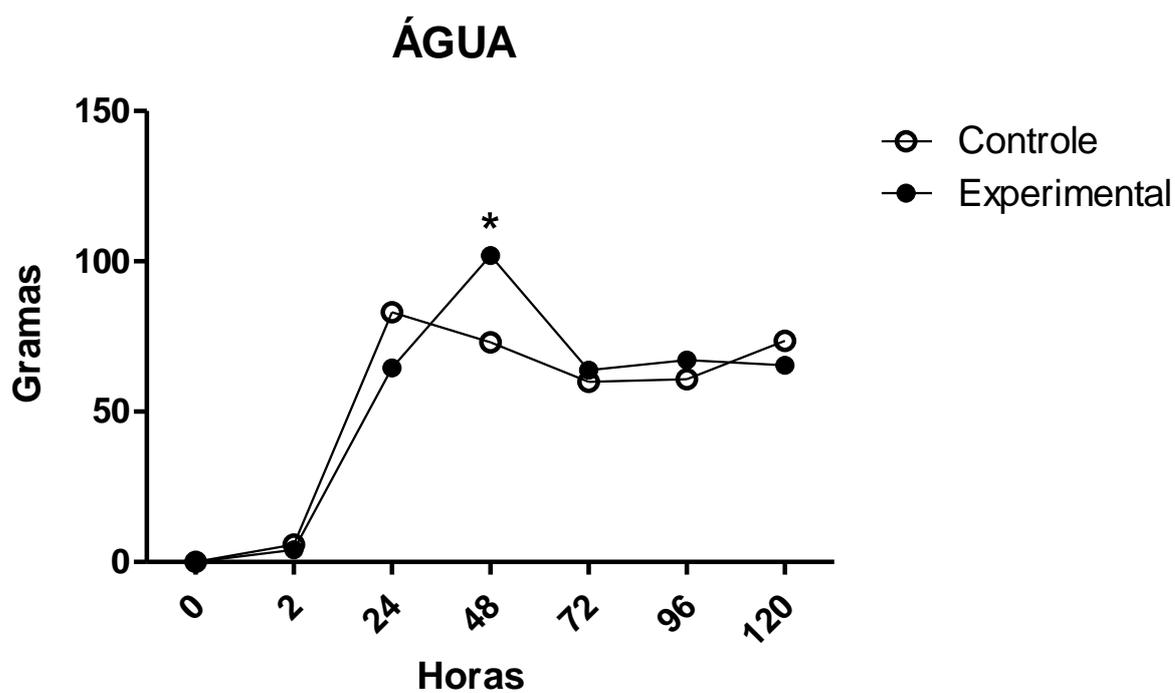
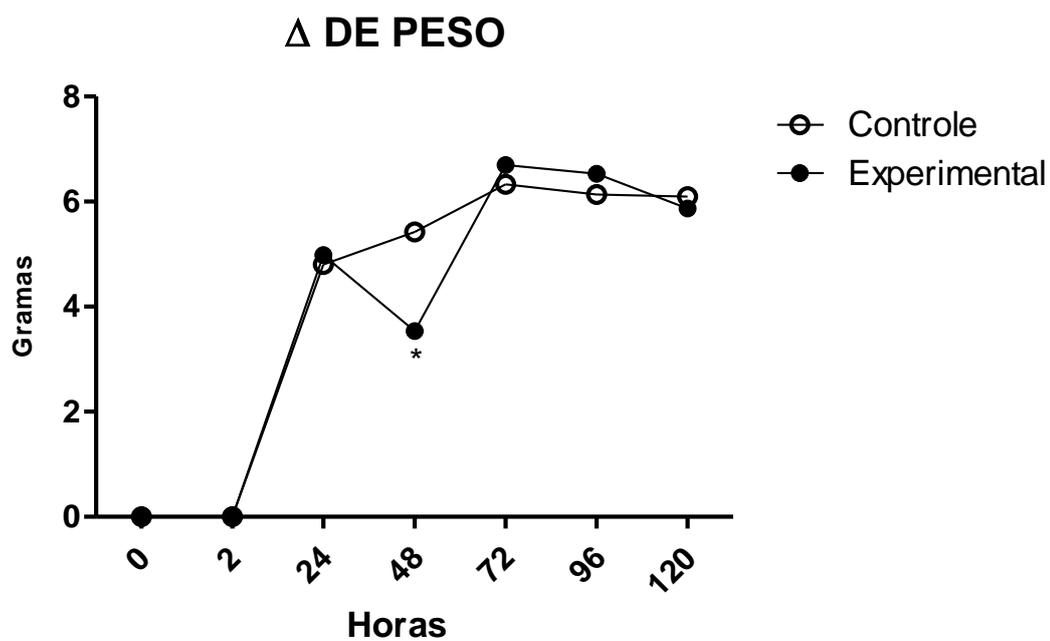


Figura 8 - Peso de ratas lactantes que receberam 100 µg/kg de LPS ou solução salina a 0,9% administrada por via i.p no 3.º dia de lactação, observadas duas horas após o tratamento e por mais 5 dias. \*P< 0.05 em relação aos animais do grupo controle. ANOVA de duas via seguida pelo teste de Bonferroni



### 6.3 EXPERIMENTO – 3

Atividade geral em campo aberto de ratas lactantes que receberam 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p no terceiro dia da lactação e observadas no quinto e nono dia após o tratamento.

#### 6.3.1 Delineamento experimental

Foram empregadas 20 (vinte) fêmeas lactantes divididas em 2 (dois) grupos: um controle e outro experimental, com 10 (dez) animais cada. As fêmeas do grupo experimental receberam no terceiro dia de lactação 100µg/Kg de LPS, i.p. e aquelas do grupo controle, o veiculo do LPS pela mesma via. Essas fêmeas foram avaliadas no quinto e no nono dia de lactação após o tratamento para medida de sua atividade geral em campo aberto (entre 13 e 17 horas).

#### 6.3.2 Resultados

A figura 5 ilustra a frequência de locomoção de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação com 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p. A Anova de 2 vias não indicou diferença com relação ao tratamento [ $F_{1/3} = 0,36$ ,  $P = 0,555$ ] e dias de observação [ $F_{1/3} = 2,32$ ,  $P = 0,139$ ] não havendo interação entre os fatores [ $F_{1/3} = 2,47$ ,  $P = 0,0,125$ ]. O teste de Bonferroni não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

A figura 6 ilustra a frequência de levantar de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação com 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p. A Anova de 2 vias não indicou diferença com relação ao tratamento [ $F_{1/3} = 2,94$ ,  $P = 0,095$ ] e dias de observação [ $F_{1/3} = 2,29$ ,  $P = 0,139$ ] não havendo interação entre os fatores [ $F_{1/3} = 3,17$ ,  $P = 0,08$ ]. O teste de Bonferroni não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

A figura 7 ilustra o tempo de imobilidade de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação com 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p. A Anova de 2 vias não indicou diferença com relação ao tratamento [ $F_{1/3} = 0,86$   $P = 0,361$  e dias de observação [ $F_{1/3} = 4,50$ ,  $P = 0,040$ ] não havendo interação entre os fatores [ $F_{1/3} = 0,36$ ,  $P = 0,553$ ]. O teste de Bonferroni não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

A figura 8 ilustra o numero de bolos fecais de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação com 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p. A Anova de 2 vias não indicou diferença com relação ao tratamento [ $F_{1/3} = 0,33$ ,  $P = 0,572$ ] e dias de observação [ $F_{1/3} = 2,04$ ,  $P = 0,162$ ] não havendo interação entre os fatores [ $F_{1/3} = 0,33$ ,  $P = 0,572$ ]. O teste de Bonferroni não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

Figura 9 - Frequência de locomoção de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação com 100µg/Kg de LPS ou solução a 0,9% administradas por via i.p e observadas no quinto e nono dia de lactação após o tratamento.  $P < 0,05$  em relação aos animais do grupo controle. ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni

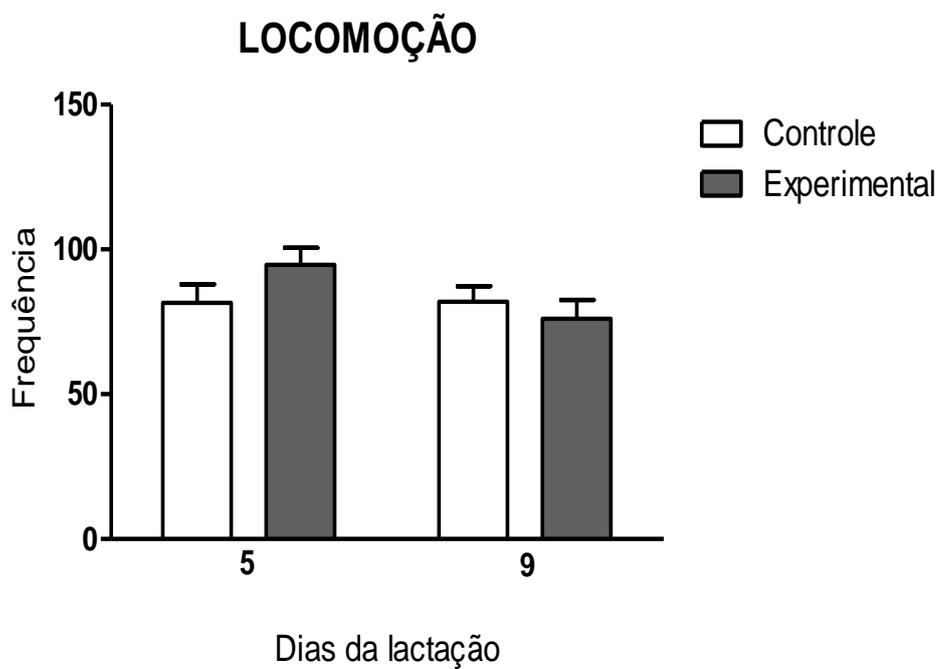


Figura 10 - Frequência de levantar de lactantes tratadas no terceiro dia de lactação com 100µg/Kg de LPS ou solução a 0,9% administradas por via i.p e observadas no quinto e nono dia de lactação após o tratamento.  $P < 0,05$  em relação aos animais do grupo controle. ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni

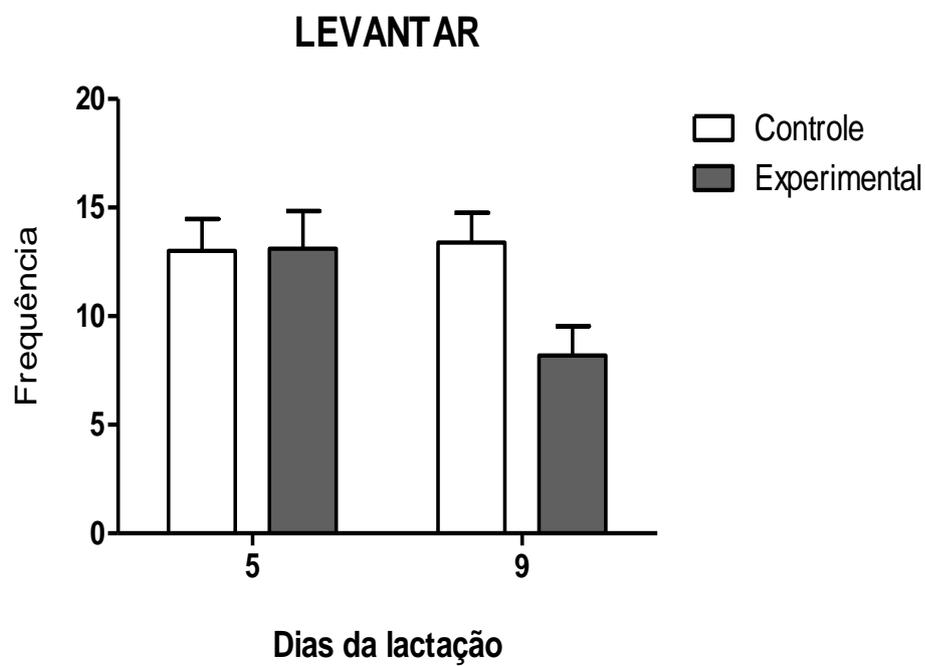


Figura 11 - Duração de imobilidade de ratas lactantes tratadas com 100 $\mu$ g/Kg de LPS ou solução a 0,9% administradas por via i.p e observadas no quinto e nono dia de lactação após o tratamento.  $P < 0,05$  em relação aos animais do grupo controle. ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni

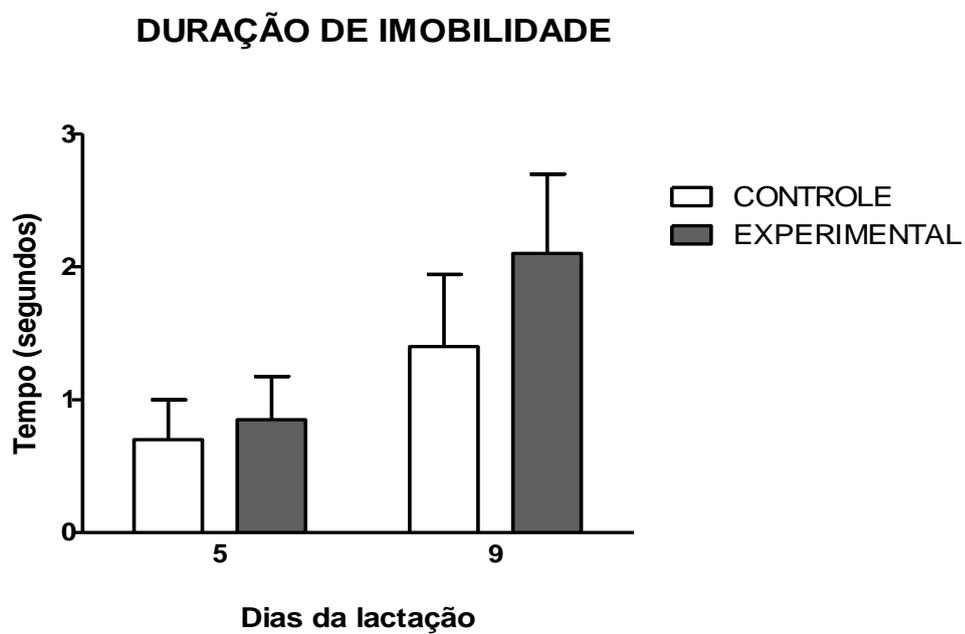
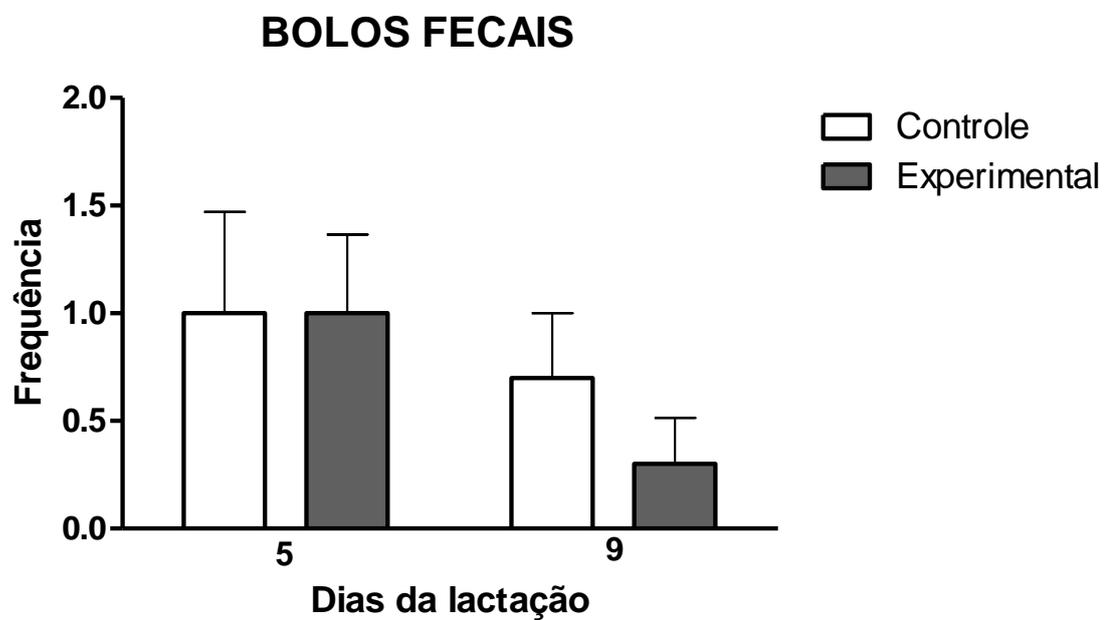


Figura 12 - Frequências de bolos fecais de ratas lactantes tratadas com 100 $\mu$ g/Kg de LPS ou solução a 0,9% administradas por via i.p e observadas no quinto e nono dia de lactação após o tratamento.  $P < 0,05$  em relação aos animais do grupo controle. ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni



## 6.4 EXPERIMENTO – 4

Comportamento maternal de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação com 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p e observadas no quinto dia de lactação após o tratamento.

### 6.4.1 Delineamento experimental

Para o estudo do comportamento maternal, foram utilizadas as mesmas ratas do experimento 2. No quinto dia de lactação após a administração da endotoxina iniciou-se as observações do comportamento maternal (entre 13 e 17 horas).

### 6.4.2 Resultados

A tabela 1 ilustra os parâmetros do comportamento maternal de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação com 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p e observadas no quinto dia de lactação após o tratamento. O teste t de *Student* não indicou a existência de diferenças nas latências para a busca do primeiro filhote, busca dos oito filhotes, carregar os oito filhotes, tempo entre carregar o primeiro e o último filhote, comportamento maternal total e número de filhotes no ninho, porém revelou diferença na latência para carregar o primeiro filhote.

Tabela 1 - Comportamento materno de ratas lactantes que receberam no terceiro dia de lactação 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% por via i.p. e foram observadas no quinto dia de lactação após o tratamento. Os dados são apresentados como médias e respectivos desvios-padrão em segundos.

Parâmetro	Grupos		P
	Controle	Experimental	
Latência para a busca do primeiro filhote	4,30 ± 0,65	2,80 ± 0,51	0,08
Latência para a busca dos oito filhotes	12,60 ± 2,22	11,50 ± 0,58	0,24
Latência para carregar primeiro filhote	2102,26 ± 511,70	335,97 ± 105,72*	0,001
Latência para carregar os oito filhotes	1999,14 ± 546,46	859,98 ± 345,14	0,08
Tempo entre carregar o primeiro e o último filhote.	6,6 ± 1,15	4,90 ± 4,88	0,78
Fêmeas que apresentaram comportamento materno total(%).	80	100	0,47
Número de filhotes no ninho ao final de 60 minutos (%).	80	100	0,21

P < 0,05 em relação ao grupo controle. Teste *t de Student*

## 6.5 EXPERIMENTO – 5

Comportamento maternal agressivo de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação com 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p e observadas no quinto dia de lactação após o tratamento.

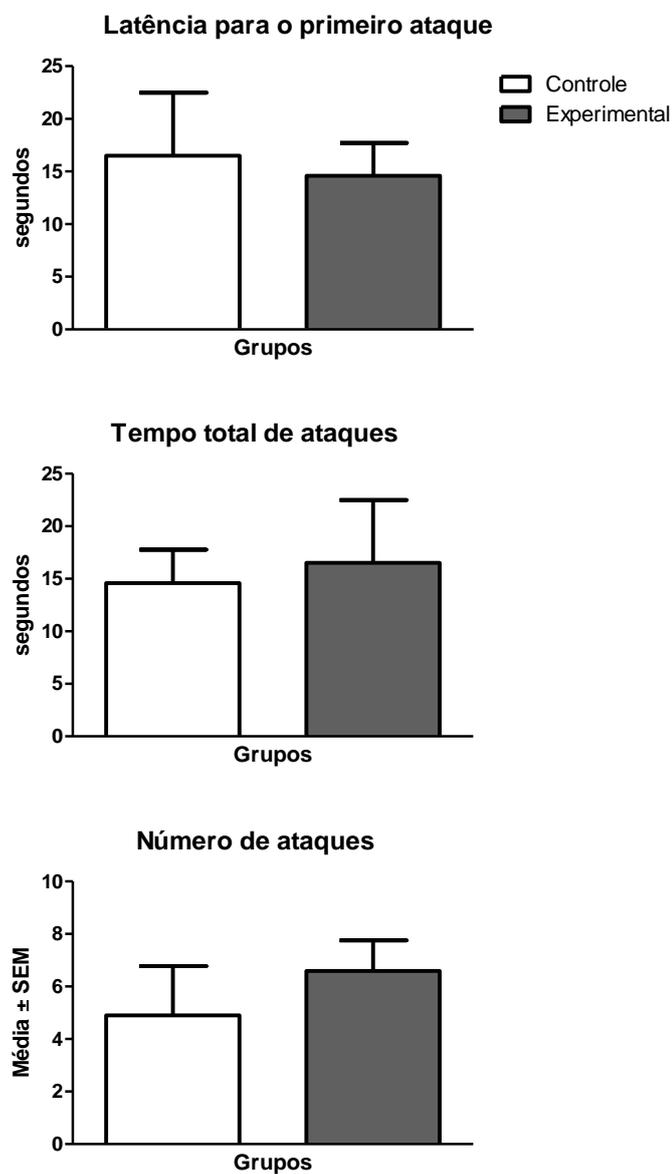
### 6.5.1 Delineamento experimental

Para o estudo do comportamento maternal agressivo, foram utilizadas as mesmas ratas do experimento 2. No quinto dia de lactação após a administração da endotoxina iniciou-se as observações do comportamento maternal agressivo (entre 13 e 17 horas).

### 6.5.2 Resultados

A figura 9 ilustra a latência para o primeiro ataque, tempo total de ataques e número de ataques de ratas lactantes tratadas no terceiro dia de lactação com 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% administradas por via i.p e observadas no quinto dia de lactação após o tratamento. O teste *t* de *Student* não indicou a existência de diferença entre os grupos.

Figura 13 - Parâmetros do comportamento maternal agressivo de ratas lactantes tratadas com 100 $\mu$ g/Kg de LPS ou solução a 0,9% administradas por via i.p e observadas no quinto dia de lactação após o tratamento. \*  $p < 0,05$  em relação aos animais do grupo controle. Teste *t* de Student.



## 6.6 EXPERIMENTO – 6

Análise histopatológica dos órgãos da prole das ratas lactantes tratadas com 100 µg/kg de LPS i.p 3<sup>o</sup> dia da lactação.

### 6.6.1 Delineamento experimental

Foram empregados no PND5, 20 (vinte) filhotes da prole de ratas que receberam no terceiro dia de lactação 100µg/Kg de LPS, i.p ou solução salina a 0,9%. Esses filhotes foram divididos em 2 (dois) grupos: um experimental (filhotes de ratas que receberam solução salina a 0,9%) e outro experimental (filhotes de fêmeas que receberam 100µg/Kg de LPS) com 10 (dez) animais cada.

### 6.6.2 Resultados

Na análise histopatológica não foram encontradas alterações.

## 6.7 EXPERIMENTO – 7

Contagem diferencial de leucócitos no PND5 da prole de filhotes de mães tratadas com 100 µg/kg de LPS i.p ou solução salina a 0,9% no PND3.

### 6.7.1 Delineamento experimental

Foram empregados no PND5, 20 (vinte) filhotes da prole de ratas que receberam no terceiro dia de lactação 100µg/Kg de LPS, i.p ou solução salina a 0,9%. Esses filhotes foram divididos em 2 (dois) grupos: um experimental (filhotes de ratas que receberam solução salina a 0,9%) e outro experimental (filhotes de fêmeas que receberam 100µg/Kg de LPS) com 10 (dez) animais cada.

### 6.7.2 Resultados

A tabela 2 ilustra o Contagem diferencial de leucócitos no PND5 da prole de filhotes de mães tratadas com 100 µg/kg de LPS i.p ou solução salina a 0,9% no PND3. O teste *t* de *Student* não indicou a existência de diferença entre os grupos.

Tabela 2 - Contagem diferencial de leucócitos no quinto dia pos-natal da prole de filhotes de mães tratadas com 100 µg/kg de LPS i.p ou solução salina a 0,9% no PND3. Os dados são apresentados como médias e respectivos desvios-padrão em %.

Parâmetro	Grupos		P
	Controle	Experimental	
Linfócitos	83,95 ± 0,40	83,95 ± 0,40	> 0,99
Monócitos	4,57 ± 0,20	4,57 ± 0,20	> 0,99
Neutrófilos	10,57 ± 0,29	10,57 ± 0,36	> 0,99
Eosinófilos	0,94 ± 0,05	0,94 ± 0,05	> 0,99

Teste *t* de Student

## 6.8 EXPERIMENTO – 8

Vocalização Ultrassônica no PND5 da prole de filhotes de ratas tratadas com 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS i.p ou solução salina a 0,9% no PND3.

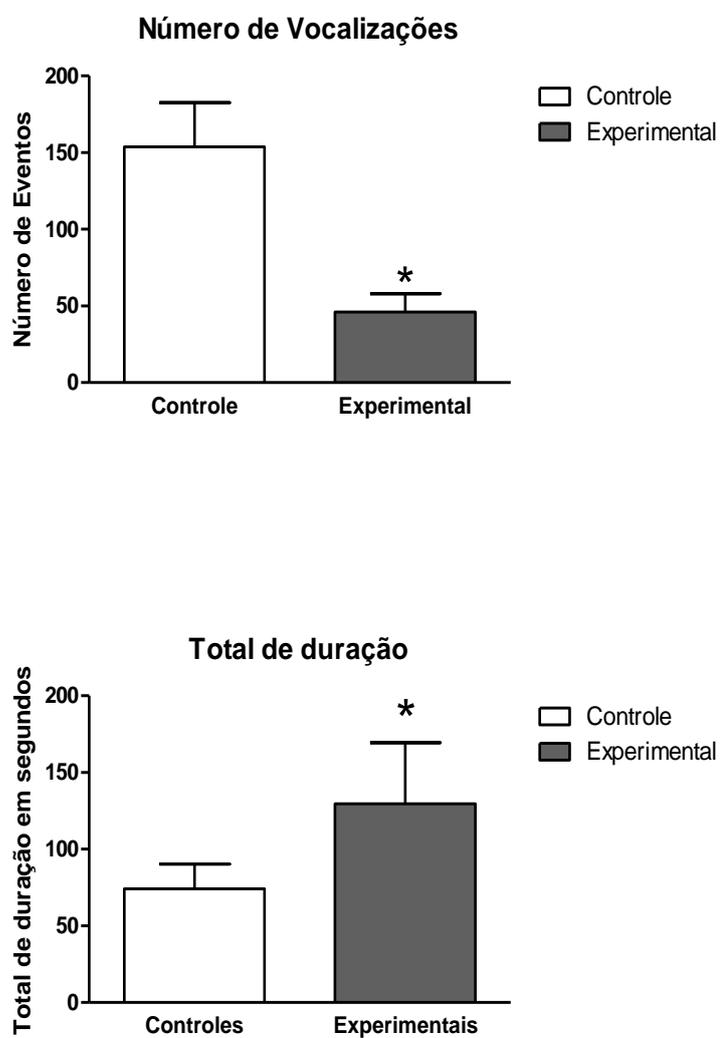
### 6.8.1 Delineamento experimental

Foram empregados no PND5, 20 (vinte) filhotes da prole de ratas que receberam no terceiro dia de lactação 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de LPS, i.p ou solução salina a 0,9%. Esses filhotes foram divididos em 2 (dois) grupos: um experimental (filhotes de ratas que receberam solução salina a 0,9%) e outro experimental (filhotes de fêmeas que receberam 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de LPS) com 10 (dez) animais cada e avaliou-se a vocalização ultra-sônica .

### 6.8.2 Resultados

A figura 14 ilustra o número e o total de duração de vocalizações ultrassônica no PND5 da prole de filhotes de ratas tratadas com 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS i.p ou solução salina a 0,9% no PND3. O teste *t* de *Student* indicou a existência de diferença significantes entre os grupos, ou seja, redução no número de vocalizações e aumento na sua duração nos ratos cujas mães receberam o LPS quando comparados aos animais do grupo controle.

Figura 14 - Vocalização Ultrassônica (40 HZ) no PND5 da prole de filhotes de mães tratadas com 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS i.p ou solução salina a 0,9% no PND3. \*  $p < 0,05$  em relação aos animais do grupo controle. Teste *t* de *Student*



## 6.9 EXPERIMENTO – 9

Atividade geral no PND21 da prole das ratas lactantes tratadas com 100 µg/kg de LPS i.p ou solução salina a 0,9% no PND3 e desafiadas com 50 µg/kg de LPS duas horas antes das observações.

### 6.9.1 Delineamento experimental

Foram empregados no PND21, 20 (vinte) filhotes da prole de ratas que receberam no terceiro dia de lactação 100µg/Kg de LPS, i.p ou solução salina a 0,9%, esses filhotes foram divididos em 2 (dois) grupos: um experimental (filhotes de ratas que receberam solução salina a 0,9%) e outro experimental (filhotes de fêmeas que receberam 100µg/Kg de LPS) com 10 (dez) animais cada, esses filhotes receberam 50µg/Kg de LPS i.p. e foram avaliados duas horas após o tratamento.

### 6.9.2 Resultados

A figura 15 ilustra a frequência de locomoção da prole de ratas tratadas com 100 µg/kg de LPS i.p ou solução salina a 0,9% no PND3 e desafiadas com 50 µg/kg de LPS duas horas antes das observações.

A Anova de 2 vias não indicou diferença com relação ao tratamento [ $F_{1/3} = 1,74$ ,  $P = 0,1991$ ] e dias de observação [ $F_{1/3} = 0,46$ ,  $P = 0,5028$ ] não havendo interação entre os fatores [ $F_{1/3} = 0,23$ ,  $P = 0,6356$ ]. O teste de Bonferroni não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

A figura 16 ilustra a frequência de levantar da prole das ratas lactantes tratadas com 100 µg/kg de LPS i.p ou solução salina a 0,9% no PND3 e desafiadas com 50 µg/kg de LPS duas hoas antes das observações. A Anova de 2 vias não indicou diferença com relação ao tratamento [ $F_{1/3} = 0,04$ ,  $P = 0,8480$ ] e dias de observação [ $F_{1/3} = 0,00$ ,  $P = 0,9703$ ] não

havendo interação entre os fatores [ $F_{1/3} = 0,01$ ,  $P = 0,9110$ ]. O teste de Bonferroni não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

A figura 17 ilustra o tempo de imobilidade da prole das ratas lactantes tratadas com 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS i.p ou solução salina a 0,9% no PND3 e desafiadas com 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS duas horas antes das observações. A Anova de 2 vias não indicou diferença com relação ao tratamento [ $F_{1/3} = 0,83$ ,  $P = 0,3718$ ] e dias de observação [ $F_{1/3} = 0,00$ ,  $P = 0,9596$ ] não havendo interação entre os fatores [ $F_{1/3} = 0,02$ ,  $P = 0,8953$ ]. O teste de Bonferroni não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

A figura 18 ilustra o numero de bolos fecais da prole das ratas lactantes tratadas com 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS i.p ou solução salina a 0,9% no PND3 e desafiadas com 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS duas horas antes das observações. A Anova de 2 vias não indicou diferença com relação ao tratamento [ $F_{1/3} = 0,34$ ,  $P = 0,1642$ ] e dias de observação [ $F_{1/3} = 2,94$ ,  $P = 0,0993$ ] não havendo interação entre os fatores [ $F_{1/3} = 0,34$ ,  $P = 0,5642$ ]. O teste de Bonferroni não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

Figura 15 - Frequência de locomoção da prole de ratas tratadas com 100 µg/kg de LPS ou solução salina a 0,9% no PND3 e desafiadas com 50 µg/kg de LPS i.p no PND21.  $P < 0,05$  em relação aos animais do grupo controle. ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni

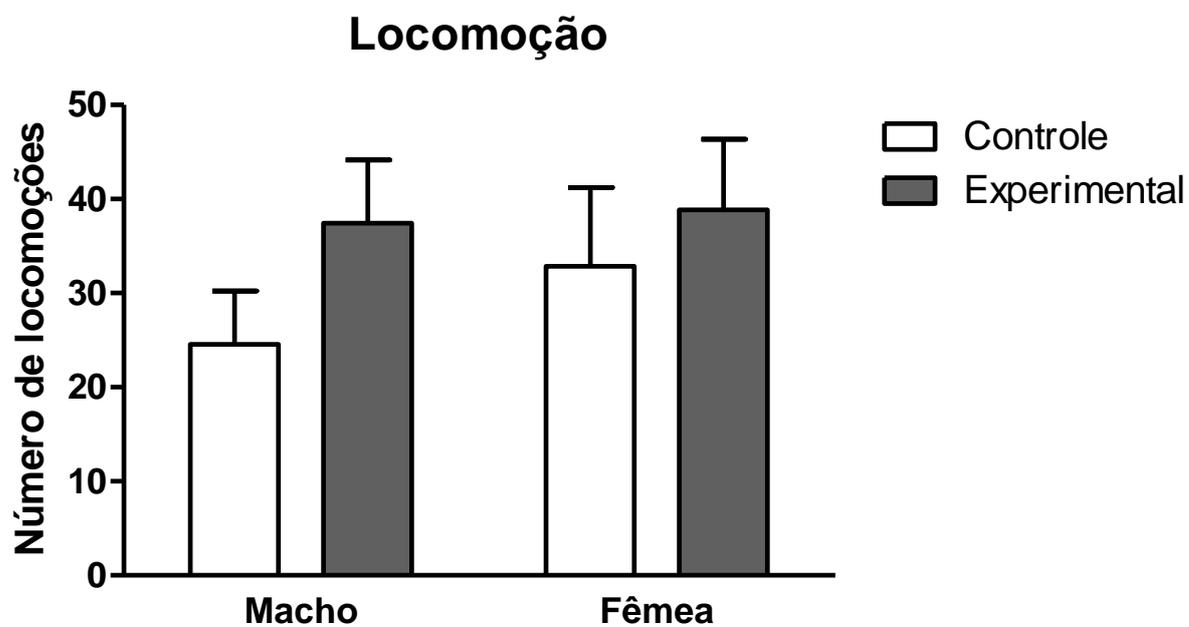


Figura 16 - Frequência de levantar da prole de ratas tratadas com 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS ou solução salina a 0,9% no PND3 e desafiadas com 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS i.p no PND21.  $P < 0,05$  em relação aos animais do grupo controle. ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni

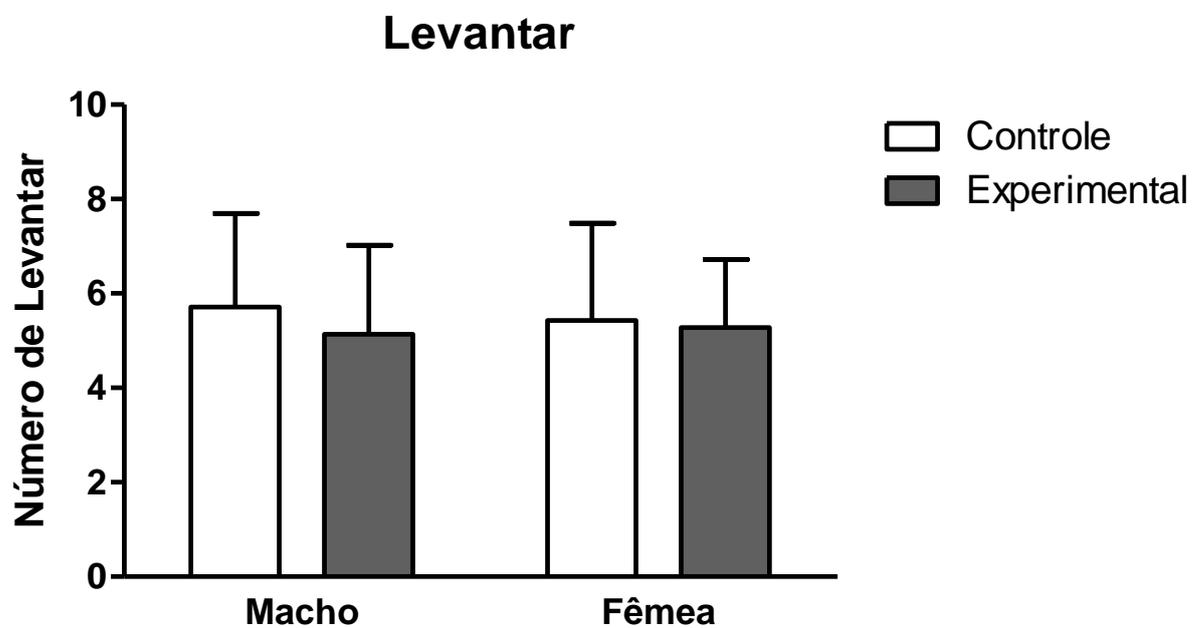


Figura 17 - Tempo de imobilidade da prole de ratas tratadas com 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS ou solução salina a 0,9% no PND3 e desafiadas com 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS i.p no PND21.  $P < 0,05$  em relação aos animais do grupo controle. ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni

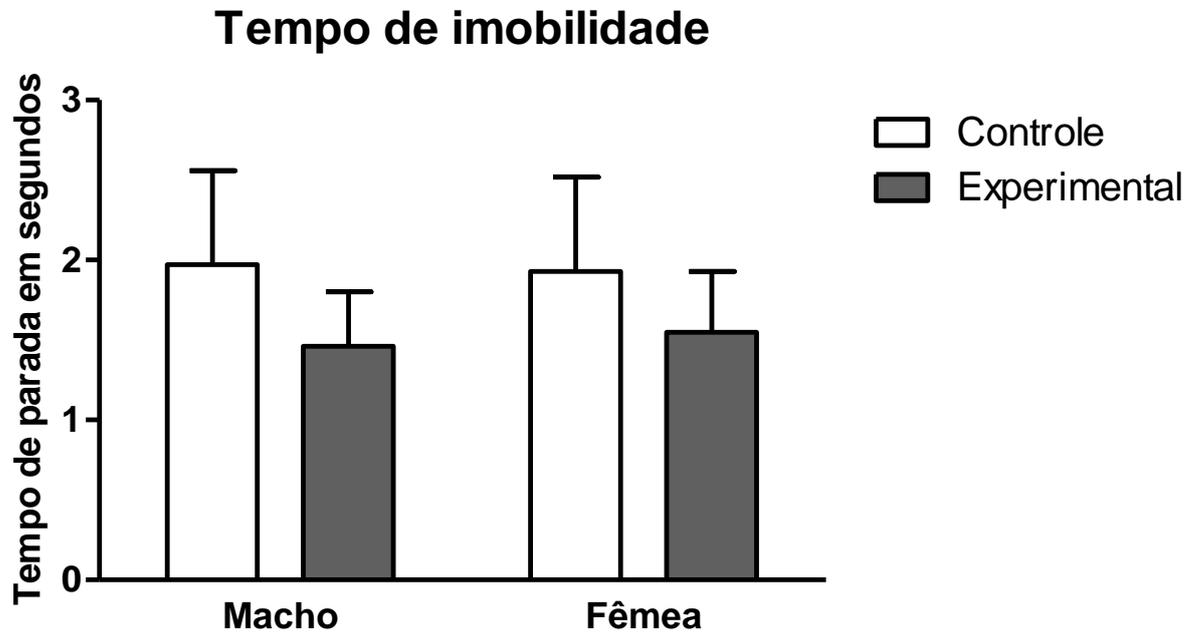
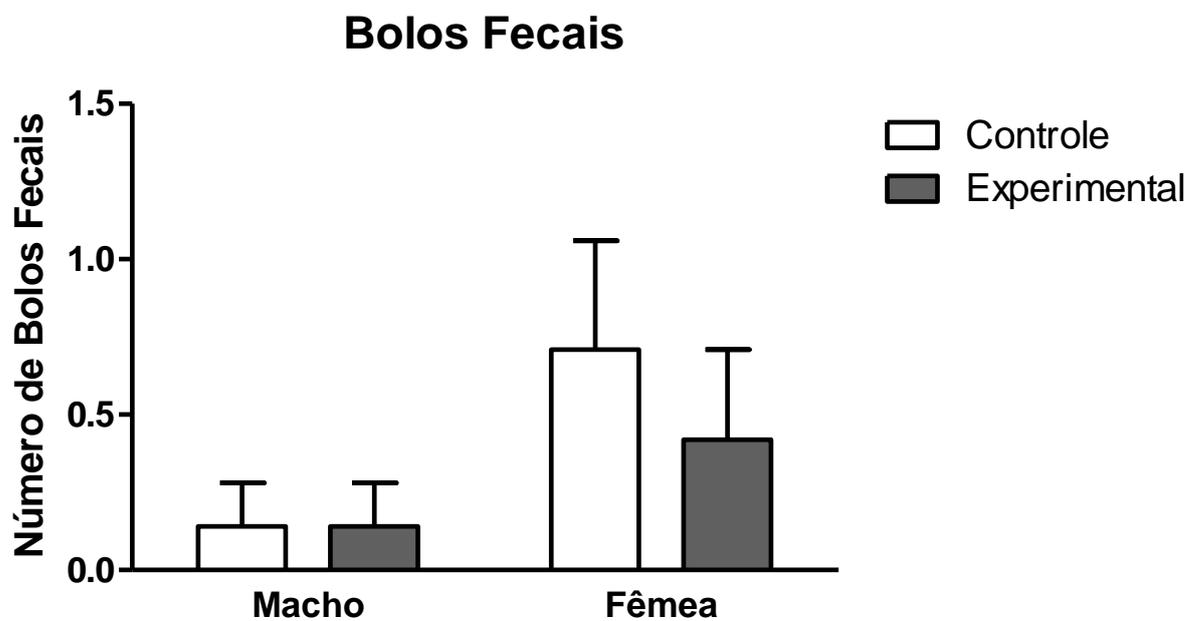


Figura 18 - Número de bolos fecais da prole de ratas tratadas com 100 µg/kg de LPS ou solução salina a 0,9% no PND3 e desafiadas com 50 µg/kg de LPS i.p no PND21. \*P< 0,05 em relação aos animais do grupo controle. ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni



## 6.10 EXPERIMENTO – 10

*Burst* e fagocitose de neutrófilos no PND21 da prole das ratas lactantes tratadas com 100 µg/kg de LPS i.p ou solução salina a 0,9% no PND3 e desafiadas com 50 µg/kg de LPS duas horas antes das observações.

### 6.10.1 Delineamento experimental

Foram empregados no PND21, 14 (quatorze) filhotes da prole de ratas que receberam no terceiro dia de lactação 100µg/Kg de LPS, i.p ou solução salina a 0,9%, esses filhotes foram divididos em 2 (dois) grupos: um experimental (filhotes de ratas que receberam solução salina a 0,9%) e outro experimental (filhotes de fêmeas que receberam 100µg/Kg de LPS) com 7 (sete) animais cada, esses filhotes receberam 50µg/Kg de LPS i.p. e foram avaliados duas horas após o tratamento

### 6.10.2 Resultados

A Tabela 3 ilustra o *burst* estimulado e obtido in vitro na presença de *Stafilococcus Áureus*, e PMA, e a porcentagem, e a intensidade de presença de neutrófilos realizando a fagocitose de *S. aureus*, no PND5 da prole de filhotes de ratas tratadas com 100 µg/kg de LPS i.p ou solução salina a 0,9% no PND3. O teste *t* de *Student* indicou que os filhotes de ratos expostos ao LPS apresentaram aumento significativo na resposta dos parâmetros imunes ao LPS com relação ao grupo não tratado com a endotoxina.

Tabela 3 - *Burst* e fagocitose de neutrófilos no quinto dia pós-natal da prole de filhotes de mães tratadas com 100 µg/kg de LPS i.p ou solução salina a 0,9% no PND3. Os dados são apresentados como médias e respectivos desvios-padrão em %.

Parâmetro	Grupos		P
	Controle	Experimental	
% de Fagocitose	25,08 ± 2,95	35,77 ± 4,56	0,036
DCFH	9,07 ± 1,16	8,87 ± 0,81	0,447
DCFH+Bactéria	211,08 ± 25,79	400,80 ± 37,53*	0,001
Intensidade de Fagocitose	56,59 ± 11,75	58,04 ± 10,63	0,464
PMA	1,15 ± 0,04	1,41 ± 0,07*	0,005

\*P < 0,05 em relação ao grupo controle. Teste *t* de Student

## 7 DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi investigar as adaptações comportamentais e neuroimunológicas no CM de ratas e de sua prole decorrentes de uma inflamação experimental produzida pelo LPS.

Para tanto foi necessário caracterizar em ratas os efeitos da administração da endotoxina na temperatura, peso corporal, consumo de água e ração. Assim, inicialmente foram construídas curvas tempo efeito para a temperatura corporal, consumo de ração e água bem como do peso corporal de ratas virgens e ratas lactantes. A dose de LPS escolhida foi de 100µg/Kg baseada no trabalho de Kirsten et al. (2009), que mostrou ser essa dose capaz de produzir comportamento doentio em ratas prenhes..

Os resultados dos experimentos 1 e 2 mostraram que a administração de 100µg/Kg de LPS em ratas virgens e em ratas lactantes, produziu:

- Nas ratas virgens queda de temperatura significativa duas horas após a administração da endotoxina e o incremento dessa temperatura às 48 e 72 horas em relação àquelas do grupo controle.

- Nas ratas lactantes esse tratamento produziu um incremento significativo da temperatura às 24 e 48 horas em relação àquelas do grupo controle.

- O consumo de ração nas ratas virgens e lactantes do grupo experimental foi reduzido às 24 horas, enquanto que o de água sofreu incremento significativo às 48 horas em relação ao grupo não tratado com a endotoxina. Em relação aos animais do grupo controle, nota-se que o peso corporal das ratas do grupo experimental apresentou-se menor 48 horas após o tratamento. Nos demais momentos de observação até as 120hs não se notou diferenças entre os resultados dos animais dos grupos experimental e controle.

Neste sentido, estes resultados poderiam ser atribuídos ao desenvolvimento de comportamento doentio promovido pela exposição ao LPS.

Segundo Hart (1988) diversas espécies animais acometidos por processos patológicos apresentam sinais comuns em resposta à doença tais como febre, letargia ou prostração, perda de apetite e diminuição do consumo de água, diminuição de locomoção, esta última relacionada principalmente à exploração ambiental. Hart denominou ao conjunto destas reações de comportamento doentio, o qual seria um conjunto organizado de modificações fisiológicas e comportamentais adaptativas com vantagens (aparentemente paradoxais), para

os animais acometidos de doenças, possibilitando redução do gasto energético fisiológico, como digestão de comida devido à anorexia, menor perda de calor e menor exposição a possíveis predadores devido à prostração. Além disso, como um todo, a síndrome comportamental induzida pelo LPS promove a geração de um ambiente menos favorável à proliferação de patógenos, favorecida pela atividade de células imunológicas devido à febre.

Neste trabalho realmente observou-se a presença de febre nas ratas, redução no consumo de ração e, em consequência no peso corporal. No entanto, houve aumento no consumo de água concomitante ao pico de aumento da temperatura corporal, sugerindo que, embora as ratas apresentassem um conjunto de sinais de comportamento doentio, a febre é que seria responsável pelo aumento no consumo de água. Neste sentido, pacientes com febre são orientados a manter-se adequadamente hidratados, uma vez que a desidratação produzida por uma febre moderada é mais perigosa de que a febre em si. De fato, com o aumento da temperatura corporal pela febre perde-se muito líquido e se torna necessário aumento no consumo do mesmo (GUYTON; HAAL, 1997). Outro fato interessante foi que houve queda no consumo de ração às 24 horas que se refletiu em perda de peso às 48 horas.

Notou-se ainda que duas horas após a administração de LPS ocorreu queda da temperatura corporal nas ratas virgens. Sabe-se que a administração de LPS promove choque endotóxico (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2001) no qual o organismo parece perder a habilidade de controlar a temperatura corporal ocorrendo hipotermia (AGUILAR; BRUNET, 1997). Desta forma, a queda inicial de temperatura presentemente observada poderia ser explicada por este mecanismo. Já as ratas lactantes não apresentaram essa queda de temperatura. Martin et al. (1995), verificaram que ratas virgens apresentaram hipotermia em resposta à administração de 10-50µg/Kg de LPS. Em ratas grávidas na proximidade do parto, ocorria supressão da febre e hipotermia quando expostas a 25 µg/Kg de LPS. Na lactação não foi observada hipotermia em razão da exposição ao LPS, fato que concorda com os presentes achados. O mecanismo subjacente a estes efeitos diferenciais do LPS em ratas virgens, prenhes e lactantes ainda não está bem estabelecido.

Fêmeas lactantes receberam no terceiro dia de lactação 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% por via i.p. Posteriormente essas fêmeas foram observadas no quinto e no nono dia de lactação em campo aberto, e no quinto dia de lactação para a avaliação do comportamento maternal dirigido diretamente aos filhotes e do comportamento maternal agressivo. O quinto dia foi escolhido, pois nos experimentos 1 e 2 verificou-se um pico no aumento de temperatura em ratas virgens e lactantes 48 horas após o tratamento com LPS.

Além disto, o comportamento maternal foi observado também no nono dia por corresponder, no mesmo experimento, ao retorno da temperatura a valores normais.

O resultado do experimento 3 mostrou que a administração de 100µg/Kg de LPS por via i.p. em ratas lactantes, não promoveu alterações na atividade geral dos animais do grupo experimental em relação àqueles do grupo controle, sugerindo ausência de alterações motoras, exploratórias e/ou emocionais. Estes resultados sugerem que a administração de LPS não promoveu comportamento doentio no que se refere à redução da atividade exploratória motora dos animais. Contrariamente, Kirsten et al. (2009) mostram que ratas prenhes tratadas com a mesma dose de LPS no 9,5 dia da gestação apresentaram redução na atividade geral observada em campo aberto. É, pois possível sugerir que os estados gestacional e lactacional modulem a atividade geral de forma diferencial.

O campo aberto, introduzido por Hall (1934), foi inicialmente usado para avaliar emocionalidade. Hall define em seu trabalho, o termo emocionalidade como um estado emocional formado por um grupo de reações orgânicas e expressivas, que denotam uma condição de excitação no animal. Walsh e Cummings (1976) reformularam o conceito passando a defini-lo como “uma entidade com componentes afetivos não específicos do comportamento”. Em seus experimentos, Hall mostrou que quando ratos eram expostos a um ambiente estranho, a defecação e o ato de urinar seriam índices de um estado emocional. Um roedor, submetido a um estímulo estressor, representado por uma arena aberta, tenderia a “congelar” defecar e urinar. Em 1936, esse autor mostrou existir correlação inversa entre aumento da emocionalidade, expresso pelo aumento da defecação, com redução na atividade locomotora, medida pela velocidade na atividade locomotora (medida pela distância atravessada por unidade de tempo). Assim, os ratos que mais se locomoviam, defecavam menos. Portanto, o teste de campo aberto passou a ser considerado como um bom modelo animal de ansiedade por sua sensibilidade bidirecional a tratamentos farmacológicos, podendo avaliar o comportamento semelhante à ansiedade em várias espécies, incluindo animais transgênicos e camundongos *Knockout* (CAROLA et al., 2002). As condições iniciais de observação incluíam luz forte e um som de 80 decibéis, portanto altos níveis de estimulação. Bernardi e Palermo Neto (1979) reduziram este grau de estímulo em seus experimentos e, também atribuíram a este teste condições experimentais que permitiram medir a atividade motora de ratos. Estes autores ainda relacionaram redução na atividade geral em campo aberto com o bloqueio de sistemas dopaminérgicos centrais.

Silva et al. (2001), sugeriram a existência de uma relação direta entre o sistema dopaminérgico central e o início do comportamento maternal. Por outro lado, vários trabalhos mostram que o LPS é uma endotoxina bacteriana capaz de ativar o sistema imune liberando citocinas pró-inflamatórias as quais podem afetar o metabolismo do sistema dopaminérgico (HORNYKIEWICZ, 1998; AVITSUR; WEIDENFIELD; YERMEYA, 1999; DUNN, 2006). Neste sentido, é fato conhecido que a DA controla funções fisiológicas, como a atividade locomotora (PIJNENBURG; VAN ROSSUM, 1973). A ausência de diferenças entre todos os grupos estudados pode ser explicada pelo fato de neste trabalho o tratamento com o LPS não ocasionou alterações motoras via sistema dopaminérgico nas ratas lactantes.

O monitoramento do comportamento maternal foi realizado para avaliar a influência do tratamento com o LPS nos parâmetros do CM. Para tal, foram considerados aspectos pró-ativos desse comportamento, tais como, latências para a busca, carregar o primeiro e último filhote, tempo entre carregar o primeiro e o último filhote, comportamento maternal total e número de filhotes no ninho.

Os resultados dos experimentos mostraram que a administração de 100µg/Kg de LPS por via i.p. em ratas lactantes, reduziu a latência para carregar o primeiro filhote, porém não produziu diferenças significantes entre os demais parâmetros dos animais dos grupos experimental e controle, dados estes que sugerem um possível aumento no estado motivacional e fisiológico maternos.

Neste sentido, o repertório comportamental dos mamíferos durante a maternidade difere daquele exibido por fêmeas em outros períodos de seus ciclos reprodutivos (FERREIRA et al., 2002). No final da gravidez e durante os primeiros dias da lactação, as fêmeas passam por importantes mudanças hormonais e comportamentais que induzem e permitem a nutrição e cuidado da prole (RUSSEL et al., 2001; GIOVENARDI et al., 2002; NUMAN; INSEL, 2003). O comportamento maternal inclui ações que as fêmeas executam para garantir o sucesso no desenvolvimento de seus filhotes (MANN, 2006). Este comportamento inclui construção do ninho, recolhimento dos filhotes quando estes se afastam do ninho, estimulação à micção através da lambida anogenital, agrupamento dos filhotes no ninho e posicionamento sobre eles para provê-los de nutrição e calor (STERN, 1990; ALBERT; WALSH, 1995; MANN; BRIDGES 2006).

Pode-se observar neste trabalho, que a latência para carregar o primeiro filhote do grupo tratado com LPS foi menor comparada com o grupo tratado com o veículo da mesma endotoxina. No entanto nos demais parâmetros observados não foram detectados diferenças

entre os grupos. Sabe-se que a DA está envolvida tanto com a fase inicial como com a fase de manutenção do CM (HANSEN et al., 1991; STERN; TAYLOR, 1991). Possivelmente, este efeito se relacione com o estado motivacional e fisiológico maternos. Esta observação corrobora com o fato da DA influenciar motivações via sistema mesolímbico, principalmente em N.Ac (ROBBINS; EVERITT, 1996; WILLNER; KRUGER, 1991).

Por outro lado, roedores neonatos não controlam a temperatura corporal a qual é mantida pela própria mãe em seu cuidado maternal. Tanto a busca do filhote como o cuidado no ninho dos mesmos estão envolvidos com a termorregulação dos filhotes. A busca do filhote é um comportamento crítico na sobrevivência da prole. Em ambientes frios, a prioridade é manter a temperatura da prole e este fato incrementa o comportamento maternal (ALBERT; WALSH, 1995), incluindo o recolher dos filhotes.

Na febre certas citocinas (pirógenos endógenos) agem no centro regulador do hipotálamo elevando o limiar térmico e, desencadeando respostas ligadas à conservação de energia (VOLTARELLI, 1994). Desta forma, o animal teria sensação de que o ambiente estaria frio. Assim, a menor latência para busca do primeiro filhote das ratas tratadas com LPS poderia ser explicada pela própria febre.

A avaliação do comportamento maternal agressivo foi realizada com o objetivo de verificar se o tratamento com LPS interferiria com a proteção das fêmeas contra agressões de um estranho. Mediu-se a latência para o primeiro ataque, tempo total de ataques e número de ataques.

A agressão maternal consiste em comportamentos específicos executados pela mãe em relação a um intruso, com ou sem a intenção de lesá-lo (HUNTINGFORD, 1989). Ratas lactantes demonstram altos níveis de agressividade durante as duas primeiras semanas após o parto e, após este período, há um declínio na agressividade embora a lactação continue (MAYER; ROSENBLATT, 1987), e o comportamento maternal também. A agressão maternal é um comportamento espécie - específico (NUMAN, 1994) que ocorre num período específico da vida da rata, ao contrário dos machos que podem manifestar comportamentos agressivos de maneira continua durante a vida. A agressão contra um intruso é parte do complexo sistema de comportamentos que fazem contemplar o CM dos mamíferos (NUMAN, 1994), o que pode confirmar a alteração de parâmetros atribuídos ao comportamento agressivo (ataque ao intruso). O N.Ac é uma região repleta de terminais de vias dopaminérgicas, que segundo alguns autores, modula o comportamento agressivo e defensivo (LUCION; DE ALMEIDA 1996).

O resultado do experimento 4 mostrou que a administração de 100µg/Kg de LPS por via i.p. em ratas lactantes, não produziu diferenças entre os parâmetros do comportamento maternal agressivo dos animais dos grupos experimental e controle. Assim, pode-se sugerir que o LPS, mesmo liberando citocinas que agem no sistema dopaminérgico (DUNN, 2006), não foi capaz de alterar a atividade destas vias na modulação do comportamento agressivo.

O menor tempo para recolher pode também ter sido causado, além do acima comentado, por alterações na interação mãe-filhote, desde que o estímulo do filhote é crítico para que o comportamento maternal ocorra (HUOT et al., 2004). Os demais experimentos foram então realizados com a prole das fêmeas lactantes que receberam no terceiro dia de lactação 100µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% por via i.p.

Assim, investigou-se se a administração de LPS às ratas lactantes promoveria inflamação na prole observada no quinto dia da lactação e se sua vocalização estaria alterada no mesmo dia.

Desta forma, analisou-se a histologia dos órgãos dos filhotes, o diferencial de leucócitos e a vocalização ultrassônica dos mesmos. Adicionalmente, no vigésimo dia pós-natal esses filhotes receberam um desafio com 50 µg/Kg de LPS ou solução salina a 0,9% por via i.p. duas horas antes da observação de sua atividade geral em campo aberto, do *burst* e fagocitose.

O quinto dia foi escolhido para avaliação, pois nos experimentos 1 e 2 verificou-se um pico no aumento de temperatura em ratas virgens e lactantes 48 horas após o tratamento com LPS, e no experimento 4 as mães apresentaram uma menor latência para busca do primeiro filhote. O vigésimo primeiro dia foi escolhido para a observação das respostas ao desafio pelo LPS por corresponder ao dia do desmame desses filhotes, momento este em que o animal apresenta uma mudança na contingência ambiental.

Os resultados dos experimentos 6, 7 e 8, mostraram que a administração de 100µg/Kg de LPS por via i.p. em ratas lactantes, não promoveu sinais de alterações inflamatórias na análise histopatológica e tampouco no estudo do diferencial de leucócitos. No entanto, notou-se que alterou o padrão de vocalização desses filhotes em relação aqueles do grupo controle. Já os experimentos 9 e 10, ou seja, nos testes em que os filhotes foram desafiados por 50µg/Kg de LPS, verificou-se aumento no, *burst* e fagocitose de neutrófilos, porém não foram detectadas alterações na atividade geral em campo aberto quando comparadas ao grupo controle. No período de lactação os filhotes estão em maturação funcional, sendo que o cuidado materno é importantíssimo, e uma das formas de cuidado oferecido pela mãe é o

aleitamento. O leite materno além da composição adequada de nutrientes possui outros componentes que atuam na defesa do organismo do lactente, como imunoglobulinas, fatores anti-inflamatórios e imunostimuladores (LAMOUNIER; VIEIRA; GOUVÊA, 2001). Seus mecanismos incluem atividade específica contra agentes infecciosos, crescimento celular da mucosa intestinal aumentando a resistência às infecções, entre outros (RIBEIRO; KUZUHARA, 2007). As concentrações de citocinas têm um papel fundamental na imunogenicidade do leite materno (AUGUST; MUELLER; WEAVER, 2006). Desta forma, poderia se pensar que as citocinas liberadas pelo LPS podem ter sido transferidas para os filhotes pelo leite materno. A partir daí as citocinas podem ter interferido na homeostasia dos filhotes, causando mudanças no comportamento, de forma similar ao que acontece com um indivíduo exposto ao LPS (ASHDOWN et al., 2006). A liberação de citocinas pelo LPS no leite pode ter alterado o padrão de vocalização destes filhotes. Estudos demonstraram que alterações ou interferências na relação mãe-filhote, podem provocar distúrbios, modificações no comportamento da mãe em relação ao filhote, causando assim mudanças comportamentais, neuroendócrinas, imunológicas e neurais que podem perdurar ao longo da vida do animal.

Outra questão que surgiu neste trabalho foi se a ativação do sistema imune materno, por liberar citocinas no leite, promoveria alterações na resposta de sua prole a um desafio do sistema imune no período pré-pubere. Assim, verificou-se que estes filhotes manifestaram aumento de neutrófilos que são células sanguíneas leucocitárias, envolvidos na defesa contra bactérias (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004), porém esta ativação não levou a redução na exploração no campo aberto.

Resumidamente, os presentes resultados mostram que a exposição no terceiro dia da lactação de 100 µg/kg de LPS promoveu menor latência para carregar o primeiro filhote no quinto dia da lactação, não interferindo com os demais parâmetros do CM, agressivo e com a atividade geral em campo aberto. Na prole dessas fêmeas promoveu alteração no padrão de vocalização no quinto dia pós-natal, não produziu sinais de inflamação quinto dia da lactação uma vez que não foram observadas alterações na análise histopatológica e o diferencial de leucócitos. Na idade pré-pubere, o desafio com 50 µg/kg de LPS provocou alteração no *burst* e fagocitose de neutrófilos, ou seja, aumentou a resposta ao LPS, porém não produziu sinais comportamentais de comportamento doentio.

Uma hipótese para explicar as alterações induzidas pela exposição materna ao LPS no comportamento e resposta do sistema imune de sua prole seria de que a endotoxina, por

liberar citocinas numa fase precoce do desenvolvimento da prole, teria modificado a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), ou seja, sua responsividade ao estresse.

De fato, durante o desenvolvimento, o SNC é extremamente plástico para as intervenções do ambiente. A experiência é essencial durante as primeiras semanas pós-natal em que as atividades sensoriais se refinam e estabelecem conexões neurológicas estáveis. Sabe-se que, os filhotes de mãe que passaram por algum evento ou estresse durante a gestação podem apresentar alterações no seu desenvolvimento global, desta forma o comportamento maternal se apresenta como fundamental para o desenvolvimento inicial de recém-nascidos (SALE et al., 2007).

Neste sentido, eventos perinatais têm efeitos a curto e longo prazo no desenvolvimento do sistema nervoso e no comportamento. Além da origem genética das anomalias, fatores ambientais estão sendo correlacionados, e eventos estressantes durante períodos pré- e pós-natal podem causar um desenvolvimento deletério de funções cerebrais (KOEHL et al., 2001). Manipulações estressantes neste período demonstram ser indutoras de alterações a longo prazo, levando a prejuízos cognitivos e emocionais, quando a prole se torna adulta (KOFMAN, 2002). A sensibilidade aumentada do eixo HPA, o sistema endócrino que controla a secreção de hormônios do estresse como os corticóides, aparecem como sendo o maior elemento dessas patologias. A disfunção do eixo HPA aparece logo após o nascimento (com três dias) e dura por meses. Desde que o comportamento doentio materno durante a lactação é também acompanhado por estresse materno (KOFMAN, 2002), a exposição ao LPS administrado no terceiro dia da lactação pode ter afetado o eixo HPA da prole, sendo responsável pelas alterações aqui observadas (REUL et al., 1994).

Fato interessante foi que logo após a exposição via leite às citocinas da mãe, os filhotes não apresentaram sinais de inflamação uma vez que a análise de seus órgãos e a contagem diferencial de leucócitos não foram diferentes dos observados no grupo controle.

Uma hipótese para explicar as alterações induzidas pela exposição materna ao LPS no comportamento e no diferencial de leucócitos de sua prole seria de que a endotoxina, por liberar citocinas numa fase precoce do desenvolvimento da prole, teria modificado a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), ou seja, sua responsividade ao estresse.

Brummelte et al. (2010) evidenciaram altos níveis de corticoesterona no leite do estômago, cérebro e não no soro em filhotes de ratos cujas mães foram expostas no sétimo dia da lactação. De fato, Yorty e Bonneau (2003) demonstraram que o estresse agudo aumenta os níveis de corticoesterona no soro e leite materno. A corticoesterona do leite materno passaria

aos lactantes neonatos e resultaria na ativação de sua própria corticoesterona. Concluiu-se que o hormônio liberado via leite impediu a capacidade da progênie em gerar uma resposta adaptativa mediada por células imune e ilustra a importância potencial de estresse materno na resistência a patógenos infecciosos neonatal. Embora nossos dados não contemplem estudos desta natureza, pode-se supor que a ausência de inflamação dos filhotes seja consequência da liberação de corticoides via leite materno. Em termos da sobrevivência dos filhotes é bem interessante que no caso de uma inflamação materna haja uma proteção adicional ao filhote para evitar que ele também adoença.

Neste mesmo sentido, pode-se atribuir ao estresse maternal a alteração do padrão de vocalização dos filhotes.

Filhotes de ratos emitem vocalizações ultra-sônicas na faixa de 35-40 kHz, quando separados de suas mães e irmãos. A vocalização se desenvolve gradualmente alguns dias após o nascimento, sendo mantida em níveis elevada até abertura dos olhos no dia 14 pós-natal (INSEL et al., 1988) e, subsequentemente, desaparece por volta do dia 18 (ALLIN; BANKS, 1971). Elas visam evocar a busca e recuperação do filhote por sua mãe (ALLIN E BANKS, 1972; SMOTHERMAN et al, 1974) e estimulam a liberação de prolactina na mãe (TERKEL et al., 1979.). Os filhotes desta idade são cegos, surdos, não têm pêlo, são poiquilotérmicos e dependem da mãe para os processos de excreção (BROUETTE-LAHLOU et al., 1992), não sendo capazes de sobreviver se deixados sozinhos fora do ninho. As vocalizações ultrassônicas têm, portanto, função vital de comunicação entre a mãe e sua prole. Além da simples separação, a vocalização é reforçada pelo estresse, como por exemplo, a exposição a baixas temperaturas (ALLIN; BANKS, 1971; OKON, 1972), a estimulação tátil (NOIROT, 1972; OSWALT; MEIER, 1975) ou alguns estímulos olfativos (OSWALT; MEIER, 1975). Estímulos provenientes da mãe e/ou ninhada têm um efeito tranquilizador (HOFER; SHAIR, 1980,1987). Estes dados levantaram a hipótese de que nesta situação, as vocalizações de filhotes refletiriam um estado de angústia (INSEL; WINSLOW, 1991; MICZEK et al., 1991).

No entanto, a interpretação da vocalização ultrassônica do filhote em direção a mãe é ainda bastante discutida na literatura. Ela é considerada como a expressão de um estado de ansiedade desde que é revertida pela administração de drogas ansiolíticas (GARDNER et al., 1986; BRANCHI et al., 2001). Existem outras conotações sobre o significado das vocalizações ultrassônicas de filhotes de ratos apontam para efeitos na manutenção da homeostasia cardiopulmonar (BLUMBERG et al., 2001), outros propõem que as vocalizações dos filhotes de roedores seriam um mecanismo ontogenético precoce com alto valor para sua

sobrevivência (LUCCHINA et al., 2002). Neste trabalho verificou-se alteração no padrão da vocalização dos filhotes expostos na lactação via materna ao LPS em relação ao grupo controle, ou seja, houve redução no número de vocalizações e aumento concomitante na sua duração. Tendo em vista que a vocalização ultrassônica é um dos principais meios de comunicação entre a mãe e filhote, pode-se sugerir que seria esta alteração no “diálogo filhote-mãe” também responsável pela menor latência de busca do filhote. Mas permanece a questão sobre qual seria o mecanismo envolvido com esta modificação na vocalização. Uma vez que o filhote não apresentou inflamação no quinto dia da lactação não se pode atribuir o aumento da vocalização a uma febre de filhotes, que alteraria a percepção da sua temperatura.

Como proposto anteriormente a apoiados nos dados de Yorty e Bonneau (2003), estes filhotes teriam níveis de corticoesterona mais altos em resposta ao estresse materno. Portanto, a alteração no padrão de vocalização dos filhotes de mães expostas ao LPS pode ser considerada como resultado do estresse materno. Ainda, esta mudança do padrão da vocalização dos filhotes pode também ter contribuído para a redução na latência para busca dos filhotes observada no comportamento maternal. Estas hipóteses merecerão, sem dúvidas, serem testadas em experimentos futuros.

Outro achado importante no presente trabalho foi o aumento da atividade do sistema imune frente ao desafio com LPS em filhotes expostos na lactação à mesma endotoxina via materna em relação ao grupo controle. Por outro lado, este achado não foi acompanhado por modificação na atividade geral dos filhotes observados em campo aberto.

Muitos trabalhos mostram que a ativação precoce do sistema imune quer seja por LPS ou infecção bacteriana não só altera a programação do sistema imune inato (BOISSÉ et al., 2004; BILBO et al., 2005; ELLIS et al., 2005; SPENCER et al., 2006; WALKER et al., 2006), mas também as respostas sensoriais e comportamentais ao LPS (WALKER et al., 2004; BOISSÉ et al., 2005; BILBO et al., 2006; HARRÉ et al., 2008). Estes efeitos são atribuídos a facilitação na liberação de glicorticóides, promovido pela ativação precoce do eixo HPA (MOUIHATE et al., 2010). No entanto, os efeitos da ativação imune precoce são analisados em períodos mais tardio da vida dos animais e não no período inicial de sua vida como observado neste trabalho. Segundo Levine (2001) no final da gestação e nos primeiros dias de vida os níveis de glicorticóides ainda são altos na prole de ratos. A seguir ocorre um período de hiporesponsividade do eixo HPA, que perdura até o décimo quarto dia pós-natal. Além disto, os níveis de ACTH e CRF nas duas últimas semanas da lactação são bastante baixos (WALKER et al., 1986). Portanto, pode-se sugerir que o aumento da resposta ao

desafio pelo LPS no Veríssimo primeiro dia da lactação derive de menores níveis de glicocorticoides dos filhotes.

Evidentemente, muitos destes achados são explicados em níveis de hipóteses as quais devem ser estudadas em detalhes para que se possam estabelecer bases empíricas para o entendimento dos fenômenos observados neste trabalho.

## **8 CONCLUSÕES**

Como conclusão geral pode-se afirmar que a administração a ratas de LPS no início da lactação facilitou a busca dos filhotes, sendo que dois fatores podem ter causado este efeito; a febre materna e a alteração no padrão de vocalização de sua prole. Além disto, a exposição materna à endotoxina levou a sensibilização do sistema imune de sua prole quando desafiada com o LPS.

## REFERÊNCIAS

- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response., **Nature**, Washington, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.
- AGUILA.R, E.; BRUNET, M. Climate Change Research Group. **Geography Unit**, Tarragona, v. 110, p. 15, 1997.
- ALBERT, D. J.; WALSH, M. L. Aggression in the lactating female rat: the decline is not dependent on the physical development of pups. **Physiology and Behavior**, British Columbia, v. 58, p. 477-481, 1995.
- ALLIN, J. T., BANKS, E. M. Functional aspects of ultrasound production by infant albino rats *Rattus norvegicus*. **Animal Behaviour**, Illinois, v. 20, p. 175-185, 1972.
- 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**, Quebec, v. 11, n. 1, p. 47-55, 2006.
- AUGUST, A.; MUELLER C.; WEAVER, V.; POLANCO, T. A.; WALSH, E. R.; CANTORNA, M. T. Nutrients, nuclear receptors, inflammation, immunity lipids, PPAR, and allergic asthma. **Journal of Nutrition**., Pennsylvania, v. 136, p. 695-699, 2006.
- AVITSUR, R.; WEIDENFIEL, D.; YERMEYA, R. Cytokines inhibit sexual behavior in female rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, Jerusalem, v. 13, p. 33, 1999.
- BRANCHI, I.; SANTUCCI, D.; ALLEVA, E. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. **Brain, Behavior, and Immunity**, Roma, v. 125, p. 49-56, 2001.
- BILBO, S. D.; NEWSUM, N. J.; SPRUNGER, D. B.; WATKINS, L. R.; RUDY, J. W.; MAIER, S. F. Differential effects of neonatal handling on early life infection-induced alterations in cognition in adulthood. **Brain, Behavior, and Immunity**, Colorado, v. 21, p. 332-342, 2007.
- BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Physiological implications of the immune-neuroendocrine network. In: ADER, R.; FELTEN, D. L.; COHEN, N. (Eds.), **Psychoneuroimmunology**. San Diego: Academic Press, 1991. p. 589-608.
- BERNARDI, M. M.; PALERMO NETO, J. Atividade Geral: conceitos e medidas. **Psychopharmacology**, São Paulo. v. 65, n. 3, p. 247-250, 1979.
- BLUMBERG, M. S; SOKOLOFF, G. Do infant rats cry? **Behavioural Brain Research**, Iowa, v. 108, p. 83-95, 2001.
- BOISSE, L.; MOUIHATE, A.; ELLIS, S.; PITTMAN, Q. J. Long-term alterations in neuroimmune responses after neonatal exposure to lipopolysaccharide. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 4928-4934, 2004.

- BROADHURST, P. L. Experiments in psychogenetics: Applications of biometrical genetics to the inheritance of behaviour. In: EYSENCK, H. J. Experiments in personality. **Routledge and Kegan Paul**. London, v. 1, p. 1-256, 1969.
- BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Estrutura celular. In: JAWETZ, MELNICK, ADELBERG: **Microbiologia médica**. 21. ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan. 21. ed. Rio de Janeiro, 2000. p. 6-30.
- BRUMMELTE, S.; SCHMIDT, K. L.; TAVES, M. D.; SOMA, K. K.; GALEA, L. A. Elevated corticosterone levels in stomach milk, serum, and brain of male and female offspring after maternal corticosterone treatment in the rat. **Developmental Neurobiology**, Vancouver, v. 70, p. 714-725. Sep. 2010.
- CAROLA, V.; D'OLIMPIO, F.; BRUNAMONTI, E.; MANGIA, F.; RENZI, P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural Brain Research**. Rome, v. 134, p. 49-57, 2002.
- DUNN, A. J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clinical Neuroscience Research**, v. 6, p. 52-68, 2006.
- ELLIS, S.; MOUIHATE, A.; PITTMAN, Q.J. Early life immune challenge alters innate immune responses to lipopolysaccharide: implications for host defense as adults. **The FASEB Journal**, Alberta, v. 19, p. 1519–1521, 2005.
- FERREIRA, A.; PEREIRA, M.; AGRATI, D.; URIATE, N.; FERNANDÉZ-GUASTI, B. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. **Physiology and Behavioral**, Montevideo, v. 77, p. 197-204, 2002.
- GARDNER, C. R. Distress vocalization in rat pups. A simple screening method for anxiolytic drugs. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 14 p. 181-187, 1985.
- GUYTON, C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997. p. 694.
- GIOVENARDI, M.; FREY, R. M.; SCHEREM, M. A.; FRANCI, C. R.; LUCION, A. B. Perfil hormonal de ratas lactantes. In: XVII REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 17., 2002, Lindóia. Resumos...2002. p. 128.
- HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, p. 385-403, 1934.
- HANSEN, S.; HARTON, C.; WALLIN, E.; LOFBERG, L.; SWENSSON, K. The effects of 6-OHDA-induced dopamine depletions in ventral or dorsal striatum on maternal and sexual behavior in the female rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. Göteborg, v. 39 p. 71-77, 1991.
- HANSEN, S.; HARTON, C.; WALLIN, E.; LOFBERG, L.; SWENSSON, K. Mesotelencephalic dopamine system and reproductive behavior in the female rat: effects of

ventral tegmental 6-hydroxydopamine lesions on maternal and sexual responsiveness. **Behavioral Neuroscience**, Göteborg, v. 105, p. 588-598, 1991.

HARRÉ, E. M.; GALIC, M. A.; MOUIHATE, A.; NOORBAKHS, F.; PITTMAN, Q. J. Neonatal inflammation produces selective behavioural deficits and alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA in the adult rat brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 3, p. 644-653, feb. 2008. Erratum in: **European Journal of Neuroscience**, Calgary, v. 27, n. 8, p. 2210, apr. 2008.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neurosci Biobehav Rev.** California, v. 12, n. 2, p. 123-137, 1988.

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

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

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

HULL, E. M.; DU, J.; LORRAIN, D. S.; MATUSZEWICH, L. Extracellular dopamine in the medial preoptic area: implications for sexual motivation and hormonal control of copulation. **The Journal of Neuroscience**, Tallahassee, v. 15, p. 7465-7471, 1995.

HUNTINGFORD, F. A. Animals fight but do not make war. In: Groebel, J.; Hinde, R. A. Aggression and war – **Their Biological And Social Bases**, Cambridge: [s.n.], 1989. p. 228.

HUOTO, R.; GONZALEZ, M.; LADD, C.; THRIVIKRAMAN, K.; PLOTSKY, P. Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, p. 279-289, 2004.

INSEL, T. R.; HILL, J. L.; MAYOR, R. B. Rat pup ultrasonic isolation calls: possible mediation by the benzodiazepine receptor complex. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, New York, NY, v. 24, p. 1263-1267, 1986.

INSEL T. R.; MILLER, L. P.; GELHARD, R. E.; HILL, J. L. Rat pup isolation calls and the benzodiazepine receptor. In: Newman, J.D. (Ed.), **The Physiological Control of Mammalian Vocalization**. New York: Plenum, 1988. p. 331 – 442.

INSEL, T. R.; WINSLOW, J. T. Rat pup ultrasonic vocalisations: An ethologically relevant behavior responsive to anxiolytics. In: Olivier, B.; Mos, J.; Slangen, J.L. (Ed.), **Animal Models in Psychopharmacology**. Basel: Birkhäuser Verlag, 1991. p. 15-36.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004. p. 30.

KIRSTEN, T.B. **Avaliação comportamental e neuroquímica do papel masculino de ratas expostas pré-natalmente ao lipopolissacarídeo.** Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

KIRSTEN, T. B.; LIPPI, L. L.; BEVILACQUA, E. M. A. F.; PALERMO-NETO, J.; BERNARNDI, M. M. Prenatal exposure to lipopolysaccharide causes placental injuries in rats. In: IBEROAMERICAN CONGRESS OF NEUROIMMUNOMODULATION, 3., 2009, Buenos Aires.

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

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

LAMOUNIER, J. A.; VIEIRA, G. O.; GOUVÊA, L. C. Composição do Leite Humano - Fatores Nutricionais. In: REGO, J. D. **Alimentação Materna.** Rio de Janeiro, Atheneu. Rio de Janeiro 2001. p. 47-58.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiology and Behavior**, Davis, v. 73, n. 3, p. 255-260, 2001.

LUCION A. B.; CHARCHAT, H.; PEREIRA G. A.; RASIA-FILHO A. A. Influence of early postnatal gonadal hormones on anxiety in adult male rats. **Physiology and Behavior**, Porto Alegre, v. 60, p. 1419, 1996.

LEVITON, A. B.; 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.

LUCION, A. B.; DE ALMEIDA, R. M. On the dual nature of maternal aggression in rats. **Aggressive Behavior**, Porto Alegre, v. 22, p. 365-373, 1996.

MACKOWIAK, P. A.; BROWNE, R. G.; SOUTHERN, P. M.; SMITH, J. W. Polymicrobial sepsis: an analysis of 184 cases using log linear models. **American Journal of Physiology**, v. 280, n. 2, p. 73-80, 1980.

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

MARTIN, S. M.; MALKINSON, T. J.; VEALE, W. L.; PITTMAN, Q. J. Fever in pregnant, parturient, and lactating rats. **American Journal of Physiology**. Alberta, v. 268 n. 4, p. R919-R923, 1995.

MATTSON, M. P.; KLAPPER, W. Emerging roles for telomerase in neuronal development and apoptosis. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore v. 63, p. 1-9, 2001.

MAYER, A. D.; REIBISK, S.; SIEGEL, H. I.; ROSENBLATT, J. S. Maternal aggression in rats: Changes over pregnancy and lactation in a Sprague-Dawley strain. **Aggress Behavioral**, v. 13, p. 29-43, 1987.

MAYER, A. D.; ROSENBLATT, J. S. Hormonal factors influence the onset of maternal aggression in laboratory rats. **Hormones and Behavior**, v. 21, p. 253-267, 1987.

MERALI, Z.; LACOSTA, S.; ANISMAN, H. Effects of interleukin-1 $\beta$  and mild stress on alterations of norepinephrine, dopamine and serotonin neurotransmission: a regional microdialysis study. **Brain Research**, Ottawa, v. 761, n. 2, p. 225-235, 1997.

MEYER, U.; FELDON, J.; SCHEDLOWSKI, M.; YEE, B. K. Towards an immunoprecipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. **European Journal of Neuroscience**, Schwerzenbach, v. 29, n. 6, p. 913-947, 2005.

MICZEK, K. A., TORNATZKY, W., VIVIAN, J.. Ethology and neuropharmacology: Rodent ultrasounds. In: OLIVIER, B.; MOS, J.; SLANGEN, J.L. (Eds). **Animal Models of Psychopharmacology**. Basel: **Birkhäuser Verlag**, Basel, 1997. p. 409-427.

MIDDLEMIS-BROWN, J. E.; JOHNSON, E. D.; BLUMBERG, M. S. Separable brainstem and forebrain contributions to ultrasonic vocalizations in infant rats. **Behavioral Neuroscience**, Iowa, v. 119, p. 1111-1117, 2005.

MOUIHATE, A.; GALIC, M. A.; ELLIS, S. L.; SPENCER, S. J.; TSUTSUI, S.; PITTMAN, Q. J. Early Life Activation of Toll-Like Receptor 4 Reprograms Neural Anti-Inflammatory Pathways. **The Journal of Neuroscience**. Calgary, v. 30, n. 23, p. 7975-7983, 2010.

NEUMANN, E. J.; KLIEBENSTEIN, J. B.; JOHNSON, C. D.; MABRY, J. W.; BUSH, E. J.; SEITZINGER, A. H.; GREEN, A. L.; ZIMMERMAN, J. J.. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, p. 385-392, 2005.

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

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

NUMAN, M. Maternal behavior. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**. New York : Raven Press, 1994. p. 221-302.

NUMAN, M.; INSEL, T. R. **The neurobiology of parental behavior**. New York, Springer, 2003. p. 418.

OKON, E. E. Factors affecting ultrasound production in infant rodents. **Journal of Zoology**, v. 168, p. 139-148, 1972.

- 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 Clinic Investigation**, Munich, v. 93, p. 2600–2607, 1994.
- RIBEIRO, L. C.; KUZUHARA, J. S. W. Lactação. In: Silva, S. M. C. S.; MURA, J. D'AP. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, 2007. p. 293-318
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**, Mosby: 2001. v. 6, p. 253
- ROMERO, R.; ESPINOZA, J.; GONÇALVES, L. F.; KUSANOVIC, J. P.; FRIEL, L.; HASSAN, S. The role of inflammation and infection in preterm birth. **Seminars in Reproductive Medicine**, Maryland, v. 25, n. 1, p. 21-39, 2007.
- ROSENBLATT, J. S.; MAYER, A. D.; SIEGEL, H. I. Maternal behavior among the nonprimate mammals. In: ADLER, N.; PFAFF, D.; GOY, R. W. **Handbook of Behavioral neurobiology, Reproduction**. Plenum Press, New York: 1985. v. 7, p. 229-298.
- RUSSEL, J. A.; DOUGLAS, A. J.; WINDLE, R. J.; INGRAM, C. D. The maternal behavior: neurobiological and neuroendocrine adaptation and disorders in pregnancy and post partum. Amsterdam: **Elsevier Science BV**, 2001. p. 1-38.
- SALE, A., CENNI, M. C., CIUCCI, F., PUTIGNANO, E., CHIERZI, S., MAFFEI, L. Maternal enrichment during pregnancy accelerates retinal development of the fetus. **PLoS One**, Pisa, v. 2, p. 1160, 2007.
- 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**, Pasadena, v. 23, n. 1, p. 297-302, 2003.
- SILVA, M. R. P.; BERNARDI, M. M.; FELÍCIO, L. Effects of dopamine receptor antagonist on ongoing maternal behaviour in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, São Paulo, v. 68, p. 461- 468, 2001.
- SMOTHERMAN, W. P.; BELL, R. W.; STARZEC, I.; ZACHMAN, T. A. Maternal responses to infant vocalizations and olfactory cues in rats and mice. **Behavioral and Bioly**, London, v.13, p. 55–66, 1974.
- SPENCER, S. J.; HEIDA, J. G.; PITTMAN, Q. J. Early life immune challenge-effects on behavioural indices of adult rat fear and anxiety. **Behavioral and Brain Research**, Calgary, v. 7, p. 231–238, 2005.
- STERN, J. M. Multisensory regulation of maternal behavior and masculine sexual behavior: a revised view. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, New Jersey, v. 14, p. 183-200, 1990.
- STERN, J. M. Nursing posture is elicited rapidly in maternally naive, haloperidol-treated female and male rats in response to ventral trunk stimulation from active pups. **Hormones and Behavior**, New Jersey, v. 25, p. 504-571, 1991.

STERN, J. M. Nursing posture is induced in haloperidol-treated maternally-naive female and male rats in response to ventrum stimulation from active pups **Hormones and Behavior**, New Jersey, v. 25, p. 504- 517, 1991.

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

TENK, C.M.; KAVALIERS, M.; OSSENKOPP, K.P. Sexually dimorphic effects of neonatal immune system activation with lipopolysaccharide on the behavioural response to a homotypic adult immune challenge. **Developmental Neuroscience – Journal**, London, v. 26, p. 331-338, 2008.

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**, Chapel Hill, v. 47, n. 1, p. 27-36, 2001.

VOLTARELLI, J.C. Fever and Inflammation. **SEMIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA CLINICA. MEDICINA**. Ribeirão Preto, v. 27, n.1/2, p. 7-48, 1994.

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

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

WALKER, C. D.; PERRIN, M.; VALE, W.; RIVIER, C. Ontogeny of the stress response in therat: role of the pituitary and the hypothalamus. **Endocrinology**. v. 118, n. 4, p. 1445-1451, 1986.

WILLNER, P.; SCHEEL-KRUGER, J. The mesolimbic dopamine system: From motivation to action. New York: **John Wiley and Sons**, 1991. , p. 148-149.

YORTY, J. L.; SCHULTZ, S. A.; BONNEAU, R. H. Postpartum maternal corticosterone decreases maternal and neonatal antibody levels and increases the susceptibility of newborn mice to herpes simplex virus-associated mortality. **Journal of Neuroimmunology**, Hershey, v. 150, p. 48–58, 2004.