UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

THIAGO MARINHO REIS E SILVA

**Efeitos Transgeracionais da Administração Pré-Natal do Lipopolissacarídeo Sobre o
Comportamento e Sistema Imune de Camundongos Avaliados por Modelos de
Depressão**

São Paulo
2013

THIAGO MARINHO REIS E SILVA

**Efeitos Transgeracionais da Administração Pré-Natal do Lipopolissacarídeo Sobre o
Comportamento e Sistema Imune de Camundongos Avaliados por Modelos de
Depressão**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Psicologia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Neurociência e
Comportamento

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Martha
Bernardi

São Paulo

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Silva, Thiago Marinho Reis e.

Efeitos transgeracionais da administração pré-natal do lipopolissacarídeo sobre o comportamento e sistema imune de camundongos avaliados por modelos de depressão / Thiago Marinho Reis e Silva; orientadora Maria Martha Bernardi. -- São Paulo, 2013. 144 f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Comportamento Depressivo 2. Lipopolissacarídeo (LPS) 3. Transgeracional 4. Comportamento Maternal 5. Citocinas I. Título.

RC537

FOLHA DE APROVAÇÃO**Nome:** REIS-SILVA, Thiago Marinho**Título:** Efeitos Transgeracionais da Administração Pré-Natal do Lipopolissacarídeo Sobre o Comportamento e Sistema Imune de Camundongos Avaliados por Modelos de Depressão

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre.

Área de Concentração: Neurociência e Comportamento

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio de bolsa de mestrado concedida ao programa de pós-graduação em Neurociência e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (CAPES – Demanda Social).

Este trabalho faz parte do projeto temático "Neuroimunomodulação: fármacos, estresse e citocinas nas relações entre os sistemas nervoso, endócrino e imune", aprovado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo nº 99/04228-7 e 04/14128-0) e possui coordenação do Prof. Dr. João Palermo-Neto e colaboração da Prof.^a Dr.^a Maria Martha Bernardi.

Todos os experimentos desse trabalho foram realizados nas dependências do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família, aos meus pais Ademir e Cristina e ao meu irmão Lucas por todo apoio e suporte que me proporcionaram até então. Sem dúvida, isso foi essencial em minha formação e é graças a eles que hoje estou onde estou. Agradeço por todos os momentos, tanto os bons quanto os ruins, pois sei que foram todos eles e, não somente os bons, que me ajudaram a chegar aonde hoje estou. Obrigado.

Aos meus demais familiares que de alguma forma me acompanharam e me incentivaram em minhas escolhas e, que também, de alguma forma participaram da minha formação. Aos meus muitos tios e tias, primos e primas, avós e avós (presentes e ausentes). Obrigado.

Aos meus muitos amigos da pós graduação por todas as discussões científicas e os ótimos momentos que passamos juntos, sendo eles nos ajudando em algum experimento, batendo papo ou tomando uma cerveja. São momentos que eu sei, ainda irão se repetir muitas vezes. A Thaísa Sandini, Mariana Sayuri, Esther Ricci, Thiago Kirsten, Aline Ameni, Thalita Machado, Beatriz Dorr, Adriana Siqueira, Atílio Calefi, Eduardo Hamasato, Daniel Cohn, Lilian Namazu, Vanessa Carvalho, Natalia Moreira e muitas outras pessoas. São amigos que quero muito bem.

Aos meus amigos do Espaço Poiésis Psicologia, Paulo Unzer, Livia Zanin, Milton Nuevo, Gabriel Maia e Raonna Martins. Não tenho palavras pra vocês. São amigos queridos dos quais muito estimo. Aprendo muito com vocês tanto quanto me divirto de estar com vocês. São pessoas que sei poder contar e que sabem poder contar comigo sempre que precisarem.

Aos meus demais e grandes amigos que quero muito bem, Fernando Aguilera (praticamente meu outro irmão), Daniela Olorruama, Natalia Araujo e outros que não ousou citar pois certamente me esquecerei de alguém.

Aos muitos professores que passaram pela minha vida e ao grupo de neuroimunomodulação, do qual participo desde de 2008. Obrigado pela oportunidade e por toda a contribuição em minha formação.

Ao Prof. Dr. João Ricardo Sato da Universidade Federal do ABC pela grande ajuda na análise da estatística desse trabalho.

Aos funcionários do biotério do VPT pelos cuidados aos animais que utilizei ao longo de meu trabalho, em especial a Dona Idalina pelo presente suporte.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do VPT: Herculano, Nicolle e Vagner pelo auxílio nos experimentos e amizade.

Ao auxílio financeiro da CAPES, pelo qual foi possível me manter ao longo desse tempo. E ao apoio financeiro da FAPESP através do projeto temático. Sem dúvida, sem esse suporte não teria sido possível a realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociência e Comportamento do Instituto de Psicologia e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela oportunidade

Por último e mais importante, gostaria de agradecer a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Maria Martha Bernardi. Sei que se um dia eu me tornar metade da profissional que você é, eu terei chegado muito longe e terei muito orgulho. Obrigado por ter me ensinado o que é ciência e a tomar gosto por ela, obrigado pela dedicação e cuidado que você teve e ainda tem com a minha formação, mas acima de tudo, obrigado pela nossa amizade. Saiba que você é um exemplo de pessoa e é um modelo para mim. Mais do que aprender sobre ciência com você, eu aprendi a ser uma melhor pessoa. Obrigado.

*"Nada se obtém sem esforço;
tudo se pode conseguir com ele"*

Ralph Waldo Emerson (1803-1882)

Escritor, Poeta, Filósofo e Ensaísta Norte Americano

RESUMO

REIS-SILVA, T. M. **Efeitos Transgeracionais da Administração Pré-Natal do Lipopolissacarídeo Sobre o Comportamento e Sistema Imune de Camundongos Avaliados por Modelos de Depressão.** 2013. 145 f. Dissertação de Mestrado - Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2013

A depressão é hoje a doença mental mais comum do mundo, afetando mais de 121 milhões de pessoas. Além disso, estima-se que em aproximadamente uma década ela se torne a 2^o doença responsável pela perda prematura de vida entre todas as idades e sexos. Diferentes propostas foram feitas no intuito de se compreender os mecanismos pelos quais essa doença incide, contudo a etiologia dos transtornos depressivos ainda não é totalmente entendida. Existem consideráveis evidências de que a administração perinatal de lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina bacteriana, promove efeitos persistentes no desenvolvimento e comportamento da prole de camundongos, os quais podem-se manter até a idade adulta. Ainda, esses eventos podem ter implicações evolucionárias ligadas a alterações transgeracionais. Tendo em vista que a ativação do sistema imune pode estar relacionada com os transtornos depressivos, o presente trabalho expôs pré-natalmente ao LPS uma geração de camundongos avaliando os efeitos comportamentais dessa exposição em três gerações subsequentes levando-se em consideração os comportamentos depressivos e não depressivos de cada geração avaliada. Para isso camundongos fêmeas, após terem o comportamento selecionado pelo teste de suspensão da cauda (TSC), foram cruzadas com machos de mesmo comportamento recebendo 100µg/kg de LPS ou solução salina no 15^o dia de prenhez. Após os nascimentos, as gerações subsequentes tiveram o comportamento em questão avaliado pelo TSC, bem como a atividade geral em campo aberto. Além disso, a interação materno-filhote foi avaliada, uma vez que alterações na mesma poderiam contribuir para os efeitos do tratamento com a endotoxina. Ainda, foi-se realizado um desafio com LPS na geração filial 3, na qual o nível de citocinas e a expressão do comportamento doentio foram avaliadas. Os resultados mostraram que (i) a administração do LPS na geração parental não afetou o comportamento depressivo e não depressivo nas três gerações avaliadas, dado que animais com comportamento depressivo tiveram mais filhotes com o mesmo comportamento em todas as gerações. (ii) Foram observadas alterações no comportamento materno da geração parental, possivelmente ligadas a motivação materna desses animais. (iii) Foram encontradas alterações transgeracionais na atividade geral de camundongos machos e fêmeas das gerações filiais 1 e 2. Tais alterações foram mais

expressivas nos machos e, havendo diferenças entre o comportamento. Esses dados apontam que a exposição a endotoxina possui diferentes consequências de acordo com o comportamento e, (iv) os animais da geração filial 3 quando desafiados com a endotoxina apresentaram maior comportamento doentio e maiores níveis de citocinas. Esses dados apontam para um forte componente genético na transmissão do comportamento, além de, uma influencia epigenética na modulação do mesmo. Ainda, foi possível concluir que a inflamação gerada pela administração pré-natal do LPS atua de forma distinta entre os sexos, bem como o histórico comportamental, no caso, o comportamento depressivo e não depressivo estudados nesse trabalho.

Palavras chave: Comportamento Depressivo, Lipopolissacarídeo (LPS), Transgeracional, Comportamento Maternal, Citocinas

ABSTRACT

REIS-SILVA, T. M. **Transgenerational Effects of Prenatal Lipopolissacaride Exposure on The Behavior and Immune System of Mice Rated by Animal Models of Depression.** 2013. 145 f. Dissertação de Mestrado - Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2013

Depression disorders are to be considered the most common mental illness affecting more than 121 million people worldwide. It is estimated that approximately one decade it becomes the 2nd disease most responsible for premature loss of life of all ages and sexes. Different proposals to understand this disorders have been made in the past years, however its etiology it is still yet fully understood. There is considerable evidence that the administration of lipopolysaccharide (LPS), a bacterial endotoxin, promotes persistent effects on development and behavior of the offspring of mice, which are maintained into adulthood. Still, these events may have evolutionary implications related to transgenerational changes. Given that activation of the immune system may be related to depressive disorders, this study aimed to expose a generation of mice to LPS evaluating the behavioral effects on three subsequent generations taking into account the depressive-like and non depressive-like behaviors assessed on each generation by the tail suspension test (TST). For this, female mice after behavior selected by the tail suspension test (TST) were crossed with males of the same behavior and exposed to 100µg/kg of LPS or saline solution on day 15th of pregnancy. After births, the subsequent generations were also evaluated on the TST and in the open field for general activity. In addition, the maternal interaction was also evaluated, since changes on this parameter could contribute to the treatment effects of the endotoxin. Yet, has been performed a challenge with LPS in the generation branch 3, wherein the level of expression of cytokines and sickness behavior were evaluated. The results showed that (i) the administration of LPS in the parental generation did not affect the depressive-like behaviors on the three generations evaluated, since animals with depressive-like and non depressive-like behavior had more offspring with the same behavior in all generations. (ii) Changes were observed in maternal behavior of the parental generation which is possibly related to a change in motivational state of those animals. (iii) Transgenerational alterations were found in the general activity of male and female mice of the filial generation 1 and 2. These changes were more significant in males and differences between depressive-like e non depressive-like behaviors were also observed. Together, these data indicate that the exposure to endotoxin has different consequences according to the animal historical behavior and,

finally, (iv) the animals of filial generation 3 when challenged with endotoxin had higher sickness behavior and higher levels of cytokines when evaluated in the open field test. These data point to a strong genetic component in the transmission of behavior and, besides, a possible influence of epigenetic mechanism of the same. Furthermore it was possible to concluded that inflammation state created by the prenatal LPS exposure acts differently according to the animal historical behavior, in this case, the depressive-like and non depressive-like behavior studied, and also acting differently according to the sexes.

Keywords: Depressive-like behavior, lipopolysaccharide (LPS), Transgenerational, Maternal Behavior, Cytokines

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estresse e o eixo HPA. Resposta normal ao estresse (esquerda) envolvendo a liberação de CRF decorrente da ativação do hipotálamo, liberação de ACTH pela hipófise e consequente liberação de glicocorticoides pela glândula suprarrenal, inibindo a liberação de CRF. No caso de aumento de intensidade e exposição ao estresse, há excessiva liberação de glicocorticoides, podendo atrofiar a atividade hipocampal, desinibindo por sua vez o eixo HPA (adaptado de STAHL, 2010). 6
- Figura 2 - Mecanismo de Ação do LPS no macrófago. O principal mecanismo por onde o LPS é percebido é via a proteína de ligação, a LBP-LPS, entrando em contato com receptores CD14 e depois sinalizadas aos receptores Toll-like 4 (TLR4). Essa ativação contribui para a ação de receptores TLR4 juntamente com outras proteínas dando início a um sinal transmembrana. Nesse momento, uma série de reações em cascata ocorre dentro dos macrófagos até a ativação da NF-kB que ativa a síntese de citocinas pró-inflamatórias (Adaptado de COHEN, 2002). 10
- Figura 3 - Vias não genômicas de alterações no desenvolvimento. Fatores como drogas, nutrição, toxina e idade podem levar a alterações epigenéticas (círculo vermelho). Essas alterações por sua vez poderão ser transmitidas à prole com consequências para a variação fenotípica. Ainda, essas alterações poderão afetar o investimento pré-natal e / ou pós-natal materno (adaptado de CURLEY; MASHOODH; CHAMPAGNE, 2011). 13
- Figura 4 - Aparato utilizado no teste de suspensão da cauda para camundongos (adaptado de STERU et al., 1985). 20
- Figura 5 - Cuba de acrílico circular transparente utilizada no teste de nado forçado (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977). 21
- Figura 6 - Parâmetros do comportamento maternal. Agrupamento de filhotes (A), preparo da postura de amamentação (B), “crouching” ou cifose fisiológica (C) e comportamento maternal total (D) (NUMAN, 1994). 23
- Figura 7 - Arena circular do teste de campo aberto para avaliação da atividade geral de roedores (ARCHER, 1973). 24
- Figura 8 - Etapas desenvolvidas em ordem cronológica 28
- Figura 9 - Tempo de imobilidade em segundos de camundongos machos avaliados inicialmente pelo teste de suspensão da cauda (fig. 9-A) e após 14 dias pelo teste de natação forçada (fig. 9-B). Ainda, é mostrado a comparação dos resultados obtidos em ambos os testes (fig. 9-C). Para as fig. 9-A (Não Depressivo n=8, Intermediário n=15, Depressivo n=7) e 9-B (Não Depressivo n=3, Intermediário n=22, Depressivo n=5) os resultados expressam a média e $\pm$ S.E.M., ANOVA de uma via. Para a fig. 9-C os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M, ANOVA de duas vias. Considera-se significância quando $P < 0,05$. 32

- Figura 10 - Testes de Suspensão da Cauda: tempo de imobilidade em segundos dos camundongos machos da GF1, GF2 e GF3, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de Lps ou solução salina, via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam à média $\pm$ S.E.M, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; (GF1: não depressivo salina n=24, não depressivo LPS n=23, depressivo salina n=19, depressivo LPS n=31; GF2: não depressivo salina n=19, não depressivo LPS n=17, depressivo salina n=22, depressivo LPS n=20; GF3: não depressivo salina n=14, não depressivo LPS n=11, depressivo salina n=20, depressivo LPS n=24). Considera-se significância quando $P < 0,05$. 36
- Figura 11 - Teste de Suspensão da Cauda: comparação transgeracional entre o tempo de imobilidade em segundos dos camundongos machos depressivos da GF1, GF2 e GF3, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg LPS ou solução salina, via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam à média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey; (GF1: depressivo salina n=19, depressivo LPS n=31; GF2: depressivo salina n=22, depressivo LPS n=20; GF3: depressivo salina n=20, depressivo LPS n=24); considera-se significância quando $P < 0,05$. 38
- Figura 12 - Teste de Suspensão da Cauda: comparação transgeracional entre o tempo de imobilidade em segundos dos camundongos machos não depressivos da GF1, GF2 e GF3, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de salina ou LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam à média e o S.E.M, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; (F1: não depressivo salina n=24, não depressivo LPS n=23; F2: não depressivo salina n=19, não depressivo LPS n=17; F3: não depressivo salina n=14, não depressivo LPS n=11); considera-se significância quando $P < 0,05$. 40
- Figura 13 - Testes de Suspensão da Cauda: tempo de imobilidade em segundos dos camundongos fêmeas da GF1, GF2 e GF3, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de LPS ou solução salina, i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam à média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; (GF1: não depressivo salina n=19, não depressivo LPS n=18, depressivo salina n=24, depressivo LPS n=27; GF2: não depressivo salina n=25, não depressivo LPS n=23, depressivo salina n=34, depressivo LPS n=28; GF3: não depressivo salina n=14, não depressivo LPS n=3, depressivo salina n=20, depressivo LPS n=25); considera-se significância quando $P < 0,05$. 42
- Figura 14 - Teste de Suspensão da Cauda: comparação transgeracional entre o tempo de imobilidade em segundos dos camundongos fêmeas depressivas da GF1, GF2 e GF3, cuja GP foi exposta a 100 µg/Kg de LPS ou solução salina, i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam à média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey; (GF1: depressivo salina n=24, depressivo LPS n=27; F2: depressivo salina n=34, depressivo LPS n=28; GF3: depressivo salina n=20, depressivo LPS n=25); considera-se significância quando $P < 0,05$. 43
- Figura 15 - Teste de Suspensão da Cauda: comparação transgeracional entre o tempo de imobilidade em segundos dos camundongos fêmeas não depressivas das GF1, GF2 e GF3, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de LPS ou solução salina, via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam à média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey; (GF1: não depressivo salina n=19, não depressivo LPS n=18; GF2: não

depressivo salina n=25, não depressivo LPS n=23; GF3: não depressivo salina n=11, não depressivo LPS n=3); considera-se significância quando $P < 0,05$.

45

Figura 15 - Campo Aberto: distância percorrida em centímetros dos camundongos machos da GF1 e GF2 selecionados pelo teste de suspensão da cauda, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de solução salina ou LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média ± S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

61

Figura 16 - Campo Aberto: velocidade média em centímetros por segundos dos camundongos machos da GF1 e GF2 selecionados pelo teste de suspensão da cauda, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de solução salina ou LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média ± S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

63

Figura 17 - Campo Aberto: tempo de imobilidade em segundos dos camundongos machos da GF1 e GF2 selecionados pelo teste de suspensão da cauda, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de solução salina ou LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média e o S.E.M. de uma ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

65

Figura 18 - Campo Aberto: frequência de imobilidade dos camundongos machos da GF1 e GF2 selecionados pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média ± S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

67

Figura 19 - Campo Aberto: tempo de permanência na periferia da arena em segundos dos camundongos machos da GF1 e GF2 selecionados pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média ± S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

69

Figura 20 - Campo Aberto: frequência de entradas na periferia da arena dos camundongos machos da GF1 e GF2 selecionados pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média ± S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

71

Figura 21 - Campo Aberto: tempo de permanência no centro da arena em segundos dos camundongos machos da GF1 e GF2 selecionados pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média ± S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

73

Figura 22 - Campo Aberto: frequência de entradas no centro da arena dos camundongos machos da GF1 e GF2 selecionados pelo teste de

suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

75

Figura 23 - Campo Aberto: distância percorrida em centímetros das camundongos fêmeas da GF1 e GF2 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda, cuja GP fora exposta a 100 $\mu\text{g/Kg}$ de solução salina ou LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

77

Figura 24 - Campo Aberto: velocidade média em centímetros por segundos dos camundongos fêmeas da GF1 e GF2 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda, cuja GP fora exposta a 100 $\mu\text{g/Kg}$ de solução salina ou LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

79

Figura 25 - Campo Aberto: tempo de paradas em segundos dos camundongos fêmeas da GF1 e GF2 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda, cuja GP fora exposta a 100 $\mu\text{g/Kg}$ de solução salina ou LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

81

Figura 26 - Campo Aberto: frequência de imobilidade dos camundongos fêmeas da GF1 e GF2 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

83

Figura 27 - Campo Aberto: tempo de permanência na periferia da arena em segundos dos camundongos fêmeas da GF1 e GF2 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

85

Figura 28 - Campo Aberto: frequência de entradas na periferia da arena dos camundongos fêmeas da GF1 e GF2 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

87

Figura 29 - Campo Aberto: tempo de permanência no centro da arena em segundos dos camundongos fêmeas da GF1 e GF2 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

89

Figura 30 - Campo Aberto: frequência de entradas no centro da arena dos camundongos fêmeas da GF1 e GF2 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$. 91

Figura 31 - Campo Aberto: distância percorrida (31-A), velocidade média (31-B), tempo de imobilidade (31-C) e frequência de imobilidade (31-D) dos camundongos machos da GF3 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda e desafiados com 100µg/kg de LPS e, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p. no 15º dia de prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=7 para Não Depressivo Salina, n=6 para não Depressivo LPS, n=7 para Depressivo Salina e n=10 para Depressivo LPS; considera-se significância quando $P < 0,05$. 93

Figura 32 - Campo Aberto: tempo de permanência na periferia (32-A), frequência de entradas na periferia (32-B), tempo de permanência no centro (32-C) e frequência de entradas no centro da arena (32-D) dos camundongos machos da GF3 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda e desafiados com 100µg/kg de LPS e, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p. no 15º dia de prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=7 para Não Depressivo Salina, n=6 para não Depressivo LPS, n=7 para Depressivo Salina e n=10 para Depressivo LPS; considera-se significância quando $P < 0,05$. 95

Figura 34 - Campo Aberto: tempo de permanência na periferia (34-A), frequência de entradas na periferia (34-B), tempo de permanência no centro (34-C) e frequência de entradas no centro da arena (34-D) no teste de campo aberto das camundongos fêmeas da GF3 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda e desafiados com 100µg/kg de LPS e, cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M.,; Teste t de Student; n = 10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$. 99

Figura 35 - Expressão de IL-1 α de camundongos machos (Fig. 35-A) e fêmeas (Fig. 35-B) da GF3 selecionados pelo teste de suspensão da cauda, desafiados com 100 µg/Kg de LPS e avaliados nos teste de campo aberto, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; Machos: n=7 para Não Depressivo Salina, n=6 para não Depressivo LPS, n=7 para Depressivo Salina e n=10 para Depressivo LPS; Fêmeas: n=5 para Não Depressivo Salina, n=2 para não Depressivo LPS, n=10 para Depressivo Salina e n=10 para Depressivo LPS; considera-se significância quando $P < 0,05$. 102

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Efeitos da exposição materna ao LPS (100µg/kg no 15º dia de prenhez) ou solução salina no número de camundongos machos com comportamento Não Depressivo e Depressivo das GF1, GF2 e GF3. 33
- Tabela 2 - Efeitos da exposição materna ao LPS (100µg/kg no 15º dia de prenhez) ou solução salina no número de camundongos fêmeas com comportamento Não Depressivo e Depressivo das GF1, GF2 e GF3. 34
- Tabela 3 - Teste de Comportamento Materno: escore da latência de recuperação dos 4 primeiros filhotes no DPN5 das mães da GP, GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina, via i.p no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam à média ± S.E.M., ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey; (GP: não depressivo salina n=6, não depressivo LPS n=6, depressivo salina n=6, depressivo LPS n=8; GF1: não depressivo salina n=7, não depressivo LPS n=6, depressivo salina n=9, depressivo LPS n=9; GF2: não depressivo salina n=3, não depressivo LPS n=3, depressivo salina n=7, depressivo LPS n=7); considera-se significância quando $P < 0,05$. 53
- Tabela 4 - Teste de Comportamento Materno: escore do comportamento maternal total no DPN5 dos camundongos fêmeas da GP, F1 e F2, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam à média ± S.E.M., ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; (GP: não depressivo salina n=6, não depressivo LPS n=6, depressivo salina n=6, depressivo LPS n=8; F1: não depressivo salina n=7, não depressivo LPS n=6, depressivo salina n=9, depressivo LPS n=9; F2: não depressivo salina n=3, não depressivo LPS n=3, depressivo salina n=7, depressivo LPS n=7); considera-se significância quando $P < 0,05$. 59
- Tabela 5 - Distância percorrida, velocidade média, tempo de imobilidade, frequência de imobilidade, tempo de permanência na periferia, frequência de entradas na periferia, tempo de permanência no centro e frequência de entradas no centro da arena no teste de campo aberto das camundongos fêmeas da GF3 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda e desafiados com 100µg/kg de LPS e, cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de prenhez. Os resultados expressam à média ± S.E.M., *Test t de Student*, $n = 10$ para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$. 96
- Tabela 6 - Expressão de IL-1β de camundongos fêmeas da GF3 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda e desafiados com 100µg/kg de LPS no teste de campo aberto e, cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de prenhez. Os resultados expressam à média ± S.E.M., *Test t de Student*, $n = 10$ para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$. 101

LISTA DE SIGLAS

ACTH - Hormônio Adrenocoticotrópico

CRF - Fator de Liberação de Corticotrofina

DG - Dia de Gestação

DPN - Dia de Lactação

FMVZ-USP - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

GF - Geração Filial

GP - Geração Parental

HPA - Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (pituitária)

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

I.P. - Intraperitoneal

LBP - *lipopolysaccharide binding protein*

LPS - Lipopolissacarídeo

NaCl - Cloreto de Sódio

NF- κ B - *nuclear factor-kappa B*

SNC - Sistema Nervoso Central

TDM - Transtorno Depressivo Maior

TLR4 - Toll-Like 4

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

TNF - Teste do nado Forçado

TSC - Teste de Suspensão da Cauda

VPT - Departamento de Patologia Experimental Comparada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 TRANSTORNO DE HUMOR DEPRESSIVO	2
1.2 DEPRESSÃO E SISTEMA IMUNE	3
1.3 ESTRESSE, CITOCINAS E SISTEMA IMUNE	4
1.4 LIPOPOLISSACARÍDEO E SEU MECANISMO DE AÇÃO	8
1.5 COMPORTAMENTO DOENTIO	10
1.6 EPIGENÉTICA E OS EFEITOS TRANSGERACIONAIS	11
1.7 DOENÇAS PSIQUIÁTRICAS E ESTUDOS PRÉ-NATAIS	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 ANIMAIS	18
3.2 ACASALAMENTO	18
3.3 DROGAS E SOLUÇÕES	19
3.4 TRATAMENTO	19
3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS	19
3.5.1 Tempo de imobilidade pelo teste de suspensão da cauda (TSC)	20
3.5.2 Tempo de imobilidade pelo teste de nado forçado (TNF)	21
3.5.3 Teste de cuidado maternal	22
3.5.4 Atividade geral no teste de campo aberto	23
3.6. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE INTERLEUCINA IL-1 α	24
3.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
3.7.1 Experimento 1 - Comparação dos modelos de Depressão: Teste da natação forçada vs Teste de suspensão da cauda	25
3.7.2 Experimento 2 - Avaliação dos tempos de imobilidades dos camundongos machos e fêmeas da GF1, GF2 e GF3, na qual a GP recebeu 100 μ g/kg no 15º dia de prenhez ...	26
3.7.3 Experimento 3 - Avaliação do comportamento maternal de camundongos da GP, GF1 e GF2 no dia pós-natal 5	26
3.7.4 Experimento 4 - Avaliação dos camundongos machos e fêmeas da GF1 e GF2 no teste de campo aberto	27
3.7.5 Experimento 5 - Avaliação do comportamento dos camundongos machos e fêmeas da GF3 desafiados com LPS no teste de campo aberto	27
3.7.6 Experimento 6 - Avaliação da expressão de IL-1 α de camundongos machos e fêmeas da GF3 desafiados com LPS no teste de campo aberto	27
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4. RESULTADOS	31
4.1 EXPERIMENTO 1 - COMPARAÇÃO DOS MODELOS DE DEPRESSÃO: TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA VS TESTE DE SUSPENSÃO DA CAUDA	31
4.2 EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DO TEMPO DE IMOBILIDADE DOS CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS DA GF1, GF2 E GF3 EM QUE A GERAÇÃO PARENTAL RECEBEU 100 μ G/KG NO 15º DIA DE PRENHEZ	32
4.3 EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNAL DE CAMUNDONGOS DA GP, GF1 E GF2 NO DIA PÓS-NATAL 5	45
4.4 EXPERIMENTO 4 - AVALIAÇÃO DOS CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS DA GF1 E GF2 NO TESTE DE CAMPO ABERTO	60

4.5 EXPERIMENTO 5 - AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOS CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS DA GF3 DESAFIADOS COM LPS NO TESTE DE CAMPO ABERTO	91
4.6 EXPERIMENTO 6 - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IL-1 α DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS DA GF3 DESAFIADOS COM LPS NO TESTE DE CAMPO ABERTO	100
5. DISCUSSÃO	104
5.1 DISCUSSÃO 1 - COMPARAÇÃO DOS MODELOS DE DEPRESSÃO E AS DIFERENÇAS NA EXPRESSÃO TRANSGERACIONAL DO COMPORTAMENTO DEPRESSIVO E COMPORTAMENTO MATERNO	104
5.2 DISCUSSÃO 2 - DIFERENÇAS TRANSGERACIONAIS NA EXPRESSÃO DO COMPORTAMENTO NA AVALIAÇÃO EM CAMPO ABERTO DA GF1 E GF2	107
5.3 DISCUSSÃO 3 - DESAFIO COM LPS E A EXPRESSÃO DO COMPORTAMENTO E SISTEMA IMUNE DA GF3	111
6. CONCLUSÕES	115
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
8. ANEXOS	124
8.1 FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE BIOÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA	124

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO DE HUMOR DEPRESSIVO

Os transtornos de humor são caracterizados por quadros onde há uma predominante perturbação do humor, sendo o mais comum entre esses transtornos a depressão. A depressão é hoje a doença mental mais comum do mundo, afetando mais de 121 milhões de pessoas e, além disso, estima-se que em aproximadamente uma década ela se torne a 2º doença responsável pela perda prematura de vida entre todas as idades e sexos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Dentre as diversas formas de depressão, o transtorno depressivo maior (TDM), caracterizado pelo quadro clínico de episódios isolados ou recorrentes de tristeza e perda de libido por quase todas as atividades habituais por período mínimo de duas semanas, é o mais recorrente (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994; VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008; MOREIRA et al., 2009). Semelhante às doenças cardiovasculares isquêmicas ou diarreicas, estima-se que o TDM afete 4,4% da população mundial (Mann, 2005) e em populações clínicas a incidência é maior, com cerca de 5% a 10% em pacientes ambulatoriais e 9% a 16% em pacientes internados. De fato, a depressão é companheira frequente de quase todas as doenças crônicas clínicas, estando associada ao aumento da morbidade e mortalidade por suicídio e piora de prognóstico de outras doenças (TENG; HUMES; DEMETRIO, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

A depressão é uma das causas do crescente aumento dos gastos em saúde pública, uma vez que fatores como baixa aderência a tratamentos e recomendações médicas, bem como aumento nos dias de incapacitação dos pacientes tendem a aumentar quando a depressão está associada a outros quadro clínicos (TENG; HUMES; DEMETRIO, 2005).

Ainda, sua incidência difere entre os sexos, sendo a probabilidade de ocorrência de um episódio depressivo ao longo da vida de 13% para homens e cerca de 30% para mulheres. Nos Estados Unidos, espectros mais graves de depressão atingem em média 2 a 5% da população e aproximadamente 20% sofrem de formas mais leves. Em média, 60% das pessoas acometidas pela depressão são afetadas por um alto prejuízo ocupacional e social (MURRAY; LOPEZ, 1997). De acordo com Moussavi et al. (2007), pessoas que sofrem com doenças crônicas possuem significativamente mais chance de apresentar depressão em algum momento de suas vidas.

Uma grande proporção das pessoas que vivenciam a depressão, no pior dos cenários, cometam suicídio, uma questão que atinge mais de um milhão de pessoas anualmente. A Organização Mundial da Saúde (2012) estima que 5% da população apresentou esse transtorno no ano anterior e, infelizmente, menos de 25% das pessoas afetadas atualmente tem acesso a tratamentos efetivos. E, em alguns casos, essa média é inferior a 10%.

1.2 DEPRESSÃO E SISTEMA IMUNE

Nos últimos 40 anos, as bases biológicas da depressão são discutidas sob o prisma da hipótese monoaminérgica, cuja proposta relaciona a depressão como consequência da menor disponibilidade das aminas biogênicas cerebrais. Diferentes observações ao longo dos anos deram suporte a essa teoria ao longo dos anos, mas começaram na década de 1960 com Schildkraut e Kety (1967), no qual foi proposto que a depressão era um produto da diminuição da noradrenalina cerebral, como também o papel da serotonina, observado por Lapin e Oxenkrug (1969).

Essa teoria foi e ainda é muito discutida, uma vez que seus desdobramentos são reforçados pelo conhecimento acerca das ações dos primeiros antidepressivos, que contribuem com uma melhor disponibilidade de neurotransmissores como serotonina, dopamina e noradrenalina nas fendas sinápticas (BAHLS, 1999; VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008). No entanto, a etiologia da depressão ainda possui diversas lacunas, o que levou a novas perguntas a respeito de suas bases e desdobramentos.

Atualmente, estudos que buscam compreender a comunicação entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imune levaram a novas questões sobre como o sistema imunológico estaria envolvido nos processos neuropatológicos (MILLER; PARIANTE; PEARCE, 1999).

Dado que o TDM é um quadro psiquiátrico no qual já se foi descrito existir relações à alterações no sistema imune (KRONFOL et al., 1983; IRWIN; GILLIN, 1987; MAES, 1995; 1999; NUNES et al., 2002), novos trabalhos passaram a olhar a depressão como um fenômeno psiconeuroimunológico, baseando-se na hipótese de que o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias resultaria na sintomatologia observada no TDM (SCHIEPERS; WICHES; MAES, 2005; VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008).

Segundo Alves & Palermo Neto (2007) o estudo das interações entre o sistema imune e SNC, assim como os mecanismos pelas quais essa interação incide, com as devidas consequências fisiológicas e patológicas tem despertado o interesse de inúmeros grupos de pesquisa. Assim, as alterações fisiológicas, principalmente aquelas em

resposta ao estresse culminaram na concepção do que é chamado Psiconeuroimunologia ou Neuroimunomodulação.

Segundo Ader (2000), a Psiconeuroimunologia é a ciência que busca entender as interações entre comportamento, funções neurais, endócrinas e os processos imunes, no qual o organismo deve ser considerado como um todo, integrando os meios internos e externos nos quais o comportamento e a resposta imune incidem.

Hugo Besendovsky, na década de 70, também avaliou as interações entre os sistemas nervoso e imune. Em 1975, demonstrou 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 efeito 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 enquadrariam e podem ser definidos como comportamento doentio (AVITSUR; YIRMIYA, 1999).

1.3 ESTRESSE, CITOCINAS E SISTEMA IMUNE

Diversos mecanismos do SNC contribuem para a modulação da resposta imune. Um dos mais estudados é o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que pode contribuir para o desenvolvimento de transtornos ansiosos ou mesmo um TDM dependendo da influência e exposição a fatores estressantes (ALVES; PALERMO-NETO, 2007).

O termo estresse foi descrito pela primeira vez na área da saúde em 1936 pelo endocrinologista Hans Selye. O estresse foi definido como o resultado de qualquer demanda produzida sobre o corpo por diferentes agentes, como por exemplo tal como a temperatura, traumas físicos, intoxicações, exercícios físicos e, em particular, processos inflamatórios (SELYE, 1984). Dependendo de sua intensidade, o estresse pode se tornar um precipitador, como também mantenedor de diversas doenças mentais, tais como a depressão, esquizofrenia, entre outras (PAYKEL; COOPER, 1992).

A resposta adequada frente ao estresse (Fig. 1) por parte do eixo HPA consiste no aumento do fator de liberação de corticotrofina (CRF), que por sua vez estimula a liberação do hormônio adrenocoticotrópico (ACTH) pela hipófise e a consequente liberação de glicocorticoides pela glândula suprarrenal. Os glicocorticoides por sua vez exercem *feedback* negativo, inibindo a liberação de CRF. A ativação do eixo HPA e a decorrente produção dos glicocorticoides durante um período de estresse é um dos principais mecanismos responsáveis por alterações da resposta imune, dado seus efeitos antiinflamatórios e imunossupressores (STAHL, 2010).

Alterações no eixo HPA e o aumento ou diminuição na produção de glicocorticoides culminam em desequilíbrios imunológicos. No caso, a hiperatividade do eixo e o decorrente excesso de liberação de glicocorticoides aumenta a imunossupressão bem como a suscetibilidade à infecções (PALMA et al., 2007)

Os glicocorticoides têm importante função em diferentes respostas fisiológicas, preparando o organismo na adaptação frente ao estresse. Entretanto, a intensidade do fator estressante, tanto quanto o tempo de exposição, contribuem com uma maior liberação de glicocorticoides no eixo HPA, ocasionando uma resposta anormal frente ao estresse (Fig. 1). Ao contrário de cessarem rapidamente, os hormônios CRF e ACTH permanecem elevados. Consequentemente há maior exposição de glicocorticoides podendo lesar ou mesmo atrofiar o hipocampo, impedindo que o mesmo iniba o eixo HPA (STAHL, 2010). Ainda, pacientes que se encontram em quadros depressivos demonstram estar com a atividade do eixo HPA alterada (JOCA; PADOVAN; GUIMARAES, 2003).

Figura 1 - Estresse e o eixo HPA. Resposta normal ao estresse (esquerda) envolvendo a liberação de CRF decorrente da ativação do hipotálamo, liberação de ACTH pela hipófise e consequente liberação de glicocorticoides pela glândula suprarrenal, inibindo a liberação de CRF. No caso de aumento de intensidade e exposição ao estresse, há excessiva liberação de glicocorticoides, podendo atrofiar a atividade hipocampal, desinibindo por sua vez o eixo HPA (adaptado de STAHL, 2010).

O aumento de glicocorticoides e a hiperativação do eixo HPA também estão relacionados ao aumento no nível de citocinas plasmáticas que também podem ter relação com a sintomatologia da depressão. Assim, já foi demonstrado que em pacientes com TDM há aumento de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (MAES, 1995; 1999; SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005).

As citocinas são um grupo diversificado de proteínas regulatórias de baixo peso molecular produzidas por células imunocompetentes, tais como linfócitos e macrófagos, a fim de regular as respostas imunitárias. Além disso, podem atuar de forma autócrina, parácrina e também como hormônios (THOMPSON, 1998; SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005; MARQUES; CIZZA; STERNBERG, 2007; VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008).

As citocinas têm a função de combater diferentes patógenos. De acordo com Aderem e Ulevitch (2000) e Avitsur e Yirmiya (1999), ela atua no sistema imune de forma a reconhecer partículas invasoras, como também em respostas adaptativas.

As citocinas são grandes mediadores polipeptídicos responsáveis pela regulação do crescimento, como pela diferenciação de diversos tipos de células. Elas atuam não somente no processo inflamatório local, mas também mediam diversas respostas a infecção e inflamação, tal como a febre, o comportamento doentio e alterações neuroendócrinas (TURNBULL; RIVIER, 1999).

Assim, a partir da observação de suas diversas consequências sobre o organismo, surgiu a hipótese citocinérgica da depressão, sugerindo que as citocinas desempenhem papel fundamental como mediadores de sua fisiopatologia. Nesse sentido, as citocinas quando em excesso no organismo, devido a um estresse psicológico ou mesmo a febre, contribuem para com a hiperatividade do eixo HPA. Isso interfere negativamente com o seu *feedback* e, por conseguinte, eleva a produção dos níveis de citocinas produzidas, como por exemplo através dos macrófagos (SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005).

As citocinas são capazes de interferir com a atividade do eixo HPA, contribuindo com a maior liberação de CRF e ACTH, ocasionando o aumento de glicocorticoides (AVITSUR; POLLAK; YIRMIYA, 1997; MEYER et al., 2005). De acordo com O'Brien, Scott e Dinan (2004), as citocinas pro-inflamatórias TNF- α , IL-1 e IL-6 são estimulantes primárias do eixo HPA.

Contudo, os níveis de proteína e RNAm dessas citocinas são normalmente baixas em sujeitos normais, sendo necessário uma infecção ou processo inflamatório para causar aumentos dramáticos em sua síntese. Todavia, não é surpresa que as citocinas tenham um grande efeito sobre o eixo HPA, uma vez que uma grande abundância de seus receptores nessa região (TURNBULL; RIVIER, 1999).

Em relação a depressão, a importância das citocinas foi estabelecido por meio da observação comportamental de pacientes cujo tratamento realizado com uma classe de citocinas denominadas Interferons apresentaram comportamento doentio, com sinais e sintomas típicos observado em pacientes depressivos (O'BRIEN; SCOTT; DINAN, 2004).

1.4 LIPOPOLISSACARÍDEO E SEU MECANISMO DE AÇÃO

O Lipopolissacarídeo (LPS) é parte integrante da parede celular de bactérias gram-negativas. É constituído por um lipídio complexo denominado lipídio A, ao qual um polissacarídeo constituído de um núcleo (também chamado de *core*) e de uma cadeia terminal de unidades repetidas está ligado. O lipídio A consiste em unidades dissacarídicas de glicosamina fosforilada às quais se liga a diversos ácidos graxos de cadeia longa, podendo isto sofrer variações dependendo da espécie bacteriana (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000). Uma das principais fontes do LPS é a bactéria *Escherichia coli*, obtida a partir de um processo de extração fenólica (MINS et al., 1999).

O LPS é extremamente tóxico aos animais e apresenta efeitos em concentrações menores que 1nN. É denominado dessa forma como endotoxina das bactérias gram negativas, visto que está fortemente ligado à superfície celular (ADEREM; ULEVITCH, 2000).

O núcleo do polissacarídeo é análogo em todas as espécies gram-negativas que possuem LPS, no entanto, cada espécie possui uma unidade de repetição particular. Essas unidades são geralmente constituídas por trissacarídeos lineares ou em tetra ou pentassacarídeos ramificados (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

Seres humanos são expostos a pequenas doses de LPS em casos de infecções. A própria ingestão de álcool e/ou problemas intestinais também contribuem com o aumento da permeabilidade do LPS do trato gastrointestinal para o sangue (XU et al., 2006). Ao entrar em contato com o organismo, seja por sua administração direta ou a partir de uma bactéria gram-negativa, o LPS pode atuar em diferentes células, tais como neutrófilos, monócitos, células endoteliais e plaquetas sanguíneas. Entretanto, segundo Saluk-Juszczak e Wachowicz (2005), as principais estruturas onde o mecanismo de ação do LPS é deflagrado são os macrófagos.

O mecanismo de ação (Fig. 2) tem início com o LPS acoplando-se ao *lipopolysaccharide binding protein* (LBP), produzidas no fígado. Assim é formado o complexo LPS-LBP, que por sua vez, entra em contato com os receptores dos macrófagos CD14 iniciando a ativação celular (FENTON; GOLENBOCK, 1998; ADEREM; ULEVITCH, 2000; MIYAKE, 2003).

Essa ativação contribui para a ação de receptores toll-like 4 (TLR4), que juntamente com outras proteínas dão início a geração de um sinal transmembrana. Nesse momento, uma série de reações em cascata ocorre dentro dos macrófagos até a ativação do *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B), que ativa a síntese de citocinas pró-inflamatórias (ADEREM; ULEVITCH, 2000; HARJU et al., 2005; ROMERO et al., 2007).

Segundo Hava et al. (2006) a partir do contato com o LPS alguns tipos de citocinas pró-inflamatórias são ativadas e liberadas, tais como TNF- α , IL-1 e IL-6. Uma vez no organismo, as citocinas direcionam-se ao SNC e interferem em seu funcionamento. Uma das hipóteses das vias de chegada de citocinas ao cérebro são as aferências do nervo vago, que por sua vez, ligam-se até o núcleo vagal no encéfalo, causando alterações nos neurotransmissores. Ainda, as citocinas advindas dos macrófagos podem entrar em contato com terminações de alguma ramificação vagal, nos quais existem receptores de citocinas, contribuindo assim com as alterações descritas acima (DANTZER et al., 1998).

Outra hipótese aponta que as citocinas poderiam entrar em contato com células endoteliais, que por sua vez, quando ativadas levariam o organismo à produção de eicosanóides, cujas propriedades possibilitariam o acesso das citocinas ao cérebro através da barreira hematoencefálica via corrente sanguínea. A terceira hipótese engloba os órgãos circuventriculares, aonde as citocinas chegariam à circulação sanguínea e assim até o encéfalo (DUNN, 2006).

Ainda, uma vez no cérebro, as citocinas podem entrar em contato com a microglia, que possui uma função imune, como combater infecções e inflamações. Esse contato pode estimular a produção de novas citocinas no próprio encéfalo, ou seja, células residentes do próprio SNC liberariam citocinas endogenamente. (MEYER et al., 2005; HAVA et al., 2006; XU et al., 2006; KIRSTEN, 2008; LENT, 2010).

De acordo com Dunn (2006), é provável que todos esses mecanismos atuem de forma simultânea e associada. O LPS vem sendo muito utilizado experimentalmente como modelo de inflamação dada à sua capacidade de liberar citocinas, ativando o sistema imune (ADEREM; ULEVITCH, 2000; LEVITON; DAMMANN; DURUM, 2005).

Figura 2 - Mecanismo de Ação do LPS no macrófago. O principal mecanismo por onde o LPS é percebido é via a proteína de ligação, a LBP-LPS, entrando em contato com receptores CD14 e depois sinalizadas aos receptores Toll-like 4 (TLR4). Essa ativação contribui para a ação de receptores TLR4 juntamente com outras proteínas dando início a um sinal transmembrana. Nesse momento, uma série de reações em cascata ocorre dentro dos macrófagos até a ativação da NF- κ B que ativa a síntese de citocinas pró-inflamatórias (Adaptado de COHEN, 2002).

1.5 COMPORTAMENTO DOENTIO

Alterações no comportamento tais como letargia, humor depressivo e febre são comuns a qualquer espécie animal e, muitas vezes, podem estar associadas com uma variedade de doenças sistêmicas tanto quanto outros quadros infecciosos. A associação de um comportamento a uma doença, no entanto, é muitas vezes influenciado pela conduta hoje assumida frente a doença e seus respectivos tratamentos (vacinação, tratamentos quimioterápicos, terapias, etc). Essa conduta tende a ignorar milhões de anos de história evolutiva no quais animais humanos e não humanos foram expostos a diferentes tipos de patógenos e, ainda sim, sobreviveram. Pesquisas recentes, em particular aquelas que demonstram o papel da febre, apontam que as alterações oriundas desse quadro são, na verdade, estratégias comportamentais do organismo que surgem em resposta a uma infecção. Dessa forma, os comportamentos de um animal doente podem ser não somente uma consequência indesejável da doença ou mesmo um comportamento mal-adaptativo, mas sim um esforço máximo e, muitas vezes crítico do

organismo para a sua sobrevivência. À essa organizada estratégia comportamental dá-se o nome de comportamento doentio (HART, 1988).

As alterações comportamentais que envolvem o comportamento doentio estão relacionadas com efeitos centrais da ação de citocinas pró-inflamatórias envolvidas não somente no processo da febre, mas também na ativação de resistências não específicas a patógenos (HART, 1988). Como descrito nos capítulos anteriores, sabe-se que as citocinas são sintetizadas e liberadas por células imuno-competentes durante os períodos de infecção e inflamação tendo um papel fundamental na coordenação da resposta imune (KENT et al., 1992).

Essa mediação da resposta imune pelas citocinas ocorre em muitos casos pela sua capacidade de estimular o eixo HPA e, por conseguinte, podendo aumentar a produção de glicocorticóides. O aumento da produção e a maior exposição aos glicocorticóides por sua vez, afetaria o funcionamento basal do sistema imune. Nesse sentido, as citocinas poderiam desempenhar um papel importante na sinalização entre o organismo e a demanda de energia e estresse associados a uma doença (BESEDOVSKY; DEL REY, 2000).

Assim, o esforço máximo do organismo em superar a infecção não é imutável, uma vez que diferentes variáveis do ambiente (estresse ambiental) podem modular sua resposta, contribuindo nesse caso para um mau funcionamento do eixo HPA. Dessa forma, uma gama infindável de variáveis ambientais pode alterar a resposta do comportamento doentio. Como por exemplo, demonstrado por Aubert et al. (1997), onde o LPS apresenta possuir efeitos distintos sobre o comportamento de camundongos lactantes dependendo-se da variação de temperatura no ambiente, ou mesmo a interação social, como demonstrado por Cohn e Sá-Rocha (2006), onde o tratamento com LPS em camundongos dominantes diminuiu a interação social nos mesmos sem alterar a expressão da atividade motora.

1.6 EPIGENÉTICA E OS EFEITOS TRANSGERACIONAIS

O termo epigenética refere-se a todas as mudanças reversíveis e herdáveis no genoma funcional e que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA (KROLL, 2004; LIU, Y.; FREEDMAN, 2005; MOORE, 2005; TUSIE LUNA, 2005; GARG, 2006; SOUSSI et al., 2006). De acordo com Hall (1992), o controle epigenético é a soma dos fatores genéticos e não genéticos que agem sobre as células de forma a controlar seletivamente a expressão dos genes, produzindo assim o aumento da complexidade fenotípica durante o desenvolvimento. Dessa forma, seu estudo direciona-se a compreensão dos padrões de

expressão transmitidos aos descendentes, sua mudança de expressão de genes durante a diferenciação de um tipo de célula e como os fatores ambientais podem modificar a expressão de genes.

Os principais mecanismos de alterações epigenéticas são: (1) metilação do DNA; (2) modificações de histonas e (3) ação de RNAs não codificadores. Os padrões de metilação de DNA são os mais conhecidos destes três mecanismos, embora modificações de histonas também sejam bastante discutidas (RAKYAN et al., 2002; RAKYAN et al., 2003; ANWAY et al., 2005).

A metilação do DNA está relacionada normalmente ao silenciamento de genes. As acetilações, fosforilações e ubiquitinações são modificações de histonas já melhor estudadas. Já a ação de RNAs não codificadores está relacionada ao silenciamento pós-transcricional de genes através do mecanismo de RNA de interferência onde ocorre o bloqueio da tradução ou degradação do RNAm alvo. Além, da ação bloqueadora da transcrição, os siRNA podem ser associados à metilação de seqüências de DNA. Todos estes mecanismos parecem estar interligados para a organização estrutural da cromatina tornando-a mais acessível ou não aos fatores de transcrição (BIRDI, 2002).

As mudanças epigenéticas são fortemente influenciadas pelo ambiente, de forma que alterações no mesmo promovidas por ataques de patógenos, tipo de alimentação, etc podem acarretar mudanças epigenéticas (Fig. 3). Ou seja, é um processo pelo qual o genótipo de um organismo interage com o meio ambiente para produzir o seu fenótipo. Sendo assim, a epigenética está intimamente relacionada com o aumento de variabilidade fenotípica dos indivíduos resultando em uma relevante importância para a evolução (TANG; HO, 2007).

Uma vez que o ambiente tem suma importância na forma como o organismo irá se desenvolver, estressores que prejudiquem o desenvolvimento pré e pós-natal podem ter efeitos profundos na vida adulta desse organismo. No caso de mamíferos, o cuidado materno e a nutrição são fatores ligados a qualidade do ambiente no início da vida. Em roedores, o cuidado materno é caracterizado por comportamentos complexos e que influenciam fortemente o desenvolvimento de respostas comportamentais, tais como o nível de resposta à ansiedade e ao stress (GRAFF; MANSUY, 2008).

Uma das causas do aumento da incidência de algumas doenças nos dias de hoje podem estar ligadas a fenótipos resultantes de alterações epigenéticas em períodos críticos do desenvolvimento que não permitem adaptações ao desafio em outros períodos da vida, apesar de que eventos estressantes na vida adulta, também possuem um impacto considerável na vida do organismo (TANG; HO, 2007).

Figura 3 - Vias não genômicas de alterações no desenvolvimento. Fatores como drogas, nutrição, toxina e idade podem levar a alterações epigenéticas (círculo vermelho). Essas alterações por sua vez poderão ser transmitidas à prole com consequências para a variação fenotípica. Ainda, essas alterações poderão afetar o investimento pré-natal e / ou pós-natal materno (adaptado de CURLEY; MASHOODH; CHAMPAGNE, 2011).

1.7 DOENÇAS PSIQUIÁTRICAS E ESTUDOS PRÉ-NATAIS

Segundo Meyer et al. (2005), distúrbios precoces durante o desenvolvimento cerebral poderiam acarretar o surgimento de diferentes doenças psiquiátricas. Doenças como o autismo e a esquizofrenia são alguns dos exemplos a ela associados. Explicações que buscam relacionar as infecções pré-natais com o surgimento de doenças mentais apontam as citocinas como um dos fatores de risco para o seu desenvolvimento,

uma vez que, como descrito anteriormente, infecções, como por exemplo as causadas pelo LPS, ocasionam a liberação de citocinas pró-inflamatórias (HAVA et al., 2006).

Embora existam dúvidas como o LPS possa chegar ao feto e, muito embora ele não seja capaz de atravessar a barreira placentária, estudos sugerem que ele atue diretamente em células placentárias, induzindo a expressão de mediadores inflamatórios. Nesses casos, o aumento na expressão de citocinas decorrente da exposição a endotoxina podem contribuir com o aumento na expressão de citocinas no plasma fetal, alterando a resposta desse organismo ao estresse dado a decorrente interferência com a atividade do eixo HPA. (URAKUBO et al., 2001; LEVITON; DAMMANN; DURUM, 2005; MEYER et al., 2005; ASHDOWN et al., 2006).

No caso a exposição ao LPS, além de contribuir para um quadro inflamatório poderá ocasionar hemorragia intraventricular, necrose placentária, danos nos órgãos fetais, abortos espontâneos, dentre outra série de efeitos (HARJU et al., 2005; HAVA et al., 2006; XU et al., 2006; ROMERO et al., 2007).

No entanto, alguns estudos indicam que o aumento de doenças como o autismo e a esquizofrenia estão mais relacionados com a resposta imune materna do que uma infecção diretamente no feto no período pré-natal (SMITH et al., 2007).

Uma vez que os transtornos depressivos podem ter uma relação com a ativação do SI e, além disso, que a exposição pré-natal a patógenos poderia influenciar o desenvolvimento desses filhotes e, por conseguinte, futuras gerações, esse trabalho se propôs a estudar os efeitos comportamentais da decorrente exposição a uma inflamação gerada pela exposição pré-natal ao LPS assim como a influencia desse evento no comportamento e SI das futuras gerações filiais de camundongos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da administração pré-natal do LPS na geração parental (GP) e seus efeitos sobre o comportamento depressivo e não depressivo e sistema imune na geração filial 1, 2 e 3 (GF1, GF2 e GF3) de camundongos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e comparar os parâmetros de imobilidade referentes ao comportamento depressivo e não depressivo de dois testes de desespero comportamental: o teste de nado forçado (TNF) e o teste de suspensão da cauda (TSC).
- Avaliar na GP os comportamentos depressivos/ não depressivos com o teste selecionado no procedimento anterior, expondo as fêmeas posteriormente prenhas ao LPS ou solução salina pré-natal.
- Avaliar nas GP, GF1 e GF2 a expressão do comportamento maternal dos camundongos fêmeas de comportamento depressivo/não depressivo expostas ou não ao LPS pré-natal (GP) e transgeracional (GF1 e GF2).
- Avaliar nas GF1, GF2 e GF3 o comportamento depressivo/não depressivo através do teste selecionado no primeiro procedimento.
- Avaliar nas GF1 e GF2 dos camundongos depressivos/não depressivos a atividade geral em campo aberto para avaliação da atividade motora e comportamento doentio.
- Avaliar na GF3 dos camundongos depressivos/não depressivos a atividade geral em campo aberto após um desafio com LPS via intraperitoneal (i.p).
- Avaliar na GF3 a expressão do nível da citocina pró-inflamatórias IL-1 α no sangue dos camundongos desafiados com a endotoxina.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos desse trabalho foram desenvolvidos no Biotério do Departamento de Patologia (VPT) e no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

3.1 ANIMAIS

Foram solicitados do biotério 70 camundongos (*Mus Musculus*) machos e fêmeas adultos da linhagem *Swiss*, com 6 a 8 semanas de idade, provenientes de proles obtidas no Biotério do VPT da FMVZ - USP. A partir desses animais, foram realizados diversos cruzamentos para se obter diferentes linhas filiais. Os animais foram utilizados seguindo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Comitê de Ética da FMVZ – USP (protocolo n^o. 2653/2012).

Antes da realização dos experimentos, os animais foram alojados por um período mínimo de 7 dias, em gaiolas de polipropileno (28 x 17 x 12cm) em número de 5 animais por gaiola para adaptação as condições do biotério. Estas gaiolas foram devidamente acondicionadas em salas cuja temperatura ambiente (24 a 26°C) e umidade (65 a 70%) sendo mantidas por meio de aparelhos de ar condicionado central, com ventilação, exaustão e luminosidade controladas, obedecendo-se a um ciclo claro-escuro de 12 horas, com início da fase clara às 7:00 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada para roedores NUTRILABOR GUABIR®. Ração e água eram fornecidas aos animais *ad libitum* durante todo o tempo, exceto uma hora antes da realização dos experimentos. Antes dos testes comportamentais os animais permaneciam na sala de teste por 10 minutos para adaptação ao ambiente.

3.2 ACASALAMENTO

As fêmeas foram introduzidas nas gaiolas moradias dos machos ao final do ciclo de luz (entre 17:00 e 18:00 horas) na proporção de duas fêmeas para um macho, permanecendo com os mesmos durante um período de 12h. A detecção da prenhez foi verificada no início da manhã (entre 6:00 e 7:00 horas) por meio da presença do tampão vaginal, encontrado por cerca de 12 a 24 horas após cópula. Esse dia foi considerado como o 1^o dia de gestação (GD 1). Cada geração, após a seleção do comportamento

depressivo/não depressivo e testes comportamentais, foram cruzados entre animais com o mesmo comportamento para obtenção da geração filial futura. Esse procedimento foi feito até a obtenção da GF3.

3.3 DROGAS E SOLUÇÕES

O LPS foi obtido por extração fenólica a partir de *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8 (Sigma®). A solução de LPS utilizada possui concentração de 50µg/ml de LPS em solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) estéril a 0,9%. A solução salina (solução controle) foi uma solução aquosa de NaCl estéril a 0,9%.

3.4 TRATAMENTO

O tratamento com LPS foi realizado em dois momentos ao longo desse trabalho: foram administrados 100µg/kg LPS ou solução salina via I.P. no GD 15 da GP e, foram administrados 100µg/kg LPS via I.P. como desafio na GF3 (aproximadamente 62 dias de vida) 30 minutos antes da avaliação da atividade motora e comportamento doentio no teste de campo aberto. A administração da endotoxina ou solução salina foi feita sempre no período da manhã (entre 7:00 - 8:00 horas). A dose de LPS escolhida já foi descrita como capaz de induzir alterações comportamentais e endócrinas ligadas ao comportamento doentio, além de aumentar os níveis de citocina na placenta (WANG et al., 2006).

3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

Segue abaixo os testes comportamentais utilizados no presente trabalho e, conforme descrito por McKinney (1984, p. 77) são de suma importância para a compreensão de diferentes fenômenos entre espécies. Dado que

os modelos animais representam preparações experimentais desenvolvidas em uma espécie com o propósito de estudar os fenômenos que ocorrem em outra espécie. No caso dos modelos de psicopatologia humana, buscam-se desenvolver síndromes nos animais que de certo modo se assemelhem àquelas apresentadas pelos humanos, com o fim de estudar aspectos seletos da psicopatologia humana.

3.5.1 Tempo de imobilidade pelo teste de suspensão da cauda (TSC)

Esse teste, também conhecido com desespero comportamental, é baseado nos estudos descritos por Steru et al. (1985), no qual camundongos são suspensos pela cauda e gentilmente posicionados em um suporte de madeira localizado a 50 cm do solo por meio de fitas adesivas fixadas a 1 cm do final da cauda. Esse teste consiste em uma avaliação de 6 minutos ininterruptos no qual os parâmetros de imobilidade e mobilidade foram quantificados. O tempo de imobilidade e mobilidade desse animal está relacionado com o comportamento depressivo/não depressivo do animal.

Figura 4 - Aparato utilizado no teste de suspensão da cauda para camundongos (adaptado de STERU et al., 1985).

3.5.2 Tempo de imobilidade pelo teste de nado forçado (TNF)

Como o teste anterior, o TNF também é conhecido com desespero comportamental e foi inicialmente descrito por Porsolt, Bertin e Jalfre (1977). Esse protocolo é muito utilizado para avaliação de antidepressivos. O teste consiste em se colocar o animal no centro de uma aparato cilíndrico de vidro e ou acrílico (5 x 12,5 cm) preenchido com 60 cm de água a aproximadamente $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$. São quantificados os tempos de imobilidade/mobilidade do animal durante os 4 minutos finais de um total de 6 minutos de observação. O animal foi julgado imóvel quando parava de nadar e realizava o mínimo de movimentos para permanecer flutuando acima do nível da água. Após cada observação, a água foi trocada. Segundo Porsolt et al. (2001), diferentemente de ratos, camundongos apresentam níveis suficientemente estáveis de imobilidade após uma única exposição ao teste.

Figura 5 - Cuba de acrílico circular transparente utilizada no teste de nado forçado (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977).

3.5.3 Teste de cuidado maternal

O procedimento para avaliar comportamento materno em camundongos foi adaptado a partir dos trabalhos de Felicio, Mann e Bridges (1991). O comportamento materno está relacionado a ações das fêmeas em pró do filhote de forma a assegurar a sobrevivência e desenvolvimento de sua prole (MANN, 2006). A avaliação do comportamento materno (CM) foi realizada pela manhã do 5º dia pós-natal (DPN 5), período no qual este se apresenta em sua máxima intensidade. Esse teste é realizado em duas etapas: o primeiro consiste na privação dos filhotes de sua mãe durante o período de uma hora antes do início do teste comportamental, a segunda consiste na devolução dos filhotes a caixa moradia dispondo os filhotes nos vértices e nos pontos médios de cada lado da gaiola, sendo a mãe introduzida no centro desta. O procedimento foi filmado durante 60 minutos consecutivos (3600 s) por uma câmera de vídeo presa ao teto da sala de observação para análise posterior. A figura 4 ilustra alguns dos parâmetros observados nesse teste.

Posteriormente, foram analisados os seguintes parâmetros comportamentais:

- tempo para a mãe recuperar o 1º filhote;
- tempo para recuperação do 2º filhote;
- tempo para recuperação do 3º filhote;
- tempo para recuperação do 4º filhote;
- presença/ausência do comportamento de *hoovering* e seu respectivo tempo (postura na qual a rata se coloca sobre alguns ou todos os filhotes no ninho, mas não se encontra em repouso);
- presença/ausência do comportamento materno total (CMT), sendo considerado positivo (escore 1) quando o camundongo permanece em cifose fisiológica por um período maior ou igual há três minutos consecutivos com todos os oito filhotes reunidos e negativo (escore 2) na ausência deste.

Figura 6 - Parâmetros do comportamento maternal. Agrupamento de filhotes (A), preparo da postura de amamentação (B), “*crouching*” ou cifose fisiológica (C) e comportamento maternal total (D) (NUMAN, 1994).

3.5.4 Atividade geral no teste de campo aberto

O teste de campo aberto é uma ferramenta padrão para a medida do comportamento exploratório e ansiedade em roedores (ARCHER, 1973). O campo aberto consiste em uma arena redonda com diâmetro de 40 cm e paredes laterais de 50 cm. Inicialmente o animal é introduzido no centro da arena e o comportamento registrado por uma câmera de vídeo montada sobre um tripé adjacente ao campo. Esse teste foi realizado após a avaliação das GF 1, 2 e 3 pelos modelos de depressão (TNF ou TSC) aproximadamente 60 dias após o nascimento. As sessões tinham um total de 5 minutos. Posteriormente, os vídeos foram analisados pelo programa de análises comportamentais *Ethovision®* (*Ethovision; Noldus Information Technology, Leesburg, VA*), no qual foram obtidos os parâmetros da distancia percorrida, a velocidade média, a frequência

exploração vertical, a frequência da auto-limpeza e o número de bolos fecais no final do experimento. Todos os testes foram conduzidos sob luz de média intensidade do laboratório de comportamento.

Figura 7 - Arena circular do teste de campo aberto para avaliação da atividade geral de roedores (ARCHER, 1973).

3.6. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE INTERLEUCINA IL-1 α

A dosagem da citocina IL-1 α foi realizada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando-se os kits ELISA MAX Deluxe Sets (Biolegend, San Diego, CA, USA). Neste método, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 50 μ L por poço de anticorpo de captura diluído em tampão PBS e incubados por uma noite. Após 3 lavagens com 300 μ L/poço de tampão de lavagem, as placas foram bloqueadas com 200 μ L/poço de tampão de bloqueio por 60 minutos à temperatura ambiente. Após 3 lavagens, as amostras em

curva padrão foram incubadas por um período de 2 horas em temperatura ambiente. Para realização da curva padrão, citocinas foram incubadas em duplicata (50 µL/poço) das diluições seriadas de citocinas recombinantes, de 2 a 125 pg/ml, conforme recomendações do fabricante. Após cinco lavagens 50 µL/poço do anticorpo de detecção foram adicionados, com incubação por 60 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Novamente, a placa foi lavada três vezes e 50 µL/poço de estreptoavidina foi adicionada, sendo as placas incubadas por 20 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se 50 µL/poço de H₂SO₄ (2N) para interromper a reação e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450nm.

3.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Segue abaixo os procedimentos realizados nesse trabalho de forma a ilustrar de forma cronológica (fig. 8) as etapas desenvolvidas

3.7.1 Experimento 1 - Comparação dos modelos de Depressão: Teste da natação forçada vs Teste de suspensão da cauda

O experimento inicial desse trabalho consistiu na avaliação dos tempos de maior e menor imobilidade de camundongos machos em dois modelos comportamentais empregados para avaliação de drogas antidepressivas, o TSC e TNF. Compreendeu-se que quanto maior o tempo de imobilidade do animal, maior a semelhança com um comportamento tipo depressivo. Para isso esses animais, após uma semana de ambientação no biotério, foram avaliados no TSC e, após 2 semanas, tiveram o mesmo comportamento avaliado pelo TNF. Esse primeiro experimento teve como objetivo comparar o comportamento dos camundongos em ambos os testes. A partir de seus resultados, o teste de suspensão da cauda foi escolhido para realizar os procedimentos posteriores do trabalho.

3.7.2 Experimento 2 - Avaliação dos tempos de imobilidades dos camundongos machos e fêmeas da GF1, GF2 e GF3, na qual a GP recebeu 100µg/kg no 15º dia de prenhez

Primeiramente, nota-se que as fêmeas da GP, a partir do comportamento avaliado no TSC foram divididas em grupos experimentais distintos (depressivo salina, depressivo LPS, não depressivo salina e não depressivo LPS). Após esse delineamento, os animais foram cruzados entre si. No DG15 as fêmeas dos grupos LPS e salina receberam 100µg/kg de LPS via I.P. ou salina 0,9% respectivamente.

Após o nascimento da GF1 e os mesmos completarem 60 dias, seus tempos de imobilidade e mobilidade foram avaliados pelo TSC. Com esse procedimento, foi possível evidenciar a proporção de camundongos em seus respectivos grupos que apresentavam o comportamento depressivo e não depressivo. A partir de seus resultados e de acordo com seu grupo experimental (depressivo e não depressivo, LPS e solução salina), os animais foram selecionados para os testes posteriores no qual a atividade motora e comportamento doentio foram avaliados no teste do campo aberto.

Após os testes, os animais selecionados foram cruzados entre si para a obtenção da GF2 e, por conseguinte, a GF3. Todos os procedimentos adotados na GF1 foram empregados na GF2 e GF3.

3.7.3 Experimento 3 - Avaliação do comportamento maternal de camundongos da GP, GF1 e GF2 no dia pós-natal 5

Como descrito anteriormente, as fêmeas da GP, a partir do comportamento avaliado no TSC foram divididas em grupos experimentais distintos e as fêmeas, após prenhez confirmada, receberam no DG15 100µg/kg de LPS ou solução salina 0,9% via I.P. Assim, após o nascimento da GF1, foi realizado no DPN 5 o teste de comportamento materno, onde os parâmetros anteriormente descritos de tempo de recuperação, presença/ausência do comportamento de *hoovering* e seu respectivo tempo e presença/ausência do CMT foram observados.

Após os testes de comportamento, a mãe com seus filhotes eram devolvidos ao biotério, onde a mesma permanecia com seus filhotes até o 21º dia de lactação, período no qual era realizado o desmame dos filhotes. Após o desmame (DPN 21) a GF1 permaneceu no biotério até completar aproximadamente 60 dias, período no qual outros procedimentos comportamentais eram realizados.

Com isso, a GF1 foi cruzada entre si para obtenção da GF2. Os mesmos procedimentos foram adotados para obtenção da GF2 e GF3, salvo a administração da endotoxina, que foi aplicada somente da GP.

3.7.4 Experimento 4 - Avaliação dos camundongos machos e fêmeas da GF1 e GF2 no teste de campo aberto

Após a GF1 completar aproximadamente 60 dias e ter tido seu tempo de imobilidade e mobilidade observado e selecionado pelo TSC, os camundongos machos e fêmeas tiveram sua atividade exploratória e comportamento doentio avaliada no teste do campo aberto. Nota-se que, após os testes com os animais selecionados, os mesmos foram cruzados entre si para obtenção da GF2. Esse procedimento foi realizado levando-se em consideração o comportamento e tratamento desses animais.

3.7.5 Experimento 5 - Avaliação do comportamento dos camundongos machos e fêmeas da GF3 desafiados com LPS no teste de campo aberto

O quinto procedimento consistiu na avaliação da atividade exploratória e comportamento doentio da GF3, no qual foi realizado um desafio com 100µg/kg de LPS administrados via I.P 30 minutos antes da realização do teste comportamental. Uma vez que alterações transgeracionais foram observadas entre as gerações e seus respectivos grupos experimentais, o objetivo desse desafio foi estimular o sistema imune dos roedores no intuito de se evidenciar mudanças no comportamento dos animais cuja GP recebeu LPS pré-natal.

3.7.6 Experimento 6 - Avaliação da expressão de IL-1 α de camundongos machos e fêmeas da GF3 desafiados com LPS no teste de campo aberto.

Uma hora após a avaliação da atividade motora e comportamento doentio dos camundongos machos e fêmeas desafiados com LPS no teste do campo aberto do experimento anterior, os animais foram submetidos a eutanásia e tiveram seu sangue coletado e armazenado em *ependorfs* de 1,5 ml, para em seguida serem centrifugados a 11000 rpm por 10 minuto para coleta do soro e quantificação da citocina IL-1 α pelo ensaio imunoenzimático (ELIZA), como descrito anteriormente.

Figura 8 - Etapas desenvolvidas em ordem cronológica

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados descritos a seguir, foi realizada uma ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Tukey para todos os procedimentos no qual o grupo experimental apresentava 3 ou 4 variáveis. Para os procedimentos no qual somente 2 variáveis foram apresentadas, utilizou-se o teste t de Student. Todas as análises foram realizadas através do programa de análise estatística *GraphPad Prism 6* (San Diego, Caligornia) levando-se em consideração os comportamentos depressivos e não depressivos de forma separada. A probabilidade de $P < 0,05$ foi capaz de revelar diferenças estatísticas significantes.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTO 1 - COMPARAÇÃO DOS MODELOS DE DEPRESSÃO: TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA VS TESTE DE SUSPENSÃO DA CAUDA

A fig. 9 ilustra os resultados dos tempos de imobilidade de camundongos machos avaliados nos testes de suspensão da cauda (A) e de natação forçada (B). A fig. 9-C ainda ilustra a comparação dos tempos de imobilidade entre ambos os testes.

Em relação ao tempo de imobilidade dos camundongos avaliados pelo teste de suspensão da cauda, ilustrada pela fig. 9-A, a ANOVA de uma via revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos classificados como Não Depressivos, Intermediários e Depressivos [$F(2, 27) = 57,23$; $P < 0.0001$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo e Intermediário ($P < 0,001$ ***), Intermediário e Depressivo ($P < 0,0001$ ****) e Não Depressivo e Depressivo ($P < 0,0001$ ****).

Em relação ao tempo de imobilidade dos camundongos avaliados pelo teste de natação forçada, ilustrada pela fig. 9-B, a ANOVA de uma via revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos classificados como Não Depressivos, Intermediários e Depressivos [$F(2, 27) = 28,39$; $P < 0.0001$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo e Intermediário ($P < 0,05$ *), Intermediário e Depressivo ($P < 0,0001$ ****) e Não Depressivo e Depressivo ($P < 0,0001$ ****).

Em relação à comparação dos tempos de imobilidade dos camundongos avaliados por ambos os testes, ilustrada pela fig. 9-C, a ANOVA de duas vias revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos avaliados [$F(2, 54) = 88,57$; $P < 0.0001$], não havendo diferenças quanto ao teste comportamental empregado [$F(1, 54) = 1,030$; $P = 0,3147$], e não havendo evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(2, 54) = 0,1372$; $P = 0.8721$]. O teste *post hoc* de Tukey foi aplicado somente para a comparação entre os testes e revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo (TSC) e Intermediário (TNF) ($P < 0,0001$ ****), Não Depressivo (TSC) e Depressivo (TNF) ($P < 0,0001$ ****), Intermediário (TSC) e Depressivo (TNF) ($P < 0,0001$ ****), Depressivo (TSC) e Não Depressivo (TNF) ($P < 0,0001$ ****), Depressivo (TSC) e Intermediário (TNF) ($P < 0,0001$ ****).

Figura 9 - Tempo de imobilidade em segundos de camundongos machos avaliados inicialmente pelo teste de suspensão da cauda (fig. 9-A) e após 14 dias pelo teste de natação forçada (fig. 9-B). Ainda, é mostrado a comparação dos resultados obtidos em ambos os testes (fig. 9-C). Para as fig. 9-A (Não Depressivo n=8, Intermediário n=15, Depressivo n=7) e 9-B (Não Depressivo n=3, Intermediário n=22, Depressivo n=5) os resultados expressam a média e $\pm$ S.E.M., ANOVA de uma via. Para a fig. 9-C os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M, ANOVA de duas vias. Considera-se significância quando $P < 0,05$.

9-A Teste de Suspensão da Cauda - Tempo de Imobilidade

9-B Teste do Nado Forçado - Tempo de Imobilidade

9-C Comparação dos tempos de imobilidade

4.2 EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DO TEMPO DE IMOBILIDADE DOS CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS DA GF1, GF2 E GF3 EM QUE A GERAÇÃO PARENTAL RECEBEU 100 μ G/KG NO 15º DIA DE PRENHEZ.

A tabela 1 mostra a proporção de nascimentos de camundongos machos em três gerações filiais cuja GP recebeu 100 μ g/kg de LPS ou solução salina no 15º dia de prenhez bem como a porcentagens de animais com comportamento Não Depressivo ou Depressivo.

Nota-se que os animais dos grupos Não depressivo e Depressivo tiveram mais filhotes com o mesmo comportamento.

Tabela 1 - Efeitos da exposição materna ao LPS (100µg/kg no 15º dia de prenhez) ou solução salina no número de camundongos machos com comportamento Não Depressivo e Depressivo das GF1, GF2 e GF3.

GF1					
Grupo	Machos				
	Total de Animais	Depressivo	%	Não Depressivo	%
Não Depressivo Salina	24	9	37,5	15	62,5
Não Depressivo LPS	23	8	34,78	15	65,21
Depressivo Salina	19	15	78,94	4	21,05
Depressivo LPS	31	29	93,54	2	6,45

GF2					
Grupo	Machos				
	Total de Animais	Depressivo	%	Não Depressivo	%
Não Depressivo Salina	19	8	42,1	11	57,9
Não Depressivo LPS	17	4	23,52	13	76,47
Depressivo Salina	22	20	90,9	2	9,1
Depressivo LPS	20	16	80	4	20

GF3					
Grupo	Machos				
	Total de Animais	Depressivo	%	Não Depressivo	%
Não Depressivo Salina	14	2	14,28	12	85,71
Não Depressivo LPS	11	0	0	11	100
Depressivo Salina	20	14	70	6	30
Depressivo LPS	24	20	83,33	4	16,66

A tabela 2 mostra a proporção de nascimentos de camundongos fêmeas em três gerações filiais cuja GP recebeu 100µg/kg de LPS ou solução salina no 15º dia de prenhez bem como a porcentagens de animais com comportamento Não Depressivo ou Depressivo.

Nota-se que animais dos grupos Não depressivo e Depressivo tiveram mais filhotes com o mesmo comportamento.

Tabela 2 - Efeitos da exposição materna ao LPS (100µg/kg no 15º dia de prenhez) ou solução salina no número de camundongos fêmeas com comportamento Não Depressivo e Depressivo das GF1, GF2 e GF3.

GF1					
Grupo	Fêmeas				
	Total de Animais	Depressivo	%	Não Depressivo	%
Não Depressivo Salina	19	7	36,84	12	63,15
Não Depressivo LPS	18	6	33,33	12	66,66
Depressivo Salina	24	17	70,83	7	29,17
Depressivo LPS	27	18	66,66	9	33,33

GF2					
Grupo	Fêmeas				
	Total de Animais	Depressivo	%	Não Depressivo	%
Não Depressivo Salina	25	9	36	15	64
Não Depressivo LPS	23	8	34,78	15	65,21
Depressivo Salina	34	23	67,64	11	32,35
Depressivo LPS	28	20	71,42	8	28,57

GF3					
Grupo	Fêmeas				
	Total de Animais	Depressivo	%	Não Depressivo	%
Não Depressivo Salina	11	3	27,27	8	72,72
Não Depressivo LPS	3	0	0	3	100
Depressivo Salina	20	18	90	2	10
Depressivo LPS	25	17	68	8	32

A fig. 10 ilustra os resultados do tempo de imobilidade de camundongos machos da GF1, GF2 e GF3 avaliados pelo teste de suspensão da cauda, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º dia de sua prenhez.

Em relação ao tempo de imobilidade da GF1, ilustrada pela fig. 10-A, a ANOVA de duas vias revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 93) = 27,26$; $P < 0,0001$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 93) = 0,004$; $P = 0,9487$], bem como evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 93) = 1,201$; $P = 0,2760$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo Salina e Depressivo Salina ($P < 0,05$ *) e Não Depressivo LPS e Depressivo LPS ($P < 0,0001$ ****). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes dentro de cada grupo de mesmo comportamento.

Em relação ao tempo de imobilidade da GF2, ilustrada pela fig. 10-B, a ANOVA de duas vias revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo e Depressivo [$F(1, 74) = 32,65$; $P < 0,0001$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 74) = 1,818$; $P = 0,1817$], não havendo também evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 74) = 0,9275$; $P = 0,3387$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo Salina e Depressivo Salina ($P < 0,01$ **) e Não Depressivo LPS e Depressivo LPS ($P < 0,0001$ ****). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes dentro de cada grupo de mesmo comportamento.

Em relação ao tempo de imobilidade da GF3, ilustrada pela fig. 10-C, a ANOVA de duas vias revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo e Depressivo [$F(1, 65) = 38,71$; $P < 0,0001$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 65) = 0,1799$; $P = 0,6728$], não havendo também evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 65) = 0,4998$; $P = 0,4821$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo Salina e Depressivo Salina ($P < 0,001$ ***) e Não Depressivo LPS e Depressivo LPS ($P < 0,0001$ ****). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes dentro de cada grupo de mesmo comportamento.

Figura 10 - Testes de Suspensão da Cauda: tempo de imobilidade em segundos dos camundongos machos da GF1, GF2 e GF3, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de Lps ou solução salina, via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam à média ± S.E.M, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; (GF1: não depressivo salina n=24, não depressivo LPS n=23, depressivo salina n=19, depressivo LPS n=31; GF2: não depressivo salina n=19, não depressivo LPS n=17, depressivo salina n=22, depressivo LPS n=20; GF3: não depressivo salina n=14, não depressivo LPS n=11, depressivo salina n=20, depressivo LPS n=24). Considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 11 ilustra os resultados da comparação transgeracional do tempo de imobilidade de camundongos machos depressivos da GF1, GF2 e GF3 avaliados pelo teste de suspensão da cauda, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina, via i.p no 15º dia de sua prenhez.

Em relação ao tempo de imobilidade dos camundongos depressivos da GF1 comparada com animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 11-A, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 88) = 0,6888$; $P = 0,4088$], não havendo diferenças entre o comportamento depressivo

que recebeu salina ou LPS [$F(1, 88) = 0,1265$; $P = 0,7229$], e sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 88) = 0,5061$; $P = 0,4787$].

Em relação ao tempo de imobilidade dos camundongos depressivos da GF2 comparada com animais de mesmo comportamento da GF3, ilustrada pela fig. 11-B, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 82) = 5,090$; $P = 0,0267$], não havendo diferenças entre o comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 82) = 0,004$; $P = 0,9488$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 82) = 0,1039$; $P = 0,7481$]. O teste *post hoc* de Tukey não revelou diferenças significantes entre os grupos.

Em relação ao tempo de imobilidade dos camundongos depressivos da GF1 comparada com animais de mesmo comportamento da GF3, ilustrada pela fig. 11-C, a ANOVA de duas vias revelou diferenças estatisticamente significantes entre as gerações [$F(1, 90) = 9,564$; $P = 0,0026$], não havendo diferenças entre o comportamento depressivo que recebeu salina ou LPS [$F(1, 90) = 0,4820$; $P = 0,4893$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 90) = 0,1952$; $P = 0,6597$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença significativa entre os comportamentos Depressivo LPS (GF1) e Depressivo Salina (GF3) ($P < 0,05$ *) e Depressivo LPS (GF1) e Depressivo LPS (GF3) ($P < 0,05$ *). Nota-se que o tempo de imobilidade da GF1 foi significativamente maior que da GF3.

Figura 11 - Teste de Suspensão da Cauda: comparação transgeracional entre o tempo de imobilidade em segundos dos camundongos machos depressivos da GF1, GF2 e GF3, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg LPS ou solução salina, via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam à média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey; (GF1: depressivo salina n=19, depressivo LPS n=31; GF2: depressivo salina n=22, depressivo LPS n=20; GF3: depressivo salina n=20, depressivo LPS n=24); considera-se significância quando $P < 0,05$.

11-A Tempo de Imobilidade - Depressivos F1xF2 **11-B Tempo de Imobilidade - Depressivos F2xF3**

11-C Tempo de Imobilidade - Depressivos F1xF3

A fig. 12 ilustra os resultados da comparação transgeracional do tempo de imobilidade de camundongos machos não depressivos da GF1, GF2 e GF3 avaliados pelo teste de suspensão da cauda, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina, via i.p. no 15º dia de sua prenhez.

Em relação ao tempo de imobilidade dos camundongos não depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 12-A, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 88) = 0,6888$; $P = 0,4088$], não havendo diferenças entre o comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 88) = 0,1265$; $P = 0,7229$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 88) = 0,5061$; $P = 0,4787$].

Em relação ao tempo de imobilidade dos camundongos não depressivos da GF2 comparada com animais de mesmo comportamento da GF3, ilustrada pela fig. 12-B, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 57) = 7,407$; $P = 0,0086$], diferenças entre o comportamento não depressivo que recebeu salina ou LPS [$F(1, 57) = 4,332$; $P = 0,0419$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 57) = 0,6408$; $P = 0,4268$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença significativa entre os comportamentos Não Depressivo Salina (GF2) e Não Depressivo LPS (GF3) ($P < 0,01^{**}$). Nota-se que na GF3 houve atenuação dos efeitos do LPS.

Em relação ao tempo de imobilidade dos camundongos não depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF3, ilustrada pela fig. 12-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 68) = 15,71$; $P = 0,0002$], não havendo diferenças entre o comportamento não depressivo que recebeu salina ou LPS [$F(1, 68) = 1,283$; $P = 0,2614$], não havendo também evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 68) = 0,0$; $P > 0,9999$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença significativa entre os comportamentos Não Depressivo Salina (F1) e Não Depressivo Salina (F3) ($P < 0,05^{*}$), Não Depressivo Salina (F1) e Não Depressivo LPS (F3) ($P < 0,01^{**}$), Não Depressivo LPS (F1) e Não Depressivo LPS (F3) ($P < 0,05^{*}$).

Figura 12 - Teste de Suspensão da Cauda: comparação transgeracional entre o tempo de imobilidade em segundos dos camundongos machos não depressivos da GF1, GF2 e GF3, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de salina ou LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam à média e o S.E.M, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; (F1: não depressivo salina n=24, não depressivo LPS n=23; F2: não depressivo salina n=19, não depressivo LPS n=17; F3: não depressivo salina n=14, não depressivo LPS n=11); considera-se significância quando $P < 0,05$.

12-A Tempo de Imobilidade - Não Depressivos F1x2

12-B Tempo de Imobilidade - Não Depressivos F2x3

12-C Tempo de Imobilidade - Não Depressivos F1x3

A fig. 13 ilustra os resultados do tempo de imobilidade de camundongos fêmeas da GF1, GF2 e GF3 avaliadas pelo teste de suspensão da cauda, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina, via i.p no 15º dia de sua prenhez.

Em relação ao tempo de imobilidade da GF1, ilustrada pela fig. 13-A, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 84) = 10,25$; $P = 0,0019$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 84) = 0,235$; $P = 0,6289$], sem evidência de interação entre estes dois fatores [$F(1, 84) = 0,235$; $P = 0,6289$]. O teste *post hoc* de Tukey, contudo não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Em relação ao tempo de imobilidade da GF2, ilustrada pela fig. 13-B, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não

Depressivo e Depressivo [$F(1, 106) = 23,84$; $P < 0,0001$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 106) = 1,451$; $P = 0,2310$], contudo, foi observado evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 106) = 5,504$; $P = 0,0208$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo LPS e Depressivo LPS ($P < 0,0001$ * ***), e Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,05$ *). Nota-se que o Depressivo LPS apresentou níveis de imobilidade significativamente maiores que os grupos Depressivo salina e Não Depressivo LPS, evidenciando que a exposição parental ao LPS promoveu maior sensibilidade da GF2 ao LPS.

Em relação ao tempo de imobilidade da GF3, ilustrada pela fig. 13-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo e Depressivo [$F(1, 55) = 11,78$; $P = 0,0011$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 55) = 0,796$; $P = 0,3761$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 55) = 0,478$; $P = 0,4919$]. O teste *post hoc* de Tukey contudo, não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Figura 13 - Testes de Suspensão da Cauda: tempo de imobilidade em segundos dos camundongos fêmeas da GF1, GF2 e GF3, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de LPS ou solução salina, i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam à média ± S.E.M., ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; (GF1: não depressivo salina n=19, não depressivo LPS n=18, depressivo salina n=24, depressivo LPS n=27; GF2: não depressivo salina n=25, não depressivo LPS n=23, depressivo salina n=34, depressivo LPS n=28; GF3: não depressivo salina n=14, não depressivo LPS n=3, depressivo salina n=20, depressivo LPS n=25); considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 14 ilustra os resultados da comparação transgeracional do tempo de imobilidade de camundongos fêmeas depressivas da GF1, GF2 e GF3 avaliadas pelo teste de suspensão da cauda, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina, via i.p no 15º dia de sua prenhez.

Em relação ao tempo de imobilidade dos camundongos depressivos da GF1 comparada com animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 14-A, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 109) = 0,184$; $P = 0,6688$], não havendo diferenças entre o comportamento depressivo que recebeu salina ou LPS [$F(1, 109) = 0,931$; $P = 0,3365$], contudo, foi observada evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 109) = 4,153$; $P = 0,0440$]. O teste *post hoc* de Tukey, não revelou diferenças significantes entre os grupos.

Em relação ao tempo de imobilidade dos camundongos depressivos da GF2 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF3, ilustrada pela fig. 14-B, a

ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [F (1, 103) = 0,003; P = 0,9563], não havendo diferenças entre o comportamento depressivo que recebeu salina ou LPS [F (1, 103) = 1,883; P = 0,1729], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [F (1, 103) = 2,896; P = 0,0918].

Em relação ao tempo de imobilidade dos camundongos depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF3, ilustrada pela fig. 14-C, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [F (1, 92) = 0,126; P = 0,7233], não havendo diferenças entre o comportamento depressivo que recebeu salina ou LPS [F (1, 92) = 0,435; P = 0,5112], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [F (1, 92) = 0,126; P = 0,7233].

Figura 14 - Teste de Suspensão da Cauda: comparação transgeracional entre o tempo de imobilidade em segundos dos camundongos fêmeas depressivas da GF1, GF2 e GF3, cuja GP foi exposta a 100 µg/Kg de LPS ou solução salina, i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam à média ± S.E.M., ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey; (GF1: depressivo salina n=24, depressivo LPS n=27; F2: depressivo salina n=34, depressivo LPS n=28; GF3: depressivo salina n=20, depressivo LPS n=25); considera-se significância quando P < 0,05.

A fig. 15 ilustra os resultados da comparação transgeracional do tempo de imobilidade de camundongos fêmeas não depressivas das GF1, GF2 e GF3 avaliadas pelo

teste de suspensão da cauda, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º dia de sua prenhez.

Em relação ao tempo de imobilidade dos camundongos não depressivos da GF1 comparada com animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 15-A, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 81) = 1,454$; $P = 0,2314$], não havendo diferenças entre o comportamento não depressivo que recebeu salina ou LPS [$F(1, 81) = 0,326$; $P = 0,5695$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 81) = 0,326$; $P = 0,5695$].

Em relação ao tempo de imobilidade dos camundongos não depressivos da GF2 comparada com animais de mesmo comportamento da GF3, ilustrada pela fig. 15-B, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 58) = 1,319$; $P = 0,2555$], sem diferenças entre o comportamento não depressivo que recebeu salina ou LPS [$F(1, 58) = 2,311$; $P = 0,1339$] e, sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 58) = 0,4671$; $P = 0,4971$].

Em relação ao tempo de imobilidade dos camundongos não depressivos da GF1 comparada com animais de mesmo comportamento da GF3, ilustrada pela fig. 15-C, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 47) = 2,250$; $P = 0,1403$], sem diferenças o comportamento não depressivo que recebeu salina ou LPS [$F(1, 47) = 0,661$; $P = 0,4201$] e, sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 47) = 0,661$; $P = 0,4201$].

Figura 15 - Teste de Suspensão da Cauda: comparação transgeracional entre o tempo de imobilidade em segundos dos camundongos fêmeas não depressivas das GF1, GF2 e GF3, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de LPS ou solução salina, via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam à média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey; (GF1: não depressivo salina n=19, não depressivo LPS n=18; GF2: não depressivo salina n=25, não depressivo LPS n=23; GF3: não depressivo salina n=11, não depressivo LPS n=3); considera-se significância quando $P < 0,05$.

4.3 EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNAL DE CAMUNDONGOS DA GP, GF1 E GF2 NO DIA PÓS-NATAL 5

A tabela 3 ilustra os resultados da latência de recuperação dos 4 primeiros filhotes durante o teste de comportamento materno realizado no PND5 das mães da GP, GF1 e GF2 cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina, via i.p no 15º dia de sua prenhez bem como a comparação transgeracional destas latências.

Em relação à latência de recuperação do 1º filhote da GP, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 22) = 3,589$; $P > 0,9999$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 22) = 0,025$; $P = 0,8752$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 22) = 0,404$; $P = 0,5316$].

Em relação à latência de recuperação do 2º filhote da GP, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 22) = 2,288$; $P = 0,1446$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 22) = 1,426$; $P = 0,2451$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 22) = 0,006$; $P = 0,9373$].

Em relação à latência de recuperação do 3º filhote da GP, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 22) = 1,377$; $P = 0,2531$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 22) = 0,740$; $P = 0,3987$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 22) = 0,153$; $P = 0,6994$].

Em relação à latência de recuperação do 4º filhote da GP, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 22) = 0,0$; $P > 0,9999$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 22) = 0,457$; $P = 0,5057$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 22) = 0,0$; $P > 0,9999$].

Em relação à latência de recuperação do 1º filhote da GF1, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 27) = 0,982$; $P = 0,3305$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 27) = 0,027$; $P = 0,8700$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 27) = 0,982$; $P = 0,3305$].

Em relação à latência de recuperação do 2º filhote da GF1, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 27) = 4,209$; $P = 0,0500$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 27) = 0,730$; $P = 0,4002$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 27) = 1,052$; $P = 0,3141$].

Em relação à latência de recuperação do 3º filhote da GF1, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 27) = 7,579$; $P = 0,0104$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 27) = 0,118$; $P = 0,7334$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 27) = 2,398$; $P = 0,1331$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo LPS e Depressivo LPS ($P < 0,05$ *). Nota-se que as mães do grupo depressivo demoraram mais para buscar o terceiro filhote.

Em relação à latência de recuperação do 4º filhote da GF1, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 27) = 11,09$; $P = 0,0025$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 27) = 0,3574$; $P = 0,5550$], sem evidências de efeito de interação entre

estes dois fatores [$F(1, 27) = 2,633$; $P = 0,1163$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo LPS e Depressivo LPS ($P < 0,05$ *). Nota-se que as mães do grupo depressivo demoraram mais para buscar o terceiro filhote.

Em relação à latência de recuperação do 1º filhote da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 16) = 0,037$; $P = 0,8485$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 16) = 0,942$; $P = 0,3461$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 16) = 0,004$; $P = 0,9492$].

Em relação à latência de recuperação do 2º filhote da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 16) = 0,091$; $P = 0,7660$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 16) = 1,059$; $P = 0,3187$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 16) = 0,032$; $P = 0,8582$].

Em relação à latência de recuperação do 3º filhote da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 16) = 0,212$; $P = 0,6511$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 16) = 0,757$; $P = 0,3969$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 16) = 0,023$; $P = 0,8798$].

Em relação à latência de recuperação do 4º filhote da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 16) = 6,117$; $P > 0,9999$], não havendo diferenças entre o tratamento com salina e LPS [$F(1, 16) = 0,843$; $P = 0,3720$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 16) = 0,017$; $P = 0,8972$].

Com relação à avaliação transgeracional, verifica-se que, a latência de recuperação do 1º filhote dos animais depressivos da GP comparado com a latência de recuperação do 1º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF1, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 28) = 2,244$; $P = 0,1453$], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com salina ou LPS [$F(1, 28) = 0,027$; $P = 0,8690$] e , sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 28) = 0,443$; $P = 0,5110$].

No mesmo sentido, à latência de recuperação do 1º filhote dos animais depressivos da GP comparada com a latência de recuperação do 1º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 24) = 6,138$; $P = 0,0207$], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com salina ou LPS [$F(1, 24) = 0,159$; $P = 0,6930$] e , sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 24) = 0,772$; $P = 0,3881$]. O

teste *post hoc* de Tukey, contudo, não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Ainda, à latência de recuperação do 1º filhote dos animais depressivos da GF1 comparado com a latência de recuperação do 1º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 28) = 1,284$; $P = 0,266$], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com salina ou LPS [$F(1, 28) = 1,284$; $P = 0,2667$] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 28) = 0,068$; $P = 0,7956$].

Em relação à latência de recuperação do 1º filhote dos animais não depressivos da GP comparado com a latência de recuperação do 1º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF1, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 21) = 5,706$; $P = 0,0264$], não havendo diferenças no comportamento não depressivo tratado com salina ou LPS [$F(1, 21) = 0,025$; $P = 0,8750$] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 21) = 0,913$; $P = 0,3502$]. O teste *post hoc* de Tukey, contudo, não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Em relação à latência de recuperação do 1º filhote dos animais não depressivos da GP GPI comparado com a latência de recuperação do 1º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 14) = 3,565$; $P = 0,0799$], não havendo diferenças no comportamento não depressivo tratado com salina ou LPS [$F(1, 14) = 0,654$; $P = 0,4319$] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 14) = 0,018$; $P = 0,8946$].

Em relação à latência de recuperação do 1º filhote dos animais não depressivos da GF1 comparado com a latência de recuperação do 1º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 15) = 0,014$; $P = 0,9053$], não havendo diferenças no comportamento não depressivo tratado com salina ou LPS [$F(1, 15) = 0,0$; $P > 0,9999$] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 15) = 0,716$; $P = 0,4106$].

Em relação à latência de recuperação do 2º filhote dos animais depressivos da GP comparado com a latência de recuperação do 2º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF1, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 28) = 2,054$; $P = 0,1629$], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com salina ou LPS [$F(1, 28) = 2,599$; $P = 0,1181$] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 28) = 0,1283$; $P = 0,7228$].

Em relação à latência de recuperação do 2º filhote dos animais depressivos da GP comparada com a latência de recuperação do 2º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [F (1, 24) = 3,328; P = 0,0806], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com salina ou LPS [F (1, 24) = 1,539; P = 0,2268] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [F (1, 24) = 0,047; P = 0,8286]. O teste *post hoc* de Tukey, contudo, não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Em relação à latência de recuperação do 2º filhote dos animais depressivos da GF1 comparado com a latência de recuperação do 2º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações F1 e F2 [F (1, 28) = 15,38; P = 0,0005], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com salina ou LPS [F (1, 28) = 4,034; P = 0,0543] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [F (1, 28) = 0,009; P = 0,9245]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Depressivo LPS (GF1) e Depressivo salina (GF2) (P < 0,01 **), e Depressivo LPS (GF1) e Depressivo LPS (GF2) (P < 0,05 *). Nota-se que os animais do grupo Depressivo LPS da GF1 demoraram mais para recolher seus filhotes em relação aos animais dos dois grupos da GF2.

Em relação à latência de recuperação do 2º filhote dos animais não depressivos da GP comparada com a latência de recuperação do 2º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF1, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [F (1, 21) = 4,170; P = 0,0539], no comportamento não depressivo tratado com salina ou LPS [F (1, 21) = 0,2803; P = 0,6021] sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [F (1, 21) = 0,4633; P = 0,5035].

Em relação à latência de recuperação do 2º filhote dos animais não depressivos da GP comparada com a latência de recuperação do 2º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [F (1, 14) = 9,131; P = 0,0091], não havendo diferenças no comportamento não depressivo tratado com salina ou LPS [F (1, 14) = 1,351; P = 0,2646] sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [F (1, 14) = 0,006; P = 0,9393]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo LPS (GP) e Não Depressivo salina (GF2) (P < 0,05 *). Nota-se que os animais da GP demoraram mais para recolher seus filhotes que aqueles da GF2.

Em relação à latência de recuperação do 2º filhote dos animais não depressivos da GF1 comparada com a latência de recuperação do 2º filhote com os animais de mesmo

comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 15) = 0,401$; $P = 0,5357$], não havendo diferenças no comportamento não depressivo tratado com salina ou LPS [$F(1, 15) = 0,100$; $P = 0,7557$], e sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 15) = 0,178$; $P = 0,6786$].

Em relação à latência de recuperação do 3º filhote dos animais depressivos da GP comparada com a latência de recuperação do 3º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF1, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 28) = 0,744$; $P = 0,3956$], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com salina ou LPS [$F(1, 28) = 0,744$; $P = 0,3956$] sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 28) = 0,119$; $P = 0,7326$].

Em relação à latência de recuperação do 3º filhote dos animais depressivos da GP comparada com a latência de recuperação do 3º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 24) = 4,151$; $P = 0,0528$], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com salina ou LPS [$F(1, 24) = 0,461$; $P = 0,5036$] sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 24) = 0,073$; $P = 0,7882$].

Em relação à latência de recuperação do 3º filhote dos animais depressivos da GF1 comparada com a latência de recuperação do 3º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 28) = 11,97$; $P = 0,0017$], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com salina ou LPS [$F(1, 28) = 1,467$; $P = 0,2360$] e , sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 28) = 4,253$; $P > 0,9999$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Depressivo LPS (GF1) e Depressivo salina (GF2) ($P < 0,05$ *). Nota-se que a latência para buscar o filhote Dos animais Depressivos LPS GF1 apresentaram maior tempo de busca do filhote do que o Depressivo salina da GF2.

Em relação à latência de recuperação do 3º filhote dos animais não depressivos da GP comparada com a latência de recuperação do 3º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF1, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 21) = 8,453$; $P = 0,0084$], não havendo diferença no comportamento não depressivo tratado com salina ou LPS [$F(1, 21) = 0,055$; $P = 0,8159$] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 21) = 2,229$; $P = 0,1503$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo LPS (GF1) e Não Depressivo salina (GF2) ($P < 0,05$ *). Nota-se que a latência para recuperação do filhote foi maior nos animais do grupo Não Depressivo LPS da GP em relação ao Não Depressivo LPS da GF1.

Em relação à latência de recuperação do 3º filhote dos animais não depressivos da GP comparada com a latência de recuperação do 3º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [F (1, 14) = 5,768; P = 0,0308], não havendo diferenças no comportamento não depressivo tratado com salina ou LPS [F (1, 14) = 1,442; P = 0,2497] sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [F (1, 14) = 0,017; P = 0,8958]. O teste *post hoc* de Tukey, contudo, não revelou diferenças estatisticamente significantes entre grupos.

Em relação à latência de recuperação do 3º filhote dos animais não depressivos da GF1 comparada com a latência de recuperação do 3º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [F (1, 15) = 0,002; P = 0,9600], não havendo diferenças no comportamento não depressivo tratado com salina ou LPS [F (1, 15) = 0,002; P = 0,9600] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [F (1, 15) = 1,148; P = 0,3008].

Em relação à latência de recuperação do 4º filhote dos animais depressivos da GP comparada com a latência de recuperação do 4º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF1, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [F (1, 28) = 0,808; P = 0,3761], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com salina ou LPS [F (1, 28) = 0,808; P = 0,3761] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [F (1, 28) = 0,006; P = 0,9354].

Em relação à latência de recuperação do 4º filhote dos animais depressivos da GP comparada com a latência de recuperação do 4º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações parental e F2 [F (1, 24) = 6,614; P = 0,0167], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com salina ou LPS [F (1, 24) = 0,912; P = 0,3490] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [F (1, 24) = 0,048; P = 0,8274]. O teste *post hoc* de Tukey, contudo não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Em relação à latência de recuperação do 4º filhote dos animais depressivos da GF1 comparada com a latência de recuperação do 4º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações F1 e F2 [F (1, 28) = 16,25; P = 0,0004], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com salina ou LPS [F (1, 28) = 1,505; P = 0,2302] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [F (1, 28) = 0,030; P = 0,8622]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Depressivo Salina (GF1) e Depressivo Salina (GF2) (P < 0,05 *), e

Depressivo LPS (GF1) e Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,01^{**}$). Nota-se que os animais da GF1 levaram mais tempo para recolher o filhote que a GF2.

Em relação à latência de recuperação do 4º filhote dos animais não depressivos da GP comparada com a latência de recuperação do 4º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF1, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 21) = 3,939$; $P = 0,0604$], não havendo diferença no comportamento não depressivo tratado com salina ou LPS [$F(1, 21) = 0,321$; $P = 0,5767$] e, sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 21) = 1,628$; $P = 0,2159$].

Em relação à latência de recuperação do 4º filhote dos animais não depressivos da GP comparada com a latência de recuperação do 4º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 14) = 4,404$; $P = 0,0545$], não havendo diferenças no comportamento não depressivo tratado com salina ou LPS [$F(1, 14) = 0,435$; $P = 0,5202$] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 14) = 0,003$; $P = 0,9530$].

Em relação à latência de recuperação do 4º filhote dos animais não depressivos da GF1 comparada com a latência de recuperação do 4º filhote com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 15) = 0,204$; $P = 0,6577$], não havendo diferenças no comportamento não depressivo tratado com salina ou LPS [$F(1, 15) = 0,204$; $P = 0,6577$] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 15) = 1,505$; $P = 0,2388$].

Tabela 3 - Teste de Comportamento Materno: escore da latência de recuperação dos 4 primeiros filhotes no DPN5 das mães da GP, GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina, via i.p no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam à média ± S.E.M., ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey; (GP: não depressivo salina n=6, não depressivo LPS n=6, depressivo salina n=6, depressivo LPS n=8; GF1: não depressivo salina n=7, não depressivo LPS n=6, depressivo salina n=9, depressivo LPS n=9; GF2: não depressivo salina n=3, não depressivo LPS n=3, depressivo salina n=7, depressivo LPS n=7); considera-se significância quando $P < 0,05$.

		GP		GF1		GF2	
		Salina	LPS	Salina	LPS	Salina	LPS
1º Filhote	Não Depressivo	3.8 ± 0.75	4.3 ± 0.33	2.9 ± 0.70	2.2 ± 0.60	2.3 ± 0.88	3.0 ± 1.00
	Depressivo	4.2 ± 0.65	3.9 ± 0.64	2.9 ± 0.59	3.4 ± 0.50	2.1 ± 0.46	2.9 ± 0.70
2º Filhote	Não Depressivo	4.2 ± 0.65	5.0 ± 0.00 Θ	3.3 ± 0.81	3.2 ± 0.75	2.3 ± 0.88 Θ	3.0 ± 1.00
	Depressivo	3.3 ± 0.80	4.0 ± 0.65	3.9 ± 0.59	5.0 ± 0.00 δ ψ	1.9 ± 0.59 ψ	2.9 ± 0.70 δ
3º Filhote	Não Depressivo	4.2 ± 0.65	5.0 ± 0.00 ζ	3.3 ± 0.81	2.2 ± 0.65 ζ	2.3 ± 1.30	3.3 ± 1.20
	Depressivo	3.7 ± 0.84	4.0 ± 0.65	4.0 ± 0.58	4.7 ± 0.24 α Ω	2.0 ± 0.65 Ω	2.7 ± 0.81
4º Filhote	Não Depressivo	3.5 ± 0.81	4.0 ± 0.68	3.0 ± 0.76	1.7 ± 0.49	1.7 ± 0.67	2.3 ± 0.67
	Depressivo	3.5 ± 0.81	4.0 ± 0.65	4.0 ± 0.58 €	4.6 ± 0.44 α π	1.6 ± 0.57 € π	2.4 ± 0.69

α - Entre Depressivo e Não Depressivo de mesma geração; **ψ** - Entre Depressivo LPS GF1 e Depressivo salina GF2; **δ** - Entre o Depressivo LPS GF1 e Depressivo LPS GF2; **Θ** - Entre Não Depressivo LPS GP e Não depressivo salina GF2; **Ω** - Entre Depressivo LPS GF1 e Depressivo salina GF2; **ζ** - Entre Não depressivo LPS GP e Não depressivo LPS GF1; **€** - Entre Depressivo salina GF1 e Depressivo salina GF2; **π** - Entre Depressivo LPS GF1 e Depressivo salina GF2. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Tukey

A tabela 4 ilustra os resultados da frequência total, tempo total e comparação transgeracional de *hovering* da GP, GF1 e GF2, além dos resultados em escore do comportamento maternal total e sua comparação transgeracional durante o teste de comportamento materno realizado no DPN5, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou salina via i.p no 15º dia de sua prenhez.

Em relação à frequência total de *hovering* da GP, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 22) = 0,027$; $P = 0,8702$], não havendo diferenças entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 22) = 0,094$; $P = 0,7617$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 22) = 1,567$; $P = 0,2238$].

Em relação à frequência total de *hovering* da GF1, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 27) = 6,107$; $P = 0,0201$], não havendo diferença entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 27) = 1,527$; $P = 0,2273$], e não havendo evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 27) = 0,0$; $P > 0,9999$]. O teste *post hoc* de Tukey, contudo, não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Em relação à frequência total de *hovering* da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 16) = 0,0$; $P > 0,9999$], não havendo diferenças entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 16) = 0,856$; $P = 0,3685$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 16) = 0,0$; $P > 0,9999$].

Em relação à frequência total de *hovering* dos animais depressivos da GP comparado com os animais de mesmo comportamento da GF1, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 28) = 2,547$; $P = 0,1217$], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 28) = 2,547$; $P = 0,1217$], e não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 28) = 0,283$; $P = 0,5989$].

Em relação à frequência total de *hovering* dos animais depressivos da GP comparado com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações parental e F2 [$F(1, 24) = 2,677$; $P = 0,1149$], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 24) = 1,190$; $P = 0,2862$], e não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 24) = 0,0$; $P > 0,9999$].

Em relação à frequência total de *hovering* dos animais depressivos da GF1 comparado com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações F1 e F2 [$F(1, 28) = 0,0$; $P > 0,9999$], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com solução

salina ou LPS [$F(1, 28) = 2,880$; $P = 0,1008$], e, sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 28) = 0,320$; $P = 0,5761$].

Em relação à frequência total de *hovering* dos animais não depressivos da GP comparado com os animais de mesmo comportamento da GF1, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações parental e F1 [$F(1, 21) = 7,184$; $P = 0,0140$], não havendo diferenças no comportamento não depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 21) = 0,040$; $P = 0,8421$]; contudo, foi observada evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 21) = 4,427$; $P = 0,0476$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos Não Depressivo Salina (GP) e Não Depressivo salina (F1) ($P < 0,05$ *).

Em relação à frequência total de *hovering* dos animais não depressivos da GP comparado com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações parental e F2 [$F(1, 14) = 1,019$; $P = 0,3300$], não havendo diferenças no comportamento não depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 14) = 0,061$; $P = 0,8081$], não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 14) = 1,019$; $P = 0,3300$].

Em relação à frequência total de *hovering* dos animais não depressivos da GF1 comparado com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações F1 e F2 [$F(1, 15) = 1,565$; $P = 0,2301$], não havendo diferenças no comportamento não depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 15) = 3,521$; $P = 0,0802$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 15) = 0,391$; $P = 0,5410$].

Em relação ao tempo total de *hovering* da GP, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 22) = 7,521$; $P = 0,0119$], não havendo diferença entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 22) = 3,343$; $P = 0,0811$], sendo também observada evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 22) = 5,942$; $P = 0,0233$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos Não Depressivo Salina e Não Depressivo LPS ($P < 0,01$ **) e Não Depressivo LPS e Depressivo LPS ($P < 0,05$ *) e Não depressivo LPS e Depressivo salina ($P < 0,05$ *) sendo esta última comparação não biologicamente significativa.

Em relação ao tempo total de *hovering* da GF1, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 27) = 1,872$; $P = 0,1825$], entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 27) = 3,261$; $P = 0,0821$], não havendo evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 27) = 1,872$; $P = 0,1825$].

Em relação ao tempo total de *hovering* da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 16) = 0,059$; $P = 0,8108$], não havendo diferenças entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 16) = 0,030$; $P = 0,8642$], não havendo também evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 16) = 0,030$; $P = 0,8642$].

Em relação ao tempo total de *hovering* dos animais depressivos da GP comparado com os animais de mesmo comportamento da GF1, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 28) = 11,92$; $P = 0,0018$], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 28) = 3,621$; $P = 0,0674$], havendo evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 28) = 4,773$; $P = 0,0374$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos Depressivo Salina (GP) e Depressivo Salina (F1) ($P < 0,01^{**}$), Depressivo LPS (GP) e Depressivo LPS (F1) ($P < 0,01^{**}$), e Depressivo Salina (F1) e Depressivo LPS (F1) ($P < 0,05^{*}$).

Em relação ao tempo total de *hovering* dos animais depressivos da GP comparado com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 24) = 9,119$; $P = 0,0059$], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 24) = 0,137$; $P = 0,7140$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 24) = 0,025$; $P = 0,8751$]. O teste de Tukey não revelou diferenças entre os grupos.

Em relação ao tempo total de *hovering* dos animais depressivos da GF1 comparado com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 28) = 0,170$; $P = 0,6829$], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 28) = 1,533$; $P = 0,2259$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 28) = 3,077$; $P = 0,0903$].

Em relação ao tempo total de *hovering* dos animais não depressivos da GP comparado com os animais de mesmo comportamento da GF1, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 21) = 6,778$; $P = 0,0166$], não havendo diferenças no comportamento não depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 21) = 2,440$; $P = 0,1332$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 21) = 3,915$; $P = 0,0611$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos Não Depressivo Salina (GP) e Não Depressivo Salina (F1) ($P < 0,05^{*}$), e Não Depressivo Salina (GP) e Não Depressivo LPS (F1) ($P < 0,05^{*}$).

Em relação à frequência total de *hovering* dos animais não depressivos da GP comparado com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não

revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações parental e F2 [$F(1, 14) = 1,838$; $P = 0,1966$], não havendo diferenças no comportamento não depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 14) = 3,143$; $P = 0,0980$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 14) = 3,143$; $P = 0,0980$].

Em relação ao tempo total de *hovering* dos animais não depressivos da GF1 comparado com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 15) = 0,872$; $P = 0,3650$], não havendo diferenças no comportamento não depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 15) = 0,024$; $P = 0,8783$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 15) = 0,024$; $P = 0,8783$].

Em relação ao escore do comportamento maternal total da GP, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 22) = 4,018$; $P = 0,0575$], não havendo diferenças entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 22) = 4,018$; $P = 0,0575$], havendo contudo, evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 22) = 13,02$; $P = 0,0016$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo Salina e Não Depressivo LPS ($P < 0,01^{**}$), e Não Depressivo LPS e Depressivo LPS ($P < 0,01^{**}$).

Em relação ao escore do comportamento maternal total da GF1, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 27) = 5,769$; $P = 0,0235$], entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 27) = 5,769$; $P = 0,0235$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 27) = 0,0$; $P > 0,9999$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos Não Depressivo LPS e Depressivo Salina ($P < 0,05^{*}$), sendo este dado não biologicamente significativo.

Em relação ao escore do comportamento maternal total da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 16) = 3,641$; $P = 0,0745$], não havendo diferenças entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 16) = 0,910$; $P = 0,3543$], também não havendo evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 16) = 0,910$; $P = 0,3543$].

Em relação ao escore do comportamento maternal total dos animais depressivos da GP comparado com os animais de mesmo comportamento da GF1, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações parental e F1 [$F(1, 28) = 4,070$; $P = 0,0533$], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 28) = 0,452$; $P = 0,5068$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 28) = 4,070$; $P = 0,0533$].

Em relação ao escore do comportamento maternal total dos animais depressivos da GP comparado com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações parental e F2 [$F(1, 24) = 0,0$; $P > 0,9999$], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 24) = 0,661$; $P = 0,4240$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 24) = 0,661$; $P = 0,4240$].

Em relação ao escore do comportamento maternal total dos animais depressivos da GF1 comparado com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações F1 e F2 [$F(1, 28) = 3,544$; $P = 0,0702$], não havendo diferenças no comportamento depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 28) = 1,575$; $P = 0,2198$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 28) = 1,575$; $P = 0,2198$].

Em relação ao escore do comportamento maternal total dos animais não depressivos da GP comparado com os animais de mesmo comportamento da GF1, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 21) = 8,811$; $P = 0,0073$], diferenças no comportamento não depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 21) = 13,16$; $P = 0,0016$], não havendo evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 21) = 0,979$; $P = 0,3337$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos Não Depressivo Salina (GP) e Não Depressivo LPS (GP) ($P < 0,05$ *), Não Depressivo Salina (GP) e Não Depressivo Salina (F1) ($P < 0,05$ *), e Não Depressivo Salina (GP) e Não Depressivo LPS (F1) ($P < 0,001$ ***).

Em relação ao escore do comportamento maternal total dos animais não depressivos da GP comparado com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa no comportamento não depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 14) = 6,442$; $P = 0,0237$], não havendo diferenças entre as gerações [$F(1, 14) = 0,479$; $P = 0,5001$], e não havendo evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 14) = 0,479$; $P = 0,5001$]. O teste *post hoc* de Tukey contudo, não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Em relação ao escore do comportamento maternal total dos animais não depressivos da GF1 comparado com os animais de mesmo comportamento da GF2, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 15) = 1,852$; $P = 0,1936$], não havendo diferenças no comportamento não depressivo tratado com solução salina ou LPS [$F(1, 15) = 3,293$; $P = 0,0896$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 15) = 7,311$; $P > 0,9999$].

Tabela 4 - Teste de Comportamento Materno: escore do comportamento maternal total no DPN5 dos camundongos fêmeas da GP, F1 e F2, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam à média ± S.E.M., ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; (GP: não depressivo salina n=6, não depressivo LPS n=6, depressivo salina n=6, depressivo LPS n=8; F1: não depressivo salina n=7, não depressivo LPS n=6, depressivo salina n=9, depressivo LPS n=9; F2: não depressivo salina n=3, não depressivo LPS n=3, depressivo salina n=7, depressivo LPS n=7); considera-se significância quando $P < 0,05$.

		GP		GF1		GF2	
		Salina	LPS	Salina	LPS	Salina	LPS
Frequência	Não depressivo	9,7 ± 1,9 Θ	13 ± 2,6	18 ± 1,2 Θ	14 ± 0,85	15 ± 3,2	13 ± 1,5
<i>Hovering</i>	Depressivo	12 ± 2,9	10 ± 1,1	16 ± 1,5	12 ± 2,0	15 ± 1,3	13 ± 2,0
Tempo Total	Não depressivo	160 ± 42 ψ Θ Ω	500 ± 100 α ψ	600 ± 100 Θ	560 ± 120 Ω	460 ± 140	460 ± 86
<i>Hovering</i>	Depressivo	200 ± 60	220 ± 51 α ζ	600 ± 85 δ	310 ± 67 δ ζ	470 ± 82	520 ± 150
Escore CMT	Não depressivo	1,0 ± 0,0 ψ Θ Ω	1,7 ± 0,21 α ψ	1,6 ± 0,20 Θ	2,0 ± 0,0 Ω	1,3 ± 0,33	1,7 ± 0,33
	Depressivo	1,2 ± 0,17	1,0 ± 0,0 α	1,2 ± 0,15	1,6 ± 0,18	1,1 ± 0,14	1,1 ± 0,14

α - Entre Depressivo e Não Depressivo de mesma geração; **ψ** - Entre Não Depressivo salina e Não Depressivo LPS; **δ** - Entre o Depressivo Salina e Depressivo LPS ; **Θ** - Entre Não Depressivo Salina GP e Não depressivo salina GF1; **Ω** - Entre Não Depressivo salina GP e Não Depressivo LPS GF1 ; **ζ** – Entre Depressivo LPS GP e Depressivo LPS GF1. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

4.4 EXPERIMENTO 4 - AVALIAÇÃO DOS CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS DA GF1 E GF2 NO TESTE DE CAMPO ABERTO

A fig. 15 ilustra os resultados da distância percorrida no teste de campo aberto dos machos selecionados das gerações F1 e F2, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º dia de sua prenhez.

Em relação à distância percorrida pela GF1, ilustrada pela fig. 15-A, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 2,575$; $P = 0,1173$], entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 1,543$; $P = 0,2223$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,5402$; $P = 0,4671$].

Em relação à distância percorrida pela GF2, ilustrada pela fig. 15-B, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 0,717$; $P = 0,4026$], entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 1,032$; $P = 0,3164$], sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,026$; $P = 0,8705$].

Em relação à distância percorrida pelos animais depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 15-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 14,83$; $P = 0,0005$], não havendo diferença no comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 2,224$; $P = 0,1446$], sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,1902$; $P = 0,6654$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina (GF1) e Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,05$ *), bem como entre Depressivo Salina (GF1) e Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,01$ **).

Em relação à distância percorrida pelos animais não depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 15-D., a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 28,93$; $P < 0,0001$], não havendo diferença no comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,525$; $P = 0,4731$], sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,023$; $P = 0,8783$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo Salina (GF1) e Não Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,01$ **), Não Depressivo Salina (GF1) e Não Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,001$ ***), Não Depressivo LPS (GF1) e Não Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,05$ *), e Não Depressivo LPS (GF1) e Não Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,01$ **).

Figura 15 - Campo Aberto: distância percorrida em centímetros dos camundongos machos da GF1 e GF2 selecionados pelo teste de suspensão da cauda, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de solução salina ou LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média ± S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 16 ilustra os resultados da velocidade média percorrida no teste de campo aberto dos machos selecionados das GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º de sua prenhez.

Em relação à velocidade média da GF1, ilustrada pela fig. 16-A, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 2,530$; $P = 0,1204$], entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 1,506$; $P = 0,2278$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,4211$; $P = 0,5205$].

Em relação à velocidade média da GF2, ilustrada pela fig. 16-B a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 0,6218$; $P = 0,4355$], entre o tratamento com solução

salina e LPS [$F(1, 36) = 1,093$; $P = 0,3028$], sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,049$; $P = 0,8260$].

Em relação à velocidade média dos animais depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 16-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 15,67$; $P = 0,0003$], não havendo diferença no comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 2,213$; $P = 0,1456$], sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,120$; $P = 0,7306$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina (GF1) e Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,05^*$), bem como entre Depressivo Salina (GF1) e Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,01^{**}$).

Em relação à velocidade média dos animais não depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 16-D a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 30,08$; $P < 0,0001$], não havendo diferença no comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,557$; $P = 0,4603$], sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,010$; $P = 0,9203$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo Salina (GF1) e Não Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,01^{**}$), Não Depressivo Salina (GF1) e Não Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,001^{***}$), Não Depressivo LPS (GF1) e Não Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,01^{**}$), e Não Depressivo LPS (GF1) e Não Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,01^{**}$).

Figura 16 - Campo Aberto: velocidade média em centímetros por segundos dos camundongos machos da GF1 e GF2 selecionados pelo teste de suspensão da cauda, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de solução salina ou LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 17 ilustra os resultados do tempo de imobilidade no teste de campo aberto dos machos selecionados das GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º de sua prenhez.

Em relação ao tempo de imobilidade da GF1, ilustrada pela fig. 17-A, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significante entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 5,618$; $P = 0,0233$], não havendo diferença entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 2,904$; $P = 0,0970$] e, não havendo evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,048$; $P = 0,8270$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significante entre os comportamentos Não Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,05$ *), sendo esse não biologicamente significante.

Em relação ao tempo de imobilidade da GF2, ilustrada pela fig. 17-B a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 9,628$; $P = 0,0037$], não havendo diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 0,229$; $P = 0,6348$], não havendo também evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 1,973$; $P = 0,1688$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,05$ *).

Em relação ao tempo de imobilidade dos animais depressivos da GF1 comparada com os animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 17-C a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 11,92$; $P = 0,0014$], entre as gerações [$F(1, 36) = 7,046$; $P = 0,0118$], não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 3,222$; $P = 0,0811$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina (GF1) e Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,001$ ***), Depressivo LPS (GF1) e Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,05$ *) e, Depressivo Salina (GF1) e Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,01$ **).

Em relação ao tempo de imobilidade dos animais não depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 17-D, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 13,28$; $P = 0,0008$], não havendo diferença no comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 3,675$; $P = 0,0632$], e também não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,1182$; $P = 0,7330$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo Salina (GF1) e Não Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,01$ **) e, Não Depressivo LPS (GF1) e Não Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,05$ *).

Figura 17 - Campo Aberto: tempo de imobilidade em segundos dos camundongos machos da GF1 e GF2 selecionados pelo teste de suspensão da cauda, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de solução salina ou LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média e o S.E.M. de uma ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 18 ilustra os resultados da frequência de imobilidade no teste de campo aberto dos machos selecionados das GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º dia de sua prenhez.

Em relação à frequência de imobilidade da GF1, ilustrada pela fig. 18-A a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 19,18$; $P < 0,0001$], entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 38,56$; $P < 0,0001$], havendo também evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 17,70$; $P = 0,0002$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo LPS e Depressivo LPS ($P < 0,0001$) e Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,0001$ ****).

bem como entre Não Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,0001$ ****) sendo esta última comparação não biologicamente significativa.

Em relação à frequência de imobilidade da GF2, ilustrada pela fig. 18-B, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 9,365$; $P = 0,0042$], não havendo diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 1,597$; $P = 0,2145$], sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 2,116$; $P = 0,1544$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,05$ *) e Não Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,05$ *) sendo a comparação entre estes dois últimos grupos não é biologicamente significativa.

Em relação à frequência de imobilidade dos animais depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 18-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 29,89$; $P < 0,0001$] e entre as gerações [$F(1, 36) = 4,252$; $P = 0,0465$], não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,1828$; $P = 0,6715$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina (GF1) e Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,0001$ ****).

Em relação à frequência de imobilidade dos animais não depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 18-D, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 6,826$; $P = 0,0130$], não havendo diferença no comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 2,502$; $P = 0,1225$], sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,338$; $P = 0,5643$]. O teste *post hoc* de Tukey não revelou diferenças significante entre as gerações, mas sim na mesma geração, como citado anteriormente.

Figura 18 - Campo Aberto: frequência de imobilidade dos camundongos machos da GF1 e GF2 selecionados pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 19 ilustra os resultados do tempo de permanência na periferia da arena durante o teste de campo aberto dos machos selecionados das GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 μ g/Kg de LPS ou solução salina via i.p. no 15º dia de sua prenhez.

Em relação ao tempo de permanência na periferia da arena da GF1, ilustrada pela fig. 19-A, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 1,437$; $P = 0,2384$], entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 0,977$; $P = 0,3295$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,630$; $P = 0,4322$].

Em relação ao tempo de permanência na periferia da arena da GF2, ilustrada pela fig. 19-B, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 3,138$; $P = 0,0850$], entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 0,312$; $P = 0,5795$], contudo, foram observadas evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 10,89$; $P = 0,0022$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo Salina e Depressivo Salina ($P < 0,01^{**}$) e Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,05^{*}$).

Em relação ao tempo de permanência na periferia da arena dos animais depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 19-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa no comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 4,514$; $P = 0,0406$], entre as gerações [$F(1, 36) = 12,01$; $P = 0,0014$], sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 3,861$; $P = 0,0572$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina (GF1) e Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,01^{**}$), Depressivo LPS (GF1) e Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,01^{**}$).

Em relação ao tempo de permanência na periferia da arena dos animais não depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 19-D, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 8,297$; $P = 0,0066$], não havendo diferença no comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,648$; $P = 0,4259$], contudo, foram observadas evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 5,980$; $P = 0,0195$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo LPS (GF1) e Não Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,01^{**}$).

Figura 19 - Campo Aberto: tempo de permanência na periferia da arena em segundos dos camundongos machos da GF1 e GF2 selecionados pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 20 ilustra os resultados da frequência de entradas na periferia da arena no teste de campo aberto dos machos selecionados da GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 μ g/Kg de LPS ou solução salina via i.p. no 15º dia de sua prenhez.

Em relação à frequência de entradas na periferia pela GF1, ilustrada pela fig. 20-A, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 7,986$; $P = 0,0076$], não havendo diferença entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 0,594$; $P = 0,4459$], contudo, foram observadas evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 8,312$; $P = 0,0066$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo LPS e Depressivo LPS ($P < 0,01$ **).

Em relação à frequência de entradas na periferia pela GF2, ilustrada pela fig. 20-B, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 5,280$; $P = 0,0275$], não havendo diferença entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 4,052$; $P = 0,0516$], sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,050$; $P = 0,8243$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo LPS e Depressivo Salina ($P < 0,05$ *), sendo essa última comparação não biologicamente significativa.

Em relação à frequência de entradas na periferia pelos animais depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 20-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 9,811$; $P = 0,0034$], não havendo diferença no comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,001$; $P = 0,9655$], contudo, foram encontradas evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 7,512$; $P = 0,0095$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina (GF1) e Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,01$ **).

Em relação à frequência de entradas na periferia pelos animais não depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 20-D, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 5,054$; $P = 0,0308$], entre as gerações [$F(1, 36) = 13,53$; $P = 0,0008$], sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,127$; $P = 0,7227$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo Salina (GF1) e Não Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,05$ *), e Não Depressivo LPS (GF1) e Não Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,001$ ***).

Figura 20 - Campo Aberto: frequência de entradas na periferia da arena dos camundongos machos da GF1 e GF2 selecionados pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 21 ilustra os resultados do tempo de permanência no centro da arena no teste de campo aberto dos machos selecionados da GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 μ g/Kg de LPS ou solução salina via i.p. no 15º dia de sua prenhez.

Em relação ao tempo de permanência no centro da arena da GF1, ilustrada pela fig. 21-A, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 1,556$; $P = 0,2203$], entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 0,802$; $P = 0,3762$], sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 1,688$; $P = 0,2021$].

Em relação ao tempo de permanência no centro da arena da GF2, ilustrada pela fig. 21-B, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 3,840$; $P = 0,0578$], entre o

tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 0,4071$; $P = 0,5275$], contudo, foi encontrada evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 12,01$; $P = 0,0014$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo Salina e Depressivo Salina ($P < 0,01^{**}$), e Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,05^{*}$).

Em relação ao tempo de permanência no centro da arena pelos animais depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 21-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 8,774$; $P = 0,0054$], não havendo diferença no comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 3,834$; $P = 0,0580$], contudo, houve evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 5,251$; $P = 0,0279$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina (GF1) e Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,01^{**}$) e Depressivo LPS (GF1) e Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,01^{**}$).

Em relação ao tempo de permanência no centro da arena pelos animais não depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 21-D, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 5,101$; $P = 0,0301$], não havendo diferença no comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,410$; $P = 0,5260$], contudo, houve evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 7,439$; $P = 0,0098$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo LPS (GF1) e Não Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,01^{**}$).

Figura 21 - Campo Aberto: tempo de permanência no centro da arena em segundos dos camundongos machos da GF1 e GF2 selecionados pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 22 ilustra os resultados da frequência de entradas no centro da arena no teste de campo aberto dos machos selecionados das GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p. no 15º dia de sua prenhez.

Em relação à frequência de entradas no centro da arena pela GF1, ilustrada pela fig. 22-A, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 8,228$; $P = 0,0069$], não havendo diferença entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 0,524$; $P = 0,4735$], contudo, foi encontrada evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 9,611$; $P = 0,0037$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa

entre os comportamentos Não Depressivo LPS e Depressivo LPS ($P < 0,001$ ***), e Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,05$ *).

Em relação à frequência de entradas no centro da arena pela GF2, ilustrada pela fig. 22-B, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 4,015$; $P = 0,0527$], entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 0,025$; $P = 0,8735$], contudo, foi encontrada evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 4,858$; $P = 0,0340$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo Salina e Depressivo Salina ($P < 0,05$).

Em relação à frequência de entradas no centro da arena pelos animais depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 22-C a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 10,42$; $P = 0,0027$], não havendo diferença no comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,022$; $P = 0,8803$], contudo, foi encontrada evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 7,331$; $P = 0,0103$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina (GF1) e Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,001$ ***).

Em relação à frequência de entradas no centro da arena pelos animais não depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 22-D, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 14,12$; $P = 0,0006$], não havendo diferença no comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,064$; $P = 0,8010$], contudo, foi encontrada evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 5,458$; $P = 0,0252$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo Salina (GF1) e Não Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,05$ *), e Não Depressivo LPS (GF1) e Não Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,001$ ***).

Figura 22 - Campo Aberto: frequência de entradas no centro da arena dos camundongos machos da GF1 e GF2 selecionados pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 23 ilustra os resultados da distância percorrida no teste de campo aberto das fêmeas selecionadas das GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 μ g/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º dia de sua prenhez.

Em relação à distância percorrida pela GF1, ilustrada pela fig. 23-A, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 0,867$; $P = 0,3580$], não havendo diferença entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 3,409$; $P = 0,0731$] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,005$; $P = 0,9422$].

Em relação à distância percorrida pela GF2, ilustrada pela fig. 23-B, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 1,551$; $P = 0,2211$], não havendo diferença entre o

tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 1,086$; $P = 0,3044$] e, sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,506$; $P = 0,4814$].

Em relação à distância percorrida pelos animais depressivos da GF1 comparada com os animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 23-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 19,12$; $P = 0,0001$], não havendo diferença no comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,229$; $P = 0,6350$] e, não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 2,291$; $P = 0,1389$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina (GF1) e Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,01^{**}$), Depressivo Salina (GF1) e Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,05^{*}$) e, Depressivo LPS (GF1) e Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,01^{**}$).

Em relação à distância percorrida pelos animais não depressivos da GF1 comparada com os animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 23-D, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 19,41$; $P < 0,0001$], não havendo diferença no comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,219$; $P = 0,6424$] e, não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,885$; $P = 0,3530$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo Salina (GF1) e Não Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,01^{**}$), Não Depressivo Salina (GF1) e Não Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,01^{**}$) e, Não Depressivo LPS (GF1) e Não Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,05^{*}$).

Figura 23 - Campo Aberto: distância percorrida em centímetros dos camundongos fêmeas da GF1 e GF2 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de solução salina ou LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média ± S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 24 ilustra os resultados da velocidade média percorrida no teste de campo aberto das fêmeas selecionadas das GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p. no 15º de sua prenhez.

Em relação à velocidade média da GF1, ilustrada pela fig. 24-A, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 0,431$; $P = 0,5154$], não havendo diferença entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 3,564$; $P = 0,0671$] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,004$; $P = 0,9484$].

Em relação à velocidade média da GF2, ilustrada pela fig. 24-B, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 1,540$; $P = 0,2227$], não havendo diferença entre o

tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 1,111$; $P = 0,2990$] e, sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,440$; $P = 0,5111$].

Em relação à velocidade média dos animais depressivos da GF1 comparada com os animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 24-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 20,35$; $P < 0,0001$], não havendo diferença no comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,232$; $P = 0,6328$] e, não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 2,158$; $P = 0,1505$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina (GF1) e Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,001$ ***), Depressivo Salina (GF1) e Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,05$ *) e, Depressivo LPS (GF1) e Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,01$ **).

Em relação à velocidade média dos animais não depressivos da GF1 comparada com os animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 24-D, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 20,50$; $P < 0,0001$], não havendo diferença no comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,161$; $P = 0,6898$] e, não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,965$; $P = 0,3324$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo Salina (GF1) e Não Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,01$ **), Não Depressivo Salina (GF1) e Não Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,01$ **) e, Não Depressivo LPS (GF1) e Não Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,05$ *).

Figura 24 - Campo Aberto: velocidade média em centímetros por segundo dos camundongos fêmeas da GF1 e GF2 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de solução salina ou LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média ± S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 25 ilustra os resultados do tempo de imobilidade no teste de campo aberto das fêmeas selecionadas das GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º de sua prenhez.

Em relação ao tempo de imobilidade da GF1, ilustrada pela fig. 25-A, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 6,107$; $P = 0,0183$], não havendo diferença entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 0,638$; $P = 0,4293$] e, não havendo evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,269$; $P = 0,6071$]. O teste *post hoc* de Tukey, contudo, não revelou diferenças entre os grupos.

Em relação ao tempo de imobilidade da GF2, ilustrada pela fig. 25-B, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não

depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 1,769$; $P = 0,1919$], não havendo diferença entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 1,764$; $P = 0,1925$] e, sem evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,006$; $P = 0,9378$].

Em relação ao tempo de imobilidade dos animais depressivos da GF1 comparada com os animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 25-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 9,476$; $P = 0,0040$], não havendo diferença entre o comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,371$; $P = 0,5462$] e, não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,774$; $P = 0,3846$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Depressivo Salina (GF1) e Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,05$ *).

Em relação ao tempo de paradas dos animais não depressivos da GF1 comparada com os animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 25-D, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 0,486$; $P = 0,4898$], não havendo diferença entre o comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,0006$; $P = 0,9806$] e, sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 1,599$; $P = 0,2142$].

Figura 25 - Campo Aberto: tempo de paradas em segundos dos camundongos fêmeas da GF1 e GF2 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de solução salina ou LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média ± S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 26 ilustra os resultados da frequência de imobilidade no teste de campo aberto das fêmeas selecionadas das GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º dia de sua prenhez.

Em relação à frequência de imobilidade da GF1, ilustrada pela fig. 26-A, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 11,24$; $P = 0,0019$], havendo diferença entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 32,02$; $P < 0,0001$] e, sendo observado evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 10,83$; $P = 0,0022$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo Salina e Não Depressivo LPS ($P < 0,0001$), Não Depressivo LPS e Depressivo LPS ($P < 0,001$ ***), bem como o Não Depressivo LPS e

Depressivo Salina ($P < 0,0001$ ****), sendo essa última comparação não biologicamente significativa.

Em relação à frequência de imobilidade da GF2, ilustrada pela fig. 26-B, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 1,540$; $P = 0,2226$], não havendo diferença entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 2,212$; $P = 0,1456$] e não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,049$; $P = 0,8259$].

Em relação à frequência de imobilidade dos animais depressivos da GF1 comparada com os animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 26-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 4,195$; $P = 0,0479$], não havendo diferença entre o comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,156$; $P = 0,6946$] e, sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 2,146$; $P = 0,1516$]. O teste *post hoc* de Tukey, contudo, não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Em relação à frequência de imobilidade dos animais não depressivos da GF1 comparada com os animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 26-D, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 4,551$; $P = 0,0398$], não havendo diferença entre as gerações [$F(1, 36) = 1,714$; $P = 0,1987$], contudo, foi observado evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 18,86$; $P = 0,0001$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Não Depressivo LPS (GF1) e Não Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,01$ **).

Figura 26 - Campo Aberto: frequência de imobilidade dos camundongos fêmeas da GF1 e GF2 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 27 ilustra os resultados do tempo de permanência na periferia da arena durante o teste de campo aberto das fêmeas selecionadas das GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 μ g/Kg de LPS ou solução salina via i.p. no 15º dia de sua prenhez.

Em relação ao tempo de permanência na periferia da arena da GF1, ilustrada pela fig. 27-A, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 2,967$; $P = 0,0936$], não havendo diferença entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 1,209$; $P = 0,2787$], contudo, foi encontrado evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 7,188$; $P = 0,0110$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo LPS e Depressivo LPS ($P < 0,05$ *).

Em relação ao tempo de permanência na periferia da arena da GF2, ilustrada pela fig. 27-B, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 4,223$; $P = 0,0472$], não havendo diferenças entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 0,017$; $P = 0,8963$] e, não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,002$; $P = 0,9627$]. O teste *post hoc* de Tukey, contudo, não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos.

Em relação ao tempo de permanência na periferia da arena dos animais depressivos da GF1 comparada com os animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 27-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa no comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 9,553$; $P = 0,0038$], não havendo diferenças entre as gerações [$F(1, 36) = 0,256$; $P = 0,6160$] e, não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 1,501$; $P = 0,2285$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina (GF1) e Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,05^*$).

Em relação ao tempo de permanência na periferia da arena dos animais não depressivos da GF1 comparada aos animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 27-D, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 2,146$; $P = 0,1516$], não havendo diferença no comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,004$; $P = 0,9457$] e, sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 3,027$; $P = 0,0904$].

Figura 27 - Campo Aberto: tempo de permanência na periferia da arena em segundos dos camundongos fêmeas da GF1 e GF2 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 28 ilustra os resultados da frequência de entradas na periferia da arena no teste de campo aberto das fêmeas selecionadas das GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 μ g/Kg de LPS ou solução salina via i.p. no 15º dia de sua prenhez.

Em relação à frequência de entradas na periferia pela GF1, ilustrada pela fig. 28-A, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 7,263$; $P = 0,0106$], havendo diferença entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 8,558$; $P = 0,0059$] e, sendo observado evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 4,203$; $P = 0,0477$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo LPS e Depressivo LPS ($P < 0,01^{**}$), Depressivo

Salina e Depressivo LPS ($P < 0,01^{**}$), bem como o Não Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,01^{**}$), sendo essa última comparação não biologicamente significativa.

Em relação à frequência de entradas na periferia pela GF2, ilustrada pela fig. 28-B, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 4,545$; $P = 0,0399$], não havendo diferença no tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 0,5435$; $P = 0,4658$] e, sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,089$; $P = 0,7668$]. O teste *post hoc* de Tukey contudo, não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Em relação à frequência de entradas na periferia pelos animais depressivos da GF1 comparada com os animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 28-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 5,959$; $P = 0,0197$], não havendo diferença entre as gerações [$F(1, 36) = 0,764$; $P = 0,3877$] e, não havendo evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 2,232$; $P = 0,1439$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina (GF1) e Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,05^{*}$).

Em relação à frequência de entradas na periferia pelos animais não depressivos da GF1 comparada com os animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 28-D, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 2,419$; $P = 0,1286$], não havendo diferença entre o comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,6473$; $P = 0,4264$] e, não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,046$; $P = 0,8313$].

Figura 28 - Campo Aberto: frequência de entradas na periferia da arena dos camundongos fêmeas da GF1 e GF2 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 29 ilustra os resultados do tempo de permanência no centro da arena no teste de campo aberto das fêmeas selecionadas das GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p. no 15º dia de sua prenhez.

Em relação ao tempo de permanência no centro da arena da GF1, ilustrada pela fig. 29-A, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 14,32$; $P = 0,0006$], não havendo diferença entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 3,855$; $P = 0,0574$], havendo contudo, evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 10,60$; $P = 0,0025$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo LPS e Depressivo LPS ($P < 0,0001$ ****),

Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,01^{**}$), bem como no. Não Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,01^{**}$), sendo essa última comparação não biologicamente significativa.

Em relação ao tempo de permanência no centro da arena da GF2, ilustrada pela fig. 29-B, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 4,724$; $P = 0,0364$], não havendo diferença entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 0,007$; $P = 0,9301$] e, não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,1177$; $P = 0,7335$]. O teste *post hoc* de Tukey, contudo, não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Em relação ao tempo de permanência no centro da arena pelos animais depressivos da GF1 comparada com os animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 29-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 9,547$; $P = 0,0038$], não havendo diferença entre as gerações [$F(1, 36) = 1,760$; $P = 0,1930$] e, não sendo observadas evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 2,029$; $P = 0,1629$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina (GF1) e Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,05^{*}$) e, Depressivo LPS (GF1) e Depressivo Salina (GF2) ($P < 0,05^{*}$).

Em relação ao tempo de permanência no centro da arena pelos animais não depressivos da GF1 comparada com os animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 29-D, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 7,133$; $P = 0,0113$], não havendo diferença no comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,5958$; $P = 0,4452$], havendo contudo, evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 5,041$; $P = 0,0310$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo LPS (GF1) e Não Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,01^{**}$).

Figura 29 - Campo Aberto: tempo de permanência no centro da arena em segundos dos camundongos fêmeas da GF1 e GF2 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 30 ilustra os resultados da frequência de entradas no centro da arena no teste de campo aberto das fêmeas selecionadas das GF1 e GF2, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p. no 15º dia de sua prenhez.

Em relação à frequência de entradas no centro da arena pela GF1, ilustrada pela fig. 30-A, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 8,336$; $P = 0,0065$], havendo diferença entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 9,143$; $P = 0,0046$] e, havendo evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 4,665$; $P = 0,0375$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos Não Depressivo LPS e Depressivo LPS ($P < 0,01$ **), Depressivo Salina e

Depressivo LPS ($P < 0,01^{**}$), bem como no Não Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,001^{***}$), sendo essa última comparação não biologicamente significativa.

Em relação à frequência de entradas no centro da arena pela GF2, ilustrada pela fig. 30-B, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 36) = 3,961$; $P = 0,0542$], não havendo diferença entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 36) = 0,6337$; $P = 0,4312$] e, sem evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,077$; $P = 0,7821$].

Em relação à frequência de entradas no centro da arena pelos animais depressivos da GF1 comparada com os animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 30-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa no comportamento depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 6,680$; $P = 0,0139$], não havendo diferença entre as gerações [$F(1, 36) = 0,5648$; $P = 0,4572$] e, não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 2,543$; $P = 0,1195$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina (GF1) e Depressivo LPS (GF2) ($P < 0,05^{*}$).

Em relação à frequência de entradas no centro da arena pelos animais não depressivos da GF1 comparada com os animais de mesmo comportamento da GF2, ilustrada pela fig. 30-D, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre as gerações [$F(1, 36) = 3,117$; $P = 0,0859$], não havendo diferença no comportamento não depressivo que recebeu solução salina ou LPS [$F(1, 36) = 0,690$; $P = 0,4115$] e, não havendo evidências de interação entre estes dois fatores [$F(1, 36) = 0,024$; $P = 0,8771$].

Figura 30 - Campo Aberto: frequência de entradas no centro da arena dos camundongos fêmeas da GF1 e GF2 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; n=10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

4.5 EXPERIMENTO 5 - AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOS CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS DA GF3 DESAFIADOS COM LPS NO TESTE DE CAMPO ABERTO

A fig. 31 ilustra os resultados de distância percorrida (31-A), velocidade média (31-B), tempo de imobilidade (31-C) e frequência de imobilidade (31-D) no teste de campo aberto de camundongos machos da GF3 desafiados com LPS, cujas fêmeas da GP receberam 100 μ g/Kg de LPS ou solução salina via i.p. no 15º dia de sua prenhez.

Em relação à distância percorrida, ilustrada pela figura 31-A, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 26) = 19,59$; $P = 0,0002$], não havendo diferença entre os comportamentos não

depressivo e depressivo [$F(1, 26) = 0,783$; $P = 0,3842$], sendo observado evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 26) = 7,052$; $P = 0,0133$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,0001$ ****).

Em relação à velocidade média, ilustrada pela figura 31-B, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 26) = 21,07$; $P < 0,0001$], não havendo diferença entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 26) = 0,358$; $P = 0,5546$], sendo observado evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 26) = 6,730$; $P = 0,0154$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,0001$ ****).

Em relação ao tempo de imobilidade, ilustrada pela figura 31-C, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 26) = 10,19$; $P = 0,0037$], não havendo diferença entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 26) = 1,132$; $P = 0,2972$], sendo observado evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 26) = 10,19$; $P = 0,0037$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo Salina e Depressivo Salina ($P < 0,05$) e, Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,001$ ***).

Em relação ao frequência de imobilidade, ilustrada pela figura 31-D, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 26) = 1,905$; $P = 0,1793$], não havendo diferenças entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 26) = 3,561$; $P = 0,0704$], havendo contudo, evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 26) = 8,970$; $P = 0,0060$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo Salina e Depressivo Salina ($P < 0,05$) e, Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,01$ **).

Figura 31 - Campo Aberto: distância percorrida (31-A), velocidade média (31-B), tempo de imobilidade (31-C) e frequência de imobilidade (31-D) dos camundongos machos da GF3 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda e desafiados com 100µg/kg de LPS e cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p. no 15º dia de prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste post hoc de Tukey; n=7 para Não Depressivo Salina, n=6 para não Depressivo LPS, n=7 para Depressivo Salina e n=10 para Depressivo LPS; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A fig. 32 ilustra a continuação dos parâmetros observados no teste de campo aberto, sendo o tempo de permanência na periferia (32-A), frequência de entradas na periferia (32-B), tempo de permanência no centro (32-C) e frequência de entradas no centro da arena (32-D) de camundongos machos da GF3 desafiados com LPS, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º dia de sua prenhez.

Em relação ao tempo passado na periferia da arena, ilustrada pela figura 32-A, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 26) = 0,0$; $P > 0,9999$], não havendo diferenças entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 26) = 1,765$; $P = 0,1956$] e, não havendo evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 26) = 0,0$; $P > 0,9999$].

Em relação à frequência de entradas na periferia da arena, ilustrada pela figura 32-B, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 26) = 4,723$; $P = 0,0391$], não havendo diferença entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 26) = 3,023$; $P = 0,0939$], sendo observado evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 26) = 4,723$; $P = 0,0391$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,05$ *).

Em relação ao tempo de permanência no centro da arena, ilustrada pela figura 32-C, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 26) = 0,004$; $P = 0,9473$], não havendo diferenças entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 26) = 1,608$; $P = 0,2160$], não havendo também evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 26) = 0,004$; $P = 0,9473$].

Em relação à frequência de entradas no centro da arena, ilustrada pela figura 32-D, a ANOVA de duas vias revelou diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 26) = 5,585$; $P = 0,0259$], não havendo diferença entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 26) = 3,739$; $P = 0,0641$], sendo observado evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 26) = 5,585$; $P = 0,0259$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os comportamentos Não Depressivo Salina e Depressivo Salina ($P < 0,05$ *) e, Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P < 0,01$ **).

Figura 32 - Campo Aberto: tempo de permanência na periferia (32-A), frequência de entradas na periferia (32-B), tempo de permanência no centro (32-C) e frequência de entradas no centro da arena (32-D) dos camundongos machos da GF3 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda e desafiados com 100µg/kg de LPS e, cuja GP fora exposta a 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p. no 15º dia de prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste post hoc de Tukey; n=7 para Não Depressivo Salina, n=6 para não Depressivo LPS, n=7 para Depressivo Salina e n=10 para Depressivo LPS; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A tabela 5 descreve e a fig. 33 ilustra os resultados de distância percorrida (33-A), velocidade média (33-B), tempo de imobilidade (33-C) e frequência de imobilidade (33-D) no teste de campo aberto de camundongos fêmeas da GF3 desafiadas com LPS, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º dia de sua prenhez. Nota-se aqui que, diferentemente dos camundongos machos da GF3, não foi possível a obtenção de um número de animais adequados para realização da análise estatística do grupo Não depressivo LPS. Nesse sentido, os dados descritos a seguir referem-se somente as fêmeas dos grupos Depressivo Salina e Depressivo LPS.

Em relação à locomoção, descrita pela tabela 5 e ilustrada pela figura 33-A, foi possível observar pelo teste t de Student que o grupo Depressivo LPS apresentou uma locomoção reduzida em comparação ao grupo Depressivo Salina ($P = 0,0040^{**}$).

Em relação à velocidade média, descrita pela tabela 5 e ilustrada pela figura 33-B, foi possível observar pelo teste t de Student que o grupo Depressivo LPS apresentou uma locomoção reduzida em comparação ao grupo Depressivo Salina ($P = 0,0034^{**}$).

Em relação ao tempo de imobilidade, descrita pela tabela 5 e ilustrada pela figura 33-C, o teste t de Student não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P = 0,2274$).

Em relação ao frequência de imobilidade, descrita pela tabela 5 e ilustrada pela figura 33-D, o teste t de Student não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P = 0,4414$).

Figura 33 - Campo Aberto: distância percorrida (33-A), velocidade média (33-B), tempo de imobilidade (33-C) e frequência de imobilidade (33-D) dos camundongos fêmeas da GF3 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda e desafiados com 100µg/kg de LPS e, cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., Test t de Student; n = 10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

A tabela 5 descreve e a fig. 34 continua a ilustrar os demais parâmetros observados no teste de campo aberto, sendo eles o tempo de permanência na periferia (34-A), frequência de entradas na periferia (34-B), tempo de permanência no centro (34-C) e frequência de entradas no centro da arena (34-D) de camundongos fêmeas da GF3 desafiadas com LPS, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º dia de sua prenhez.

Em relação ao tempo passado na periferia da arena, descrito pela tabela 5 e ilustrada pela figura 34-A, o teste t de *Student* não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P = 0,7249$).

Em relação ao número de entradas na periferia da arena, descrita pela tabela 5 e ilustrada pela figura 34-B, foi possível observar pelo teste t de *Student* que o grupo

Depressivo LPS apresentou uma locomoção reduzida em comparação ao grupo Depressivo Salina ($P = 0,0235 *$).

Em relação ao tempo passado no centro da arena, descrita pela tabela 5 e ilustrada pela figura 34-C, o teste t de *Student* não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos Depressivo Salina e Depressivo LPS ($P = 0,5159$).

Em relação ao número entradas no centro da arena, descrita pela tabela 5 e ilustrada pela figura 34-D, foi possível observar pelo teste t de *Student* que o grupo Depressivo LPS apresentou uma locomoção reduzida em comparação ao grupo Depressivo Salina ($P = 0,0243 *$).

Figura 34 - Campo Aberto: tempo de permanência na periferia (34-A), frequência de entradas na periferia (34-B), tempo de permanência no centro (34-C) e frequência de entradas no centro da arena (34-D) no teste de campo aberto das camundongos fêmeas da GF3 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda e desafiados com 100µg/kg de LPS e, cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M.; Teste t de *Student*; n = 10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

Tabela 5 - Distância percorrida, velocidade média, tempo de imobilidade, frequência de imobilidade, tempo de permanência na periferia, frequência de entradas na periferia, tempo de permanência no centro e frequência de entradas no centro da arena no teste de campo aberto dos camundongos fêmeas da GF3 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda e desafiados com 100µg/kg de LPS e, cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de prenhez. Os resultados expressam à média $\pm$ S.E.M., Teste t de Student; n = 10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

Parâmetros	Grupos	
	Depressivo Salina	Depressivo LPS
Distância Percorrida	2673 $\pm$ 231.9	1806 $\pm$ 123,3 **
Velocidade Média	9,053 $\pm$ 0,7829	6,070 $\pm$ 0,4147 **
Tempo de Imobilidade	289,4 $\pm$ 5,314	296,1 $\pm$ 0,9364
Frequência de Imobilidade	62 $\pm$ 52,70	19,50 $\pm$ 11,76
Tempo na Periferia	260,3 $\pm$ 3,021	257,7 $\pm$ 6,614
Frequência na Periferia	30,7 $\pm$ 2,836	22,10 $\pm$ 2,008 *
Tempo no Centro	34,95 $\pm$ 2,973	39,83 $\pm$ 6,744
Frequência no Centro	29,90 $\pm$ 2,822	21,30 $\pm$ 2,066 *

4.6 EXPERIMENTO 6 - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IL-1 α DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS DA GF3 DESAFIADOS COM LPS NO TESTE DE CAMPO ABERTO.

A fig. 35 ilustra os resultados da expressão de IL-1 α de camundongos machos e fêmeas da GF3 desafiados com 100 µg/Kg de LPS e avaliados nos teste de campo aberto, cujas fêmeas da GP receberam 100 µg/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º dia de sua prenhez.

Em relação à expressão de IL-1 α de camundongos machos da GF3, ilustrada pela fig. 35-A, a ANOVA de duas vias não revelou diferença estatisticamente significativa entre os comportamentos não depressivo e depressivo [$F(1, 24) = 4,019$; $P = 0,0564$], não havendo diferença entre o tratamento com solução salina e LPS [$F(1, 24) = 2,261$; $P = 0,1457$] e, não havendo evidências de efeito de interação entre estes dois fatores [$F(1, 24) = 1,005$; $P = 0,3262$].

Nota-se aqui que, diferentemente dos camundongos machos da GF3, não foi possível a obtenção de um número de animais adequados para se avaliar a expressão de citocina IL-1 α do grupo Não depressivo LPS. Nesse sentido, os dados descritos a seguir referem-se somente as fêmeas dos grupos Depressivo Salina e Depressivo LPS.

Em relação à expressão de IL-1 α de camundongos fêmeas da GF3, descrita pela tabela 6 e ilustrada pela fig. 35-B, observou-se que o grupo Depressivo LPS apresentou uma expressão de citocina IL-1 α significativamente maior que a do grupo Depressivo Salina ($P = 0,0125$ *).

Tabela 6 – expressão de IL-1 α de camundongos fêmeas da GF3 selecionadas pelo teste de suspensão da cauda e desafiadas com 100 μ g/kg de LPS no teste de campo aberto e, cuja GP fora exposta ou não ao LPS via i.p. no 15º dia de prenhez. Os resultados expressam à média $\pm$ S.E.M., *Test t de Student*; n = 10 para todos os grupos; considera-se significância quando $P < 0,05$.

Parâmetros	Grupos	
	Depressivo Salina	Depressivo LPS
Interleucina IL- 1 α	6,480 $\pm$ 1,629	28,10 $\pm$ 7,177 *

Figura 35 - Expressão de IL-1 α de camundongos machos (Fig. 35-A) e fêmeas (Fig. 35-B) da GF3 selecionados pelo teste de suspensão da cauda, desafiados com 100 μ g/Kg de LPS e avaliados nos teste de campo aberto, cujas fêmeas da GP receberam 100 μ g/Kg de LPS ou solução salina via i.p no 15º dia de sua prenhez. Os resultados expressam a média $\pm$ S.E.M., ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey; Machos: n=7 para Não Depressivo Salina, n=6 para não Depressivo LPS, n=7 para Depressivo Salina e n=10 para Depressivo LPS; Fêmeas: n=5 para Não Depressivo Salina, n=2 para não Depressivo LPS, n=10 para Depressivo Salina e n=10 para Depressivo LPS; considera-se significância quando $P < 0,05$.

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1 DISCUSSÃO 1 - COMPARAÇÃO DOS MODELOS DE DEPRESSÃO E AS DIFERENÇAS NA EXPRESSÃO TRANSGERACIONAL DO COMPORTAMENTO DEPRESSIVO E COMPORTAMENTO MATERNO

Os procedimentos conhecidos como desespero comportamental, tal como o teste de natação forçada e o teste de suspensão da cauda, foram amplamente utilizados nos últimos 30 anos em pesquisas básicas e na indústria farmacêutica para *screening* de medicamentos antidepressivos. Em ambos os testes, o comportamento dos animais pode ser alterado através de diversos tipos de antidepressivos (PORSOLT et al., 2001).

O primeiro experimento desse trabalho teve como objetivo avaliar e comparar o comportamento de camundongos sem qualquer tipo de tratamento em ambos os testes, visando à aplicação da metodologia mais adequada nos testes subsequentes. Ambos os testes avaliam o tempo de imobilidade, sendo esse parâmetro um indicador de que o animal aprendeu que a possibilidade de escapar da situação aversiva é inexistente. Em outras palavras, são metodologias que mimetizam o desamparo aprendido (CASTAGNE et al., 2011).

Assim, verificou-se que os camundongos *Swiss* avaliados em ambos os testes apresentaram tempos de imobilidade semelhantes (TSC 63.01 ± 4.772 ; TNF 69.46 ± 9.979), dado contrário ao descrito por Bai et al. (2001), no qual camundongos *Swiss-Nih* apresentam sete vezes menos imobilidade no TSC em relação ao TNF, diferença não observada em camundongos C57/BL6. Dessa forma, variáveis como fornecedor do animal, ambiente de alojamento, condições do experimento e, bem como, o próprio experimentador, podem afetar a comparação dos dados aqui descritos com os de outros laboratórios.

Uma das diferenças marcantes no uso de camundongos é a diferença entre linhagens, como por exemplo, camundongos *Swiss* e C57/BL6, contudo, a diferença entre uma mesma linhagem também pode ser observada na literatura, demonstrando diferenças de resultados entre laboratórios, como no caso de Porsolt, Berti e Jalfre (1978), que constataram que camundongos *Swiss-NMRI* apresentavam 40% de imobilidade no TSC durante o período de experimentação, diferentemente de Van Der Heyden, Molewijk e Oliver (1987), que constaram que os mesmos animais apresentavam 22% de imobilidade durante o período de experimentação. A diferença entre camundongos de uma mesma linhagem, contudo, ainda é pouco relatada na literatura, diferentemente da diferenciação entre as linhagens (BAI et al., 2001).

No caso do presente trabalho, o TSC demonstrou-se mais sensível em distinguir entre o que foi classificado como comportamento depressivo e não depressivo, ou seja alta e baixa imobilidade. Nota-se que em ambos os testes, o comportamento de alta imobilidade foi presente, contudo, o oposto foi observado em menor frequência no TNF em relação ao TSC. De acordo com Porsolt et al. (2001), camundongos apresentam maior variabilidade comportamental do que ratos, sendo muitas vezes necessário a utilização de um maior número de animais para se definir grupos experimentais.

Dado que esse experimento também buscava distinguir na população de camundongos tanto o comportamento depressivo como o não depressivo, o TSC se revelou inicialmente mais apropriado. Dessa forma, foi escolhido para realizar a seleção comportamental ao longo das gerações aqui estudadas.

Ainda, de acordo com Ohnidhi et al. (2010), foi observado em experimentos em camundongos que o TNF contribui com a ativação de receptores da família kinase e, que por sua vez, induzem a fosforilação de proteínas regulatórias proeminentes no hipocampo, córtex e amígdala. Estas regiões estão relacionadas com a expressão do comportamento depressivo. De acordo com o autor, seus experimentos ressaltaram a importância dessas famílias de proteínas na expressão dos comportamentos aqui discutidos, contudo, por outro lado, não estabelecem qual é a influência direta do estresse da natação forçada sobre o próprio comportamento estudado. Uma vez que as alterações encontradas não foram observadas em outros procedimentos, como a exposição à baixa temperatura e o TSC, é possível que o estresse do TNF possa, por si só, induzir o comportamento depressivo.

Finalmente, embora ambos os testes tenham apresentado resultados comportamentais semelhantes no comportamento depressivo, eles diferem quanto a sua aplicação, tendo o TSC diversas vantagens sobre o TNF, como o fato de não existir a possibilidade de hipotermia, não existir a necessidade de um tratamento pós-teste (ex.: no TNF o animal deve ser seco antes de retornar a caixa moradia), além de ser um procedimento mais simples e de fácil reprodutibilidade (PORSOLT, 2000; LIU, X. et al., 2007; CASTAGNE et al., 2011).

A partir da escolha do TSC, foi realizada uma seleção do comportamento em três gerações de camundongos após os mesmos completarem 60 dias de vida. Nesse sentido, o TSC revelou que a variabilidade comportamental selecionada presente na população de camundongos, no caso os fenótipos depressivo e não depressivo, foram transmitidos ao longo das três gerações filiais avaliadas, tanto para os machos (não depressivos 74%; depressivos 82%) quanto para as fêmeas (não depressivas 71%; depressivas 72%) não havendo diferenças quanto ao tratamento pré-natal com LPS ou solução salina na geração parental.

Já foi observado que anormalidades no comportamento tais como o comportamento depressivo e ansioso podem ser transmitidos a futuras gerações, de fato, embora diversas desordens como depressão, estresse pós traumático e outros transtornos ansiosos sejam em partes, hereditários, a maioria dos fatores de riscos que assim influenciam o organismo demonstram ser não genéticos (VIALOU et al., 2013).

De acordo com Dietz et al. (2011), camundongos avaliados em testes de interação social e, cujos pais passaram pelo estresse da derrota social apresentam menor interação nesse modelo. Ainda, foi observado por Walker et al. (2012), que a prole de ratas expostas ao LPS em períodos precoces do desenvolvimento apresentam alterações voltadas a ansiedade na vida adulta, sendo essa características transmitidas a prole. Nesse sentido, é sugerido que a exposição à patógenos em uma geração pode contribuir para maior susceptibilidade de psicopatologias em gerações filiais futuras.

Diferentemente dos artigos citados, os animais aqui avaliados não foram submetidos a sessões de estresse, mas sim, a uma seleção do comportamento, tendo o TSC sido usado para a distinção entre dois tipos de fenótipos aqui entendidos como depressivo e não depressivo, revelando uma possível influencia genética e epigenética na transmissão do comportamento.

Como destacado por Walker et al. (2012), um dos principais mediadores para essa transmissão está relacionado ao cuidado materno. No caso, o autor verificou que a exposição neonatal ao LPS aumentou o comportamento ansioso desses roedores na vida adulta, assim como prejudicou o cuidado materno dado a próxima geração. Esses dados apontam para uma possível transmissão epigenética do comportamento, sendo ele mediado pelo comportamento materno. Nesse sentido, as alterações observadas no cuidado maternal nesse trabalho poderiam ter influenciado na transmissão desses fenótipos.

Ainda, o comportamento materno é a expressão da interação entre diversos fatores maternos sendo relatado como fundamental para o desenvolvimento e sobrevivência do filhote. Nesse sentido, alterações em períodos precoces do desenvolvimento bem como no período gestacional podem modificar o comportamento maternal, refletindo no desenvolvimento comportamental, sexual e neurológico dos filhotes (ALBERT; WALSH, 1995).

Os resultados do comportamento materno aqui apresentados apontam diferenças significantes quanto ao recolhimento dos filhotes na GF1, o que pode demonstrar uma mudança no estado motivacional desses animais, contudo, não foram observadas demais diferenças nas outras gerações, podendo essas mudanças não serem significantes. Em relação a frequência de *hoovering*, foram observadas diferenças no tratamento na GF1, no qual os animais tratados com LPS apresentaram menos frequência que os que receberam salina. Não foram observadas diferenças nas demais gerações. Quanto ao tempo total de

hoovering, foram observadas diferenças somente na GP, no qual os animais não depressivos que receberam LPS possuíam maiores tempos dedicados aos seus filhotes do que os animais que receberam salina. Dados similares já foram observados por Penteado et al. (2013 *in press*), no qual a administração pré-natal de LPS aumentou comportamento maternal de ratas, mas ao mesmo tempo diminuiu a preferência olfatória dessas mães e induziu a hiporresponsividade endotoxina

Em relação ao comportamento maternal total desses roedores, também foi observado um aumento desse parâmetro nos animais do grupo não depressivo da GP que recebera LPS, similar aos resultados encontrados no *hoovering*. Embora não significante, os animais depressivos que receberam o LPS apresentam o mesmo padrão comportamental que os não depressivos que também receberam a endotoxina. Esse padrão comportamental também foi observado na GF1, embora também sem significância.

Em um estudo longitudinal de 20 anos, Weissman et al. (2005), acompanhou três gerações de pacientes com e sem histórico de depressão, constatando que crianças cujos pais e avós apresentaram depressão em algum momento de suas vidas, tinham duas vezes mais chance de apresentar transtornos de humor quando comparados a famílias sem histórico de depressão.

Contudo, dado que a história de vida dos indivíduos pode influenciar seu respectivo comportamento, é difícil determinar se o aumento de chance de transtornos depressivos é um fator influenciado genética ou epigeneticamente. Nesse sentido, os dados aqui mostrados, apontam que há um envolvimento de ambos os mecanismos na transmissão do comportamento, no entanto, a forma como cada um desses mecanismos está envolvido na transmissão desse comportamento ainda é incerto.

5.2 DISCUSSÃO 2 - DIFERENÇAS TRANSGERACIONAIS NA EXPRESSÃO DO COMPORTAMENTO NA AVALIAÇÃO EM CAMPO ABERTO DA GF1 E GF2

Em relação aos parâmetros avaliados no teste de campo aberto, foi possível observar que os camundongos machos depressivos da GF1 e GF2 não apresentaram diferenças quanto ao tratamento na distancia percorrida e na velocidade. Contudo, notou-se que a GF1 depressiva tratada com LPS mostrou maior frequência de imobilidade que seu respectivo grupo controle, porém sem modificações quanto ao tempo nesse parâmetro. Por outro lado, os camundongos da GF2 grupo LPS tiveram menor imobilidade, mas maior frequência neste parâmetro. Além disso, o tempo e frequência na periferia de ambos os grupos da GF1 não diferiram, embora a GF2 oriundas do grupo LPS tenham ficado mais tempo na periferia que seu respectivo grupo controle.

Dessa forma, é possível descartar que a exposição transgeracional ao LPS tenha promovido prejuízo motor nesses animais, uma vez que não foram observadas diferenças quanto a distância percorrida e velocidade da GF1 e GF2. Todavia, os camundongos da GF2 do grupo LPS apresentaram menor imobilidade no teste do campo aberto. Por ser um ambiente novo, a primeira exposição a esse teste pode levar a aumento de emocionalidade, no qual o impulso de explorar a arena e o medo de ser predado competem entre si, induzindo o animal a explorar menos o centro da arena e permanecer mais tempo na periferia.

O termo emocionalidade pode ser definido como um estado emocional composto por diferentes reações orgânicas que denotam uma condição de excitação no animal (HALL, 1992). Posteriormente, esse termo foi redefinido como um conjunto de componentes afetivos não específicos do comportamento por (WALSH; CUMMINS, 1976)

Seria possível pensar em um aumento da emocionalidade da GF2 do grupo LPS, que embora tenha ficado mais tempo na periferia da arena, apresentaram aumento na frequência de paradas. Nesse sentido, embora o comportamento de tigmotaxia seja considerado normal entre roedores, poder-se-ia assim aventar que o LPS tenha promovido uma maior expressão de componentes afetivos nesses animais.

Como descrito anteriormente o comportamento materno é de suma importância no desenvolvimento dos filhotes. Dessa forma, algumas alterações encontradas nesse parâmetro em relação ao cuidado da GF1 do grupo LPS para com a GF2 do grupo LPS, podem ter contribuído para com a alteração observada na atividade geral em campo aberto. Dado que *hovering* da GF1 estava menor que seu respectivo grupo controle.

Ainda, não se devem descartar os efeitos do estresse pré-natal da geração ancestral. De acordo com Nestler (2012) mecanismos epigenéticos possam ser responsáveis por um aumento na expressão de diversos parâmetros comportamentais, uma vez que um estresse pode afetar a expressão gênica em partes do cérebro de forma que existam mudanças tanto adaptativas quanto danosas ao organismo. Assim, o LPS pode ter ativado o eixo HPA estimulando a produção de citocinas afetando diretamente as mães da GP e, indiretamente, a GF1 intra útero. Nesse sentido, essas alterações poderiam ser transmitidas a GF2 causando maior susceptibilidade à novidade do campo aberto.

Quanto às análises transgeracionais entre os animais depressivos da GF1 e GF2 do grupo LPS, foi observado que a GF1 apresentou maior tempo de imobilidade que aqueles do grupo LPS da GF2, não sendo observadas alterações nos demais parâmetros do campo aberto. O aumento da imobilidade no grupo LPS da GF1 pode estar relacionado ao aumento do parâmetro de emocionalidade deste grupo em relação ao seu controle, muito embora não tenha sido observado esse aumento na análise intra grupo da GF1.

É importante ressaltar nessa discussão que as condições da sala de observação diferem daquelas inicialmente propostas para o estudo da emocionalidade em campo aberto. De fato, Hall (1992) observou esse parâmetro em campo aberto sob luz forte e com presença de ruídos emitidos por uma campainha de 80 dc. Nossas condições foram de baixa luminosidade e sem interferência de ruídos externos. Essas condições levariam a maior expressão de comportamentos exploratórios e pouca expressão de comportamentos ligados a emocionalidade. No entanto, observou-se que os camundongos depressivos da GF1 apresentaram resposta compatíveis com componentes afetivos não específicos, ou seja maior imobilidade, sem alterações nos comportamentos exploratórios (distância percorrida e velocidade).

Em relação à atividade geral no campo aberto de camundongos não depressivos da GF1 e GF2, nenhum parâmetro foi modificado quanto a análise intra grupo dos animais do grupo LPS comparados aos seus respectivos grupos controle. No entanto, a comparação transgeracional dos grupos LPS evidenciou aumento da distância percorrida e da velocidade dos camundongos da GF2 em relação àqueles da GF1. Paralelamente, também se observou redução no tempo de imobilidade acompanhada de maior frequência e tempo de permanência no centro da arena.

Estes apontam aumento de comportamento exploratório destes animais no aparato. Note-se que esta seria a primeira exposição dos camundongos da GF2 ao campo aberto, momento no qual há um conflito entre o impulso em explorar o ambiente novo e o medo de ser predado. No caso dos camundongos não deprimidos do grupo LPS da GF2, verificou-se o contrario: estes camundongos exploraram mais a arena, dado que se locomoveram mais e, em áreas nas quais o medo de serem predados é mais presente. A análise dos camundongos não depressivos do grupo salina da GF1 e GF2 mostra também aumento na atividade exploratória dos animais, contudo, esse parâmetro está atenuado se comparado com o grupo LPS.

Nesse sentido, seria possível propor que a exposição transgeracional ao LPS provocou menor adaptação da GF2 ao estímulo de medo no campo aberto, induzindo uma redução de parâmetros comportamentais ligados à emocionalidade. Poder-se-ia dizer assim que, os fenótipos depressivos e não depressivos são fatores determinantes na resposta ao LPS em camundongos machos de diferentes gerações na atividade geral em campo aberto.

Ainda, vale a pena discutir o valor adaptativo etológico desta resposta em animais não depressivos. Nesse caso, esses animais estariam explorando mais o ambiente e, assim, teriam maior possibilidade de conseguir alimento e fêmeas para deixar descendentes. Deve-se levar então em conta que os fenótipos aqui selecionados podem ocorrer no ambiente natural, no qual as contingências ambientais, diferentemente do modelo experimental, teriam um papel mais presente na seleção desses fatores.

De forma similar, as fêmeas da GF1 e GF2 do grupo LPS e salina avaliadas no teste de campo aberto também não apresentaram diferenças quanto a distância percorrida e a velocidade na análise intrageracional, entretanto, de forma oposta aos machos, não foram encontradas diferenças significantes nos tempos de imobilidade das fêmeas do grupo LPS, tanto na GF1 quanto na GF2. Observou-se por outro lado um aumento na frequência de entradas na zona periférica, bem como aumento no tempo de permanência e frequência de entrada no centro da arena na GF1 do grupo LPS, não havendo diferenças nas fêmeas da GF2.

Assim, como observado nos machos, é possível descartar que a exposição do LPS na geração parental tenha promovido prejuízo motor nesses animais, contudo, nota-se que o grupo LPS da GF1, diferentemente dos machos da mesma geração que apresentaram uma maior expressão de comportamentos afetivos não específicos, as fêmeas apresentaram uma diminuição da emocionalidade, dado refletido pela exploração da periferia e centro da arena como a maior permanência no centro. Ou seja, esses animais experimentaram de forma atenuada os comportamentos referentes ao impulso de explorar o ambiente novo e o medo de se expor a ele.

Dado que essas alterações não estão presentes na GF2, é possível pensar que as alterações provenientes da exposição pré-natal ao LPS sejam transmitidas as linhas filiais de acordo com o sexo e, ainda, se expressando diferentemente neles. Segundo os resultados de Dietz et al. (2011), camundongos C57BL/6 submetidos ao estresse da derrota social apresentam maior comportamentos tipo ansiosos e depressivos, transmitindo essa característica a seus filhos. Contudo, seus resultados apontam que esses fenótipos, embora transmitidos, são mais presentes nos machos do que nas fêmeas.

Partindo para a análise transgeracional entre as fêmeas, não foram encontradas alterações nas fêmeas com comportamento depressivos do grupo LPS. Assim, em relação a endotoxina, foram observadas diferenças somente na GF2, que apresentou menor frequência de imobilidade e permaneceu mais tempo no centro da arena em relação a GF1.

Outras diferenças foram observadas entre as gerações, contudo, somente entre os animais que receberam solução salina. Assim, tanto as fêmeas depressivas e não depressivas da GF2 apresentaram maiores parâmetros de distância e velocidade que a GF1. Nesse sentido, é possível pensar que as fêmeas tenderiam a apresentar maior adaptação de seu comportamento ao longo das gerações do que os machos uma vez que, não foi encontrado esse padrão nos animais que receberam o LPS, dessa forma, a endotoxina estaria contribuindo para a diminuição dessa expressão comportamental. Ou seja, esses dados corroboram com Dietz et al. (2011), que demonstraram que a expressão transgeracional do comportamento é menos expresso nas fêmeas.

De acordo com Tsai, Grant e Rissman (2009), ratos machos e fêmeas possuem diferentes padrões temporais e espaciais de metilação e acetilação de histonas no córtex e no hipocampo no período embrionário e no nascimento. Além disso, quando há efeitos combinados da atuação de hormônios e modificações das histonas, há uma maior regulação do desenvolvimento de regiões do cérebro que podem estar associadas com processamento cognitivos como emocionais.

Nossos resultados apontam que o ambiente microbial afetaria de forma diferente machos e fêmeas. Assim, em relação às fêmeas, adaptações de seu comportamento ao longo das gerações teriam sido mais atenuadas do que os machos em virtude da exposição pré-natal a endotoxina.

5.3 DISCUSSÃO 3 - DESAFIO COM LPS E A EXPRESSÃO DO COMPORTAMENTO E SISTEMA IMUNE DA GF3

O desafio com LPS na GF3 promoveu diferentes respostas no comportamento de camundongos depressivos quanto não depressivos. Notou-se que os camundongos depressivos do grupo LPS apresentaram maior comportamento doentio quando comparados aos animais depressivos do grupo salina. Essa maior expressão de comportamento doentio pode ser observada pela menor distância percorrida no campo aberto, bem como pela menor velocidade. Ainda, foi observado nos animais depressivos do grupo LPS maior imobilidade durante o teste, que por sua vez levou à menor frequência na mesma. Quanto às áreas visitadas na arena do aparato, notou-se que este mesmo grupo entrou menos na periferia e centro da arena, possivelmente em consequência de menor atividade no aparelho. Não foram observadas diferenças quanto ao tempo permanecido nas referidas áreas. Note-se, contudo, que o desafio com LPS não foi capaz de alterar a atividade geral no campo aberto dos camundongos dos grupos não depressivos.

De acordo com Besedovsky e Del Rey (1996), citocinas cerebrais produzem alterações em diversos sistemas de neurotransmissores, neuroendócrinos e comportamentais. Nesse sentido, é possível que o desafio com LPS tenha promovido o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias no cérebro desses animais, levando às alterações comportamentais observadas.

Sabe-se que há relação de comportamentos associados a alterações do humor que envolvem tanto o aumento de citocinas pró-inflamatórias quanto a diminuição de citocinas anti-inflamatórias e, ambos os processos já foram observados em pacientes depressivos. (LEONARD; MYINT, 2009).

Os resultados também indicam que a exposição ao LPS na GP foi um dos fatores que levaram a diferentes respostas na atividade geral frente ao desafio com a endotoxina na GF3. Como observado, animais não depressivos não apresentam repostas diferentes entre si, porém, os não depressivos do grupo salina possuem maior comportamento doentio que os animais depressivos da GF3, cuja geração ancestral também foi tratada com salina. Verificou-se ainda, que os camundongos cuja geração ancestral foi tratada com LPS respondem mais a endotoxina que camundongos depressivos de ancestrais tratados com salina.

Portanto, pode-se concluir que a exposição ancestral ao LPS promove aumento de sensibilidade ao LPS em animais depressivos, ou seja, maior comportamento doentio e, em níveis semelhantes àqueles não depressivos. Este dado sugere que a exposição ancestral durante a gestação a endotoxina promove maior atividade do sistema imune em animais depressivos em relação àqueles não expostos de mesmo comportamento. Portanto, a exposição a patógenos pode atuar de forma diferencial de acordo com o comportamento do animal, sendo esse, no caso aqui discutido, o comportamento depressivo e não depressivo.

Quanto a análise dos níveis de IL-1 α no soro dos camundongos machos desafiados, não foram encontradas diferenças entre os grupos e entre os comportamentos. Contudo, esses dados, parecem conflitantes, uma vez que o esperado seria que os camundongos da GF3 cujos ancestrais tivessem recebido salina, apresentassem menores níveis de citocinas. No entanto, é importante lembrar que o comportamento doentio é uma estratégia comportamental que se desenvolve no SNC e implica em modificações de neurotransmissores e neuromoduladores no cérebro. De acordo com Hart (1988), a regulação de algumas respostas agudas no SNC, tal como a indução da febre e comportamentos depressivos, poderiam ser modulados por mecanismos neuronais que expressam IL-1. Dessa forma, estudos futuros são necessários para a compreensão deste achado, uma vez que, é possível que a resposta às citocinas no SNC seja diferente daquelas da periferia.

Em relação às fêmeas da GF3 desafiadas com LPS, como já descrito anteriormente, não houve possibilidade de análise dos grupos não depressivos devido ao fato do número reduzido de animais nesse respectivo grupo. Desta forma, são discutidos aqui somente os dados referentes às fêmeas de comportamento depressivo desafiadas com a endotoxina.

Inicialmente, verificou-se que as fêmeas do grupo LPS apresentaram maior comportamento doentio ao desafio que aquelas do grupo salina, ou seja, menor locomoção e menor velocidade. Esse comportamento, de forma semelhante aos machos, levou a menores entradas na zona periférica e central da arena do campo aberto. Ainda, de forma consistente com esses resultados, estas fêmeas apresentam maiores níveis de IL-1 α no soro que seu respectivo grupo controle. Assim, seria possível sugerir que em fêmeas com

comportamento depressivo cuja geração ancestral fora exposta ao LPS apresentam maiores repostas do SNC e do sistema imune periférico às ações do LPS. Ainda, sabe-se que a resposta imune em fêmeas também pode ter relação com os níveis de estrógeno. Os efeitos do estrógeno sobre a inflamação ainda poderão depender não somente da inflamação em questão, mas também das regiões envolvidas (MARTIN-MILLAN; CASTANEDA, 2013).

As diferenças observadas na resposta de camundongos machos e fêmeas na GF3, bem como as alterações observadas entre a GF1 e GF2 podem estar relacionadas com alterações epigenéticas atuando de forma a diferenciar a resposta comportamental entre os sexos a um mesmo estímulo do ambiente. Sabe-se hoje que alterações epigenéticas ocorrem de diferentes maneiras, tais como metilações do DNA e modificações de histonas e, por sua vez podem levar a diferenciações sexuais no desenvolvimento de diversas estruturas cerebrais ao longo do desenvolvimento do organismo (LENZ; NUGENT; MCCARTHY, 2012), além de diferenciações de gênero frente a resposta ao ambiente, nesse caso, o estresse (MORGAN; BALE, 2011).

Ainda, as alterações podem ser diferentes dependendo do estágio de desenvolvimento no qual o organismo se encontra, levando, por exemplo, a alterações temporárias no comportamento, bem como alterações que perdurem por toda a vida do organismo. Assim, as modificações epigenéticas permitem que tanto as influências pré e pós-natais influenciem o desenvolvimento do organismo (HODES, 2013), como observado no presente trabalho.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Foi possível concluir com o presente estudo que o fenótipo Depressivo e não Depressivo selecionado pelo TSC em camundongos tratados ou não com o LPS, foi transmitido às gerações filiais futuras e, essa transmissão pode ter influência de fatores epigenéticos, como relatado anteriormente da possível influência da interação materno-filhote, bem como influência de fatores genéticos na expressão do comportamento.

Além disso, nossas observações possibilitaram concluir que os fenótipos depressivos e não depressivos podem ser fatores determinantes na resposta dos camundongos a exposição à endotoxina, dado as diferenças encontradas na atividade geral e comportamento doentio dos camundongos machos da GF1 e GF2. Ainda, a expressão de diferenças transgeracionais seria diferente entre machos e fêmeas. Nesse sentido, fêmeas apresentariam maior adaptação de seu comportamento ao longo das gerações devido a exposição pré-natal a endotoxina.

Esse fato foi expresso de forma clara após o desafio com LPS na GF3, no qual, embora o comportamento doentio nos machos tenha sido mais expressivo, não houve diferenças quanto ao nível de citocinas e, tendo o oposto ocorrido nas fêmeas, na qual a expressão do comportamento doentio foi diferente dos machos e os níveis de IL-1 α foram significativamente maiores nas fêmeas depressivas em relação as não depressivas.

Referências

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADER, R. On the development of psychoneuroimmunology. **Eur J Pharmacol**, v. 405, n. 1-3, p. 167-176, 2000.
- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.
- ALBERT, D. J.; WALSH, M. L. Aggression in the lactating female rat: the normal decline is not dependent on the physical development of the pups. **Physiol Behav**, v. 58, n. 3, p. 477-481, 1995.
- ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. [Neuroimmunomodulation: the cross-talk between nervous and immune systems]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 29, n. 4, p. 363-369, 2007.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV**. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994. xxvii, 886 p. p.
- ANWAY, M. D.; CUPP, A. S.; UZUMCU, M.; SKINNER, M. K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. **Science**, v. 308, n. 5727, p. 1466-1469, 2005.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.
- 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. **Mol Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 47-55, 2006.
- AUBERT, A.; GOODALL, G.; DANTZER, R.; GHEUSI, G. Differential effects of lipopolysaccharide on pup retrieving and nest building in lactating mice. **Brain Behav Immun**, v. 11, n. 2, p. 107-118, 1997.
- AVITSUR, R.; POLLAK, Y.; YIRMIYA, R. Different receptor mechanisms mediate the effects of endotoxin and interleukin-1 on female sexual behavior. **Brain Res**, v. 773, n. 1-2, p. 149-161, 1997.
- AVITSUR, R.; YIRMIYA, R. The immunobiology of sexual behavior: gender differences in the suppression of sexual activity during illness. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 64, n. 4, p. 787-796, 1999.
- BAHLS, S.-C. Depressão: uma breve revisão dos fundamentos biológicos e cognitivos. **Interação em Psicologia**, v. 3, n., p. 11, 1999.
- BAI, F.; LI, X.; CLAY, M.; LINDSTROM, T.; SKOLNICK, P. Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair". **Pharmacol Biochem Behav**, v. 70, n. 2-3, p. 187-192, 2001.
- BESEDOVSKY, H. O.; DELREY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: Facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 1, p. 64-102, 1996.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. The cytokine-HPA axis feed-back circuit. **Zeitschrift Fur Rheumatologie**, v. 59, n., p. 26-30, 2000.

BIRDI, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, v. 16, n. 1, p. 15, 2002.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A Estrutura celular. In: Jawetz, M. A. (Ed.). **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. v.21,

CASTAGNE, V.; MOSER, P.; ROUX, S.; PORSOLT, R. D. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Curr Protoc Neurosci**, v. Chapter 8, n., p. Unit 8 10A, 2011.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885-891, 2002.

COHN, D. W.; DE SA-ROCHA, L. C. Differential effects of lipopolysaccharide in the social behavior of dominant and submissive mice. **Physiol Behav**, v. 87, n. 5, p. 932-937, 2006.

CURLEY, J. P.; MASHOODH, R.; CHAMPAGNE, F. A. Epigenetics and the origins of paternal effects. **Horm Behav**, v. 59, n. 3, p. 306-314, 2011.

DANTZER, R.; BLUTHE, R. M.; LAYE, S.; BRET-DIBAT, J. L.; PARNET, P.; KELLEY, K. W. Cytokines and sickness behavior. **Ann N Y Acad Sci**, v. 840, n., p. 586-590, 1998.

DIETZ, D. M.; LAPLANT, Q.; WATTS, E. L.; HODES, G. E.; RUSSO, S. J.; FENG, J.; OOSTING, R. S.; VIALOU, V.; NESTLER, E. J. Paternal transmission of stress-induced pathologies. **Biol Psychiatry**, v. 70, n. 5, p. 408-414, 2011.

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

FELICIO, L. F.; MANN, P. E.; BRIDGES, R. S. Intracerebroventricular cholecystokinin infusions block beta-endorphin-induced disruption of maternal behavior. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 39, n. 1, p. 201-204, 1991.

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

GARG, V. Insights into the genetic basis of congenital heart disease. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 10, p. 1141-1148, 2006.

GRAFF, J.; MANSUY, I. M. Epigenetic codes in cognition and behaviour. **Behav Brain Res**, v. 192, n. 1, p. 70-87, 2008.

HALL, B. K. **Evolutionary developmental biology**. London ; New York: Chapman & Hall, 1992. xii, 275 p. p.

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

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neurosci Biobehav Rev**, 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. **Dev Psychobiol**, v. 48, n. 2, p. 162-168, 2006.

HODES, G. E. Sex, stress, and epigenetics: regulation of behavior in animal models of mood disorders. **Biol Sex Differ**, v. 4, n. 1, p. 1, 2013.

IRWIN, M.; GILLIN, J. C. Impaired natural killer cell activity among depressed patients. **Psychiatry Res**, v. 20, n. 2, p. 181-182, 1987.

JOCA, S. R.; PADOVAN, C. M.; GUIMARAES, F. S. [Stress, depression and the hippocampus]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 25 Supl 2, n., p. 46-51, 2003.

KENT, S.; BLUTHE, R. M.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Sickness Behavior as a New Target for Drug Development. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, n. 1, p. 24-28, 1992.

KIRSTEN, T. B. **Mestre**. (Dissertação de Mestrado). Patologia Experimental e Comparada, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. 123 p.

KROLL, T. G. Molecular events in follicular thyroid tumors. **Cancer Treat Res**, v. 122, n., p. 85-105, 2004.

KRONFOL, Z.; SILVA, J., JR.; GREDEN, J.; DEMBINSKI, S.; GARDNER, R.; CARROLL, B. Impaired lymphocyte function in depressive illness. **Life Sci**, v. 33, n. 3, p. 241-247, 1983.

LAPIN, I. P.; OXENKRUG, G. F. Intensification of the Central Serotonergic Processes as a Possible Determinant Of the Thymoleptic Effect. **The Lancet**, v. 293, n. 7586, p. 5, 1969.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo, 2010. 848 p.

LENZ, K. M.; NUGENT, B. M.; MCCARTHY, M. M. Sexual differentiation of the rodent brain: dogma and beyond. **Front Neurosci**, v. 6, n., p. 26, 2012.

LEONARD, B. E.; MYINT, A. The psychoneuroimmunology of depression. **Hum Psychopharmacol**, v. 24, n. 3, p. 165-175, 2009.

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

LIU, X.; STANCLIFFE, D.; LEE, S.; MATHUR, S.; GERSHENFELD, H. K. Genetic dissection of the tail suspension test: a mouse model of stress vulnerability and antidepressant response. **Biol Psychiatry**, v. 62, n. 1, p. 81-91, 2007.

LIU, Y.; FREEDMAN, B. I. Genetics of progressive renal failure in diabetic kidney disease. **Kidney Int Suppl**, v., n. 99, p. S94-97, 2005.

MAES, M. Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 19, n. 1, p. 11-38, 1995.

MAES, M. Major depression and activation of the inflammatory response system. **Adv Exp Med Biol**, v. 461, n., p. 25-46, 1999.

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

MARQUES, A. H.; CIZZA, G.; STERNBERG, E. [Brain-immune interactions and implications in psychiatric disorders]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 29 Suppl 1, n., p. S27-32, 2007.

MARTIN-MILLAN, M.; CASTANEDA, S. Estrogens, osteoarthritis and inflammation. **Joint Bone Spine**, v., n., p., 2013.

MCKINNEY, W. T. Animal models of depression: an overview. **Psychiatr Dev**, v. 2, n. 2, p. 77-96, 1984.

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

MILLER, A. H.; PARIANTE, C. M.; PEARCE, B. D. Effects of cytokines on glucocorticoid receptor expression and function. Glucocorticoid resistance and relevance to depression. **Adv Exp Med Biol**, v. 461, n., p. 107-116, 1999.

MINS, C. A.; PLAYFAIR, J. H. L.; ROITT, I. M.; WAKELIN, R.; WILLIAMS, R. W. **Microbiologia Médica**. São Paulo: Editora Manole, 1999

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

MOORE, M. A. Converging pathways in leukemogenesis and stem cell self-renewal. **Exp Hematol**, v. 33, n. 7, p. 719-737, 2005.

MOREIRA, R. O.; AMANCIO, A. P.; BRUM, H. R.; VASCONCELOS, D. L.; NASCIMENTO, G. F. [Depressive symptoms and quality of life in type 2 diabetic patients with diabetic distal polyneuropathy]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, n. 9, p. 1103-1111, 2009.

MORGAN, C. P.; BALE, T. L. Early prenatal stress epigenetically programs dysmasculinization in second-generation offspring via the paternal lineage. **J Neurosci**, v. 31, n. 33, p. 11748-11755, 2011.

MOUSSAVI, S.; CHATTERJI, S.; VERDES, E.; TANDON, A.; PATEL, V.; USTUN, B. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. **Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 851-858, 2007.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v. 349, n. 9064, p. 1498-1504, 1997.

NESTLER, E. J. Epigenetics: Stress makes its molecular mark. **Nature**, v. 490, n. 7419, p. 171-172, 2012.

NUMAN, M. Maternal Behavior. In: Knobil, E. e Neill, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994,

NUNES, S. O.; REICHE, E. M.; MORIMOTO, H. K.; MATSUO, T.; ITANO, E. N.; XAVIER, E. C.; YAMASHITA, C. M.; VIEIRA, V. R.; MENOLI, A. V.; SILVA, S. S.; COSTA, F. B.; REICHE, F. V.; SILVA, F. L.; KAMINAMI, M. S. Immune and hormonal activity in adults suffering from depression. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 5, p. 581-587, 2002.

O'BRIEN, S. M.; SCOTT, L. V.; DINAN, T. G. Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment. **Hum Psychopharmacol**, v. 19, n. 6, p. 397-403, 2004.

OHNISHI, H.; MURATA, T.; KUSAKARI, S.; HAYASHI, Y.; TAKAO, K.; MARUYAMA, T.; AGO, Y.; KODA, K.; JIN, F. J.; OKAWA, K.; OLDENBORG, P. A.; OKAZAWA, H.; MURATA, Y.; FURUYA, N.; MATSUDA, T.; MIYAKAWA, T.; MATOZAKI, T. Stress-evoked tyrosine phosphorylation of signal regulatory protein alpha regulates behavioral immobility in the forced swim test. **J Neurosci**, v. 30, n. 31, p. 10472-10483, 2010.

PALMA, B. D.; TIBA, P. A.; MACHADO, R. B.; TUFIK, S.; SUCHECKI, D. Immune outcomes of sleep disorders: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis as a modulatory factor. **Revista Brasileira De Psiquiatria**, v. 29, n., p. S33-S38, 2007.

PAYKEL, E. S.; COOPER, Z. Life events and social stress. In: Paykel, E. S. (Ed.). **Handbook of affective disorders**. London: Churchill Livingstone, 1992,

PENTEADO, S. H. N. W.; MASSOCO, C. O.; KIRSTEN, T. B.; REIS-SILVA, T. M.; ACENJO, M. K.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.; BERNARDI, M. M. Prenatal lipopolysaccharide (LPS) increases maternal behavior, decreases maternal odor preference and induces endotoxin hyporesponsiveness. **Psychology & Neuroscience** (Online), 2013 (*in press*)

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral Despair in Mice - Primary Screening-Test for Antidepressants. **Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie**, v. 229, n. 2, p. 327-336, 1977.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. **Eur J Pharmacol**, v. 51, n. 3, p. 291-294, 1978.

PORSOLT, R. D. Animal models of depression: utility for transgenic research. **Rev Neurosci**, v. 11, n. 1, p. 53-58, 2000.

PORSOLT, R. D.; BROSSARD, G.; HAUTOBOIS, C.; ROUX, S. Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Curr Protoc Neurosci**, v. Chapter 8, n., p. Unit 8 10A, 2001.

RAKYAN, V. K.; BLEWITT, M. E.; DRUKER, R.; PREIS, J. I.; WHITELAW, E. Metastable epialleles in mammals. **Trends Genet**, v. 18, n. 7, p. 348-351, 2002.

RAKYAN, V. K.; CHONG, S.; CHAMP, M. E.; CUTHBERT, P. C.; MORGAN, H. D.; LUU, K. V.; WHITELAW, E. Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after maternal and paternal transmission. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 5, p. 2538-2543, 2003.

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

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

SCHIEPERS, O. J.; WICHERS, M. C.; MAES, M. Cytokines and major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 29, n. 2, p. 201-217, 2005.

SCHILDKRAUT, J. J.; KETY, S. S. Biogenic amines and emotion. **Science**, v. 156, n. 3771, p. 21-37, 1967.

SELYE, H. **The stress of life**. NewYork: McGraw-Hill, 1984

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

SOUSSI, T.; ISHIOKA, C.; CLAUSTRES, M.; BEROUD, C. Locus-specific mutation databases: pitfalls and good practice based on the p53 experience. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 1, p. 83-90, 2006.

STAHL, S. M. **Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas**, 2010

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

TANG, W. Y.; HO, S. M. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 8, n. 2, p. 173-182, 2007.

TENG, C. T.; HUMES, E. C.; DEMETRIO, F. N. Depressão e Comorbidades Clínicas. **Revista De Psiquiatria Clinica**, v. 32, n. 3, p. 10, 2005.

THOMPSON, A. W. **The cytokine handbook**. San Diego: Academic Press, 1998. xxii, 1017 p. p.

TAI, H. W.; GRANT, P. A.; RISSMAN, E. F. Sex differences in histone modifications in the neonatal mouse brain. **Epigenetics**, v. 4, n. 1, p. 47-53, 2009.

TURNBULL, A. V.; RIVIER, C. L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiol Rev**, v. 79, n. 1, p. 1-71, 1999.

TUSIE LUNA, M. T. Genes and type 2 diabetes mellitus. **Arch Med Res**, v. 36, n. 3, p. 210-222, 2005.

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. **Schizophr Res**, v. 47, n. 1, p. 27-36, 2001.

VAN DER HEYDEN, J. A.; MOLEWIJK, E.; OLIVIER, B. Strain differences in response to drugs in the tail suspension test for antidepressant activity. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 1, p. 127-130, 1987.

VIALOU, V.; FENG, J.; ROBISON, A. J.; NESTLER, E. J. Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 53, n., p. 59-87, 2013.

VISMARI, L.; ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Depression, antidepressants and immune system: a new look to an old problem. **Revista De Psiquiatria Clinica**, v. 35, n. 5, p. 196-204, 2008.

WALKER, A. K.; HAWKINS, G.; SOMINSKY, L.; HODGSON, D. M. Transgenerational transmission of anxiety induced by neonatal exposure to lipopolysaccharide: implications for male and female germ lines. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 8, p. 1320-1335, 2012.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

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

WEISSMAN, M. M.; WICKRAMARATNE, P.; NOMURA, Y.; WARNER, V.; VERDELI, H.; PILOWSKY, D. J.; GRILLON, C.; BRUDER, G. Families at high and low risk for depression: a 3-generation study. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, n. 1, p. 29-36, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression is a common illness and people suffering from depression need support and treatment**: secondary title: World Health Organization, 2012.

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

8. ANEXOS

8.1 FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE BIOÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA		
<i>Comissão de Ética no uso de animais</i>		
CERTIFICADO		
<p>Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos transgeracionais da administração pré-natal do lipopolissacarídeo sobre o comportamento e sistema imune de camundongos avaliados por modelos de depressão", protocolado sob o nº 2653/2012, utilizando 70 (setenta) camundongos, sob a responsabilidade do(a) Dra. Maria Martha Bernardi, 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 15/8/2012.</p>		
<p>We certify that the Research "Transgenerational effects of prenatal lipopolysaccharide exposure on the behavior and immune system of mice rated by animal models of depression", protocol number 2653/2012, utilizing 70 (seventy) mice, under the responsibility Dra. Maria Martha Bernardi, 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 8/15/2012.</p>		
<p>São Paulo, 16 de agosto de 2012.</p>		
<p> Denise Tabacchi Fantoni Presidente</p>		
<p>Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87 Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"</p>	<p>fone: + 55 11 3091-7671/7676 Fax: +55 11 3032-2224</p>	