

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA**

MARINA TARICANO

**Efeitos da administração pré-natal de LPS no
aprendizado e/ou memória na prole de ratas**

**São Paulo
2010**

MARINA TARICANO

**Efeitos da administração pré-natal de LPS no
aprendizado e/ou memória na prole de ratas**

Dissertação 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: Neurociências e Comportamento

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

**São Paulo
2010**

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

Taricano, Marina.

Efeitos da administração pré-natal de LPS no aprendizado e/ou memória na prole de ratas / Marina Taricano; orientadora Maria Martha Bernardi. -- São Paulo, 2010.

103 f.

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

1. Lipopolissacarídeos 2. Desenvolvimento 3. Aprendizagem 4. Ratos
I. Título.

QP632.E4

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARINA TARICANO

Título: Efeitos da administração pré-natal de LPS no aprendizado e/ou memória na prole de ratas

Dissertação 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:
Neurociências e Comportamento

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais pela formação que me ofereceram durante toda minha vida, pelos modelos que se tornaram e por tudo mais que é impossível de ser colocado em palavras.

Ao meu marido pelo apoio, admiração e compreensão ao longo do período de elaboração deste trabalho.

*À Profª. Drª. Maria Martha Bernardi, pela oportunidade,
confiança, paciência e ensinamentos durante todos esses anos.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as oportunidades que me oferece e pelo direcionamento na escolha e condução das mesmas.

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

À Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Araujo Silva, pela compreensão e colaboração fundamental no início deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto, por todo aprendizado, direcionamento e exemplo de dedicação.

Ao Prof. Dr. Jorge Camilo Flório pelo apoio durante os experimentos de neuroquímica e estatísticas.

Aos funcionários do biotério e do laboratório de Farmacologia e Toxicologia (VPT-FMVZ- USP) pela ajuda, colaboração e amizade.

Aos amigos Thiago, Elaine, Carol, Luciana Lippi e Karin pela convivência, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelos momentos, enfim, por tudo.

Aos meus colegas de pós-graduação: Alex, Ana Paula, Andréia, Camila Lima, Camila Moreira, Daniel, Denise, Domenica, Dudu, Estela, Felipe, Glaucie, João Paulo, Karin, Luciana Cunha, Luciana Vismari, Maria Isabel, Milena, Natô, Portela, Renato, Ricardo, e Wanderley pela convivência e aprendizado.

À todos do grupo de Neuroimunomodulação por todos os ensinamentos e direcionamentos no decorrer deste trabalho

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido pela bolsa de estudos (07/56850-1) e pelo projeto temático da qual este trabalho faz parte.

"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante."

Charles Chaplin

RESUMO

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

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina de bactérias gram-negativas utilizada experimentalmente para estimular processos inflamatórios e ativar o sistema imune através da liberação de citocinas pró-inflamatórias no sistema nervoso central (SNC). A administração experimental de LPS a ratas prenhes resulta em alterações que podem ser verificadas tanto nos animais submetidos ao tratamento quanto na prole destas fêmeas. O objetivo deste estudo foi o de verificar a existência alterações relacionadas à aprendizagem e à memória na prole masculina de ratas submetidas ao LPS durante a gestação. Para tanto, foi administrado LPS (100mg/kg) no 9,5^o dia da prenhes de ratas Wistar. O presente trabalho avaliou os efeitos desta administração no reconhecimento dos animais utilizando o olfato tanto na infância quanto na idade adulta, assim como os níveis de neurotransmissores no bulbo olfatório. A atividade geral dos animais foi analisada no campo aberto e também o comportamento no labirinto em cruz elevado. A aprendizagem dos animais foi observada na caixa de Skinner e também foi analisado reconhecimento de objetos dos animais. Os níveis de neurotransmissores do hipocampo na idade adulta também foram dosados. Os resultados mostraram que a administração de LPS no 9,5^o de gestação causou: 1) diminuição do reconhecimento do odor materno nos filhotes na infância e que essa alteração não permanece na idade adulta; 2) diminuição nos níveis de dopamina no bulbo olfatório dos animais tratados pré-natalmente; 3) ausência de interferência na atividade geral e de locomoção dos animais quando comparados com o grupo controle; 4) ausência de alterações na aquisição do aprendizado resultando porém em diminuição no tempo de reversão do aprendizado; 5) nenhuma diferença no reconhecimento de novos objetos assim como ausência de alterações nos níveis de neurotransmissores no hipocampo comparado ao grupo controle. Esses dados sugerem que infecções maternas podem interferir no ambiente intra-uterino e desta forma interferir no desenvolvimento e na atividade do SNC da ninhada em longo prazo.

Palavras-chave:LPS, desenvolvimento, aprendizagem

ABSTRACT

TARICANO, M. **Effects of the LPS administration in learning and/or memory in offspring rats.** 2010. 103f. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The lipopolysaccharide (LPS) is an endotoxin of gram-negative bacteria used experimentally to stimulate inflammatory processes and activate the immune system through the release of pro-inflammatory cytokines in the central nervous system (CNS). The experimental administration of the LPS in pregnant rats results in changes that can be viewed both in animals subjected to the treatment and the offspring of these females. The aim of this study was to verify the changes related to learning and memory in male offspring of rats submitted to LPS during gestation. It was administered LPS (100mg/kg) in 9,5th day of pregnant of Wistar rats. This work has investigated the effects of this administration in recognition of animals using the olfaction in childhood and adulthood as well as levels of neurotransmitters in the olfactory bulb. The general activity of the animals was analyzed in the open field task and also the behavior in the elevated plus maze. The learning process of the animals was observed in the Skinner box and also studied animal objects recognition. The levels of neurotransmitters of hippocampus were also analyzed. The results showed that the administration of LPS on 9,5 gestation day caused: (1) decrease of the smell recognition in childhood and do not remains in adulthood; (2) decrease in levels of dopamine in the olfactory bulb of the animals treated; (3) not interfered in general activity of animals when compared with the control group; (4) there was no difference in the acquisition of learning but presented decrease in time reversal of learning; (5) did not make differences in recognition of the new objects as well as not submitted changes in levels of neurotransmitters in hippocampus compared to the group control. These data suggest that maternal infection can interfere in the intrauterine environment and thus interfere with development and activity of the SNC.

Keywords: LPS, development, learning

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura da membrana celular de bactérias gram-negativas (adaptado de CAROFF; KARIBIAN, 2003).....	22
Figura 2-	LPS da parede celular de bactérias gram-negativas (adaptado de ERRIDGE; BENNETT-GUERRERO; POXTON, 2002).....	22
Figura 3-	Mecanismo de ação do LPS em um macrófago (adaptado de KIRSTEN, 2008).....	25
Figura 4-	Esquema da caixa utilizada para a avaliação da preferência olfatória no DPN 7.....	36
Figura 5-	Arena de campo aberto utilizada para a observação da atividade geral individual dos filhotes no DPN 60 por uma sessão de 5 minutos. A arena foi subdividida virtualmente pelo sistema computadorizado EthoVision®.....	37
Figura 6-	Sistema de observação computadorizada EthoVision®. A: arena de campo aberto; B: câmera para captação das imagens; C: monitor de vídeo ligado ao computador; D: imagem digitalizada representada em pixels. O mesmo programa rastreia e analisa o comportamento animal.....	40
Figura 7-	Representação das subdivisões virtuais feitas na arena de campo aberto pelo programa EthoVison®: Periférica, Intermediária e Central.....	40
Figura 8-	Esquema de campo aberto utilizado com a câmera para captação das imagens.....	42
Figura 9-	Objetos utilizados para o reconhecimento.....	42
Figura 10-	Esquema do teste de reconhecimento de objeto (adaptado de VENTURA, 2004).....	43
Figura 11-	Caixa de condicionamento operante. A: Luz superior; B: Piso com barras de aço; C: Contador de pressões na barra; D: Controle manual do bebedouro; E: Controle de intensidade da luz.....	45
Figura 12-	Parte interna da caixa de condicionamento operante. A: Barra de pressão; B: Bebedouro.....	45
Figura 13-	Esquema das medidas do aparato para o experimento de preferência olfatória na idade adulta.....	48
Figura 14-	Aparato utilizado para o experimento de preferência olfatória na idade adulta no DPN 90.....	48

Figura 15-	Labirinto em cruz elevado.....	50
Figura 16-	Efeitos da administração pré-natal de LPS (100µg/kg) no DG 9,5 sobre o comportamento maternal de recolhimento dos filhotes de ratas. (A) Recolhimento do 1º filhote; (B) Recolhimento do 2º filhote; (C) Recolhimento do 3º filhote; (D) Recolhimento do 4º filhote; (E) Recolhimento do 5º filhote; (F) Recolhimento do 6º filhote; (G) Recolhimento do 7º filhote; (H) Recolhimento do 8º filhote. * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle (Teste <i>t</i> de Student). Os valores são representados pela média e erro padrão. n=8.....	59
Figura 17-	Efeitos da administração pré-natal de LPS (100µg/kg) no DG 9,5 sobre o comportamento maternal de ratas. * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle (Teste <i>t</i> de Student). Os valores são representados pela média e erro padrão. n=8.....	60
Figura 18-	Efeitos da exposição pré-natal de LPS (100 µg/Kg no DG 9,5) no tempo total de permanência e o tempo de permanência nas 5 tentativas no lado da maravalha do ninho da prole masculina de ratas observadas no DPN 7.(A) Tempo total na maravalha do ninho; (B) 1ª tentativa;(C) 2ª tentativa; (D) 3ª. tentativa; (E) 4ª tentativa; (F) 5ª tentativa. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, comparado com o grupo controle (Teste <i>t</i> de Student). Os valores são representados como média e erro padrão. n=8.....	64
Figura 19-	Efeitos da administração pré-natal ao LPS (100 µg/kg) no DG 9,5 na atividade geral observada em campo aberto da prole masculina de ratas. Os valores são representados pela média e erro padrão.(A) Tempo de permanência nas zonas; (B) Número de entradas nas zonas; (C) Distância percorrida; (D) Velocidade média; (E) Tempo de comportamentos; (F) Frequência de comportamentos. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Teste <i>t</i> de Student). n=9 animais do grupo controle e n=10 animais do grupo experimental.....	67
Figura 20-	Efeitos da administração pré-natal ao LPS (100 µg/kg) no DG 9,5 na memória de reconhecimento de objetos da prole masculina de ratas. Os valores são representados pela média e erro padrão.(A) Tempo de exploração dos objetos; (B) Tempo total de exploração dos objetos; (C) Índice de discriminação;(D) Bolos fecais. (Teste <i>t</i> de Student). n=9.....	70
Figura 21-	Efeitos administração pré-natal da LPS (100 µg/kg no DG 9,5) na aprendizagem por condicionamento de pressão na barra da prole masculina de ratas no DPN 90, nos parâmetros de modelagem, discriminação e reversão (A), e número de pressões na barra no período de luz (B). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Teste <i>t</i> de Student) com relação com grupo controle. Os valores são representados como média \pm desvio padrão. n=9 para animais do grupo controle e n=10 para	73

	animais do grupo experimental.....	
Figura 22-	Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 µg/kg no DG 9,5) na aprendizagem por condicionamento de pressão na barra da prole masculina de ratas no DPN 90. (A) Sessões de discriminação; (B) Sessões de reversão; (C) Curva média de aprendizagem dos grupos tratados e não tratados.....	74
Figura 23-	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no DG 9,5) na preferência olfatória da prole masculina de ratas no DPN 70 (Teste <i>t</i> de Student). (A) Tempo total no lado da maravalha com sangue; (B) Tempo sobre a maravalha com sangue; (C) Tempo sobre a maravalha limpa; (D) Bolos fecais. Os valores são representados como média e erro padrão. n=8.....	77
Figura 24-	Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 µg/kg no DG 9,5) no labirinto em cruz elevado da prole masculina de ratas no DPN 90. (A) Tempo nos braços; (B) Frequência de entrada nos braços; (C) Frequência de comportamentos; (D) Tempo de comportamentos; (E) Velocidade média. (Teste <i>t</i> de Student) Os valores são representados pela média e erro padrão. n=8.....	80
Figura 25-	Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 µg/kg no DG 9,5) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no bulbo olfatório da prole masculina de ratas. ** p<0,01 comparado com o grupo controle (Teste <i>t</i> de Student) com relação com grupo controle Os valores são representados pela média e erro padrão.....	83
Figura 26-	Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 µg/kg no DG 9,5) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no hipocampo da prole masculina de ratas. (Teste <i>t</i> de Student). Os valores são representados pela média e erro padrão.n=9.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 µg/Kg) no DG 9,5 na latência (segundos) de recolhimento dos filhotes de ratas Os valores são representados pela média e erro padrão. n=8.....	61
Tabela 2-	Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 µg/Kg) no DG 9,5 na latência em segundos de agrupamento dos filhotes, permanência da rata sobre a ninhada em posição adequada para amamentação e do comportamento maternal total de ratas. Teste <i>t</i> de Student. Os valores são representados pela média e erro padrão. n=8.....	61
Tabela 3-	Avaliação do comportamento maternal total das ratas observado aos 45 e 60 minutos e a presença de ninho na caixa moradia antes da separação. n=8.....	62
Tabela 4-	Efeitos da exposição pré-natal de LPS (100 µg/Kg no DG 9,5) na preferência olfatória na prole masculina de ratas observadas no DPN 7. * <i>p</i> <0,05 e ** <i>p</i> <0,01, comparado com o grupo controle (Teste <i>t</i> de Student). Os valores são representados como média e erro padrão. n=8.....	65
Tabela 5-	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no DG 9,5) na atividade geral observada em campo aberto da prole masculina de ratas observadas no DPN 60. Os valores são representados pela média e erro padrão. * <i>p</i> <0,05 comparado com o grupo controle (Teste <i>t</i> de Student) n=9 animais do grupo controle e n=10 animais do grupo experimental.....	68
Tabela 6-	Efeitos da administração pré-natal do LPS (100 µg/kg) no DG 9,5 na memória de reconhecimento de objetos da prole masculina de ratas no DPN 70. Os valores são representados pela média e erro padrão. n=9.....	71
Tabela 7-	Efeitos da administração pré-natal do LPS (100 µg/kg) no DG 9,5 na aprendizagem por condicionamento de pressão na barra da prole masculina de ratas no DPN 90. * <i>p</i> <0,05 comparado com o grupo controle (Teste <i>t</i> de Student). Os valores são representados pela média e erro padrão. n=8.....	75
Tabela 8-	Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no DG 9,5) na preferência olfatória da prole masculina de ratas no DPN 70. (Teste <i>t</i> de Student). Os valores são representados como média	78

	e erro padrão. n=8.....	
Tabela 9-	Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 µg/kg no DG 9,5) no comportamento no labirinto em cruz elevado da prole masculina de ratas no DPN 90. (Teste <i>t</i> de Student) Os valores são representados pela média e erro padrão. n=8.....	81
Tabela 10-	Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 µg/kg no DG 9,5) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no bulbo olfatório da prole masculina de ratas. Os valores são representados pela média e erro padrão. n=8 animais do grupo controle e n=9 animais do grupo experimental.....	85
Tabela 11-	Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 µg/kg no DG 9,5) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no hipocampo da prole masculina de ratas. Os valores são representados pela média e erro padrão. n=9.....	85

LISTA DE SIGLAS

5HIAA	ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	hidrocloridrato de serotonina
AGROUP	latência para agrupar os filhotes
ClHO ₄	ácido perclórico
CMT	comportamento maternal total
CNT	concentração do neurotransmissor
CRF	reforço contínuo da resposta de pressão
CROUCH	latência para a rata ficar sobre a ninhada em posição para amamentação
DA	dopamina
DG	dia de gestação
DHBA	ácido 3,4-dihidroxibenzilamina
DNP	dia pós-natal
DOPAC	ácido 3,4-dihidroxifenilacético
EDTA	ácido dissódico etilenodiaminotetracético
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
H ₃ PO ₄	ácido ortofosfórico
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HVA	ácido homovanílico

i.p.	Intraperitoneal
ID	índice de discriminação dos objetos
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
LBP	<i>lipopolysaccharide binding protein</i>
LPS	lipopolissacarídeo
NaCl	cloreto de sódio
NOR	noradrenalina
REC	latência para buscar os filhotes
SNC	sistema nervoso central
TIRs	receptor <i>toll interleukin-1</i>
TLR4	receptores <i>toll-like 4</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral α
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 DOENÇAS PRÉ-NATAIS.....	19
1.2 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS).....	21
1.3 MECANISMO DE AÇÃO DO LPS.....	23
1.4 APRENDIZAGEM.....	26
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 ANIMAIS.....	32
3.2 DROGAS E SOLUÇÕES.....	33
3.3 TRATAMENTO.....	33
3.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNAL DE RATAS LACTANTES.....	34
3.5 TESTE DE PREFERÊNCIA OLFATÓRIA EM FILHOTES DE RATAS.....	35
3.6. TESTE DA ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO.....	37
3.6.1 Sistema de observação computadorizada – ethovision®.....	38
3.7 TESTE DE RECONHECIMENTO DE UM NOVO OBJETO.....	41
3.8 CONDICIONAMENTO OPERANTE DE RATOS.....	46
3.9. TESTE DE PREFERÊNCIA OLFATÓRIA EM RATOS ADULTOS.....	48
3.10. TESTE EM LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	50
3.11 DOSAGEM DE NEUROTRANSMISSORES.....	52
3.11.1 Coleta dos tecidos e preparo das amostras.....	52

3.11.2 <i>Aparelho</i>	53
3.11.3 <i>Preparo das soluções</i>	53
3.11.4 <i>Calibração</i>	55
3.11.5 <i>Cálculo das concentrações dos neurotransmissores e seus metabólitos</i>	55
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
4 RESULTADOS	58
4.1 COMPORTAMENTO MATERNAL DE RATAS LACTANTES ADMINISTRADAS COM 100µg/Kg DE LPS NO DG 9,5.....	58
4.2 PREFERÊNCIA OLFATÓRIA DA PROLE MASCULINA DE RATOS NO DPN 7 CUJAS MÃES RECEBERAM NO DG 9,5, 100µg/Kg DE LPS.....	63
4.3 ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO DA PROLE MASCULINA DE RATOS CUJAS MÃES RECEBERAM NO DG 9,5, 100µg/Kg DE LPS.....	66
4.4 MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS DA PROLE MASCULINA DE RATOS CUJAS MÃES RECEBERAM NO DG 9,5, 100µg/Kg DE LPS.....	69
4.5 APRENDIZADO POR CONDICIONAMENTO DA PROLE MASCULINA DE RATOS CUJAS MÃES RECEBERAM NO DG 9,5, 100µg/Kg DE LPS.....	72
4.6 PREFERÊNCIA OLFATÓRIA DA PROLE MASCULINA DE RATOS NO PND 70 CUJAS MÃES RECEBERAM NO DG 9,5, 100µg/Kg DE LPS....	76
4.7 COMPORTAMENTO DA PROLE MASCULINA DE RATOS CUJAS MÃES RECEBERAM NO DG 9,5, 100µg/Kg DE LPS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	79
4.8 NÍVEIS DE NEUROTRANSMISSORES E METABÓLITOS DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTAS OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS NO BULBO OLFATÓRIO E NO HIPOCAMPO	82
5. DISCUSSÃO	86
6. CONCLUSÕES	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS PRÉ-NATAIS

Todo o processo de desenvolvimento é caracterizado pela plasticidade do sistema nervoso central (SNC) e pela grande influência que o ambiente exerce. É por esta razão que qualquer distúrbio neste processo poderá resultar em alterações permanentes por toda a vida. Diversas evidências mostram que eventos ocorridos no ambiente pré-natal e intrauterino podem resultar em alterações no desenvolvimento funcional e fisiológico dos sistemas em formação ocasionando alterações neurobiológicas subseqüentes (BOUSLAMA, et al., 2006; MEYER; FELDON; FATEMI, 2009; ROMERO et al., 2007; WANG et al., 2007;)

A atenção à gestante tem se aprimorado nos últimos anos, no entanto, contrariamente ao que se esperaria como consequência em relação aos recém nascidos, observa-se aumento no número de partos prematuros, nascimentos com baixo peso e doenças perinatais, razão pela qual procura-se entender essa dualidade e estabelecer estratégias preventivas (LEONARDO; PENNYPACKER, 2009), que buscam a diminuição nas taxas de mortalidade de recém nascidos, e na diminuição nas taxas de morbidades neurológicas associadas à alterações no período gestacional (GIRARD et al., 2009).

As complicações perinatais podem resultar em danos do sistema nervoso central como paralisia cerebral, distúrbios mentais como a esquizofrenia e o autismo, podem provocar isquemia/hipóxia e retardo mental (BOUSLAMA et al., 2006; LAROUCHE et al., 2005; ROMERO, et al., 2007). As causas dessas alterações parecem estar ligadas às infecções e inflamações maternas no período gestacional (BOUSLAMA et al., 2006; FORTIER et al., 2004; MEYER; FELDON; FATEMI, 2009).

Neste sentido, a literatura aponta algumas relações entre agentes infecciosos e problemas neurológicos nos neonatos refletidos em seu desenvolvimento pós natal, como por exemplo a infecção por bactérias corioamnióticas associadas à paralisia cerebral (GIRARD et al., 2009) e infecções por bactérias gram-negativas associadas à esquizofrenia e autismo (FORTIER et al, 2004).

As complicações e as alterações variam de intensidade e de características de acordo com o período gestacional em que a mãe foi acometida, pois de acordo com a etapa do desenvolvimento diferentes órgãos estão sendo formados e desenvolvidos, condições clínicas maternas e da intensidade do estímulo. Modelos de ativação imune pré-natal são utilizados para estudar os efeitos da exposição materna a agentes infecciosos no desenvolvimento do SNC e no comportamento dos filhotes (MEYER; FELDON; FATEMI, 2009).

A resposta inflamatória em conseqüência de uma infecção é capaz de afetar o cérebro em desenvolvimento e ser responsável pelo desenvolvimento de um grande número de patologias em crianças. Estas alterações do desenvolvimento podem ser evidentes na infância ou mesmo persistirem até a idade adulta (GOLAN et al., 2006; MEYER; FELDON; FATEMI, 2009; ROMERO et al., 2007).

As intercorrências perinatais decorrentes de processos infecciosos seguidos de resposta inflamatória podem causar de acordo com o período em que ocorrem: alterações sensório-motoras (BORRELL et al., 2002), alterações comportamentais, déficits neurológicos (NITSOS et al., 2006; WANG et al., 2007, 2006), problemas de aprendizagem e déficits cognitivos (BOUSLAMA et al., 2006), distúrbios neuropsiquiátricos incluindo a esquizofrenia, o autismo (KIRSTEN, 2008; SHI et al., 2003).

Para a reprodução dos efeitos dessas intercorrências utiliza-se o LPS que é uma endotoxina da parede de membrana de bactérias que atua como indutor de respostas do sistema imune. Esta endotoxina, que será melhor descrita nos próximos itens, age diretamente nas células placentárias as quais induzem a liberação de mediadores inflamatórios. Neste sentido, KIRSTEN (2010) mostrou que ratas prenhes que receberam o LPS no 9,5^o dia da gestação apresentaram lesões na placenta, sugerindo alterações no ambiente materno-fetal.

De acordo com testes comportamentais realizados com modelos experimentais (ADEN et al., 2002; KIRSTEN, 2008; TEN et al., 2004), as habilidades ou inabilidades observáveis no adulto no modelo experimental não refletem fielmente a situação do mesmo indivíduo em sua fase de desenvolvimento e maturação, uma vez que este processo exerce indiscutível influência sobre a cognição (BOUSLAMA et al., 2006).

Esse processo de desenvolvimento e maturação do sistema nervoso central não é diretamente aplicável ao processo humano devido às características

individuais das espécies, por esta razão, as alterações e os efeitos observados nos modelos, seguem como direcionamento para novas pesquisas e tratamentos e não como reproduções fiéis. Da mesma forma que nos humanos, o desenvolvimento ocorre também de acordo com as interferências e estímulos ambientais que variam. Nos modelos experimentais, essas interferências podem ser controladas e direcionadas de acordo com o objetivo da pesquisa, reforçando sua importância no processo de desenvolvimento (SALE et al., 2007).

1.2 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

O LPS é um componente tóxico estrutural, uma endotoxina, que constitui a maior parte da membrana de bactérias gram-negativas e é fundamental para sua integridade estrutural e funcional (Figura 1) (ERRIDGE; BENNETT-GUERRERO; POXTON, 2002; KARROW, 2006, WANG et al, 2006, XU et al, 2006; XU et al, 2005). Nos seres humanos o LPS está constantemente presente no sistema gastrointestinal em pequena quantidade principalmente nos processos infecciosos e o aumento da permeabilidade do LPS neste sistema para o sangue está relacionado com alterações gástricas e o consumo de álcool (XU et al., 2006).

O LPS é composto por três partes sendo uma de um lipídeo complexo (lipídeo A), que está inserido na membrana e apresenta um núcleo (*core oligosaccharide*) e de uma série terminal com unidades de repetições particulares de cada espécie, esta é a parte mais externa composta de polissacarídeos (Figura 2) (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000; LU; YEH; OHASHI, 2008; SUSSMAN, 1997).

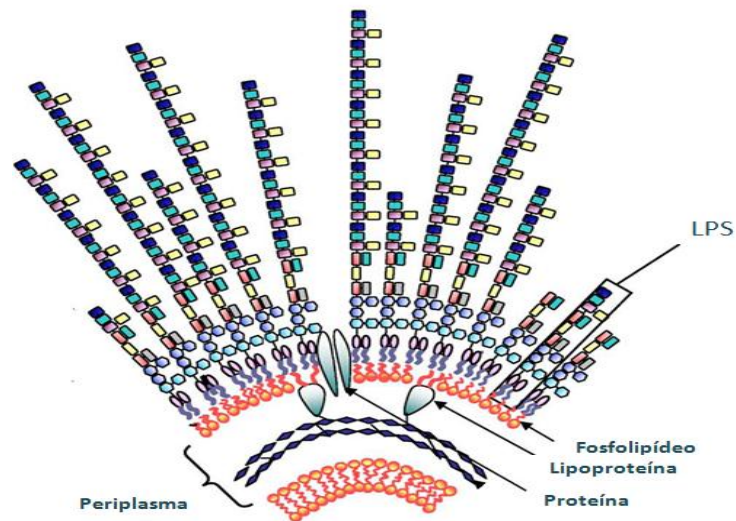


Figura 1- Estrutura da membrana celular de bactérias gram-negativas (adaptado de CAROFF; KARIBIAN, 2003)

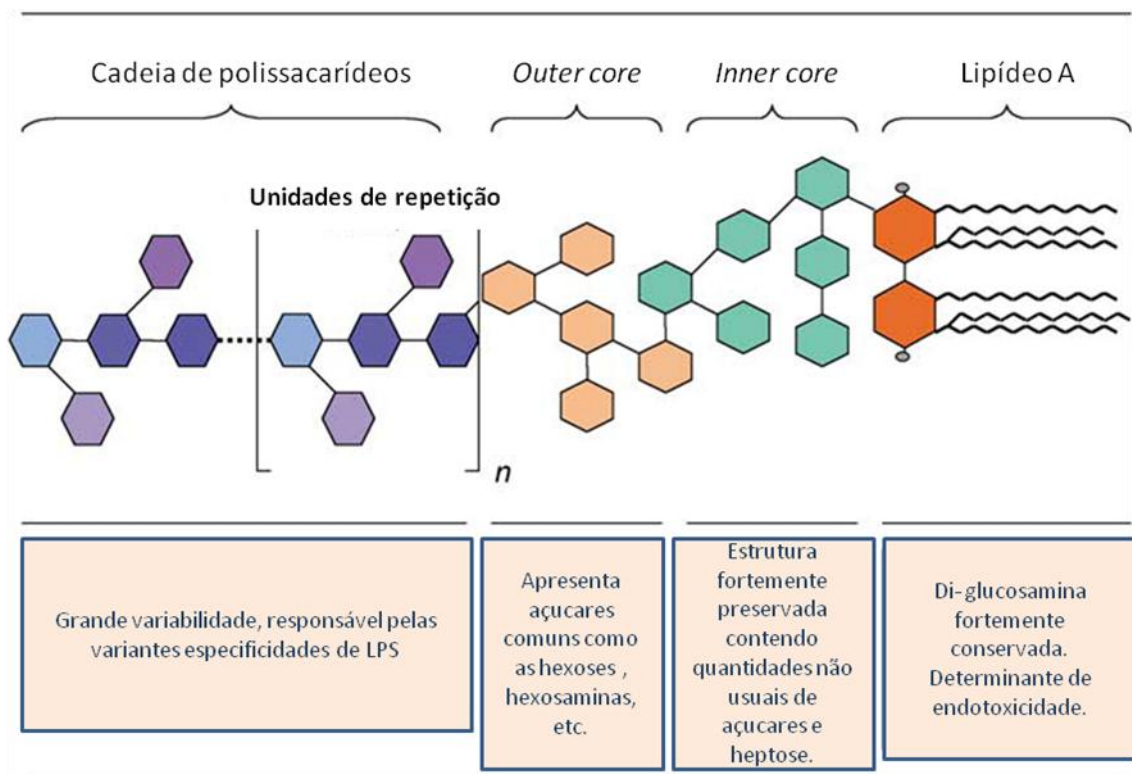


Figura 2- LPS da parede celular de bactérias gram-negativas (adaptado de ERRIDGE; BENNETT-GUERRERO; POXTON, 2002)

O LPS está ligado às membranas a partir de pontes hidrofóbicas e é sintetizado pela membrana citoplasmática e transportado para porção externa final da célula, região em que atua como proteínas da camada externa da membrana

(BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000; ERRIDGE; BENNETT-GUERRERO; POXTON, 2002; SUSSMAN, 1997).

Essa estrutura, principalmente a parte lipídica do LPS é biologicamente ativa, virulenta e seu mecanismo de ação está diretamente relacionado com o sintoma de algumas doenças (MWANZA et al. 2002; SUSSMAN, 1997; WANG et al, 2006;).

Com essa característica e com os procedimentos de extração fenólica do LPS da membrana dessas bactérias, o LPS é utilizado para provocar os efeitos de infecções e dessa forma avaliar suas conseqüências, sintomatologia e mecanismo de ação. A extração do LPS é feita de diferentes bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus spp*, dentre outras (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000; ERRIDGE; BENNETT-GUERRERO; POXTON, 2002; MWANZA, et al., 2002; SUSSMAN, 1997). Apesar de preservar sua porção de lipídeo A, que certamente apresenta grande significância em muitos processos patológicos, a fisiopatologia induzida pelo LPS das diferentes bactérias citadas não é coincidente. Isso ocorre pela porção de polissacarídeos que, em alguns casos, encontra resistência no organismo (ERRIDGE; BENNETT-GUERRERO; POXTON, 2002).

Os modelos experimentais são muito utilizados para análise de alterações sistêmicas, compreensão dos mecanismos de ação, fisiopatologia e farmacocinética dos processos inflamatórios e infecciosos, e fornecem ferramentas para testar as hipóteses de epidemiologia humana. Comercialmente para esses estudos a principal fonte de LPS é a partir da bactéria *Escherichia coli* (ERRIDGE; BENNETT-GUERRERO; POXTON, 2002; MEYER; FELDON; FATEMI, 2009; MIMS et al., 1999).

1.3 MECANISMO DE AÇÃO DO LPS

O LPS é um forte indutor do sistema imune inato e encontra-se biologicamente ativo em concentrações picomolares (JERALA, 2007; WANG, et al, 2006). Ao entrar em contato com o organismo animal, seja a partir de uma bactéria gram-negativa, ou pela administração direta do LPS extraído da membrana celular, o LPS irá provocar uma cascata de reações neste organismo infectado, podendo atuar

em diferentes células como: monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas e células endoteliais, e, principalmente em macrófagos (SALUK-JUSZCZAK; WACHOWICZ, 2005).

A ação do LPS se inicia com a ligação com uma glicoproteína do hospedeiro, o LBP (*lipopolysaccharide binding protein*) que é produzido pelo fígado do animal (ADEREM; ULEVITCH, 2000; MIYAKI, 2003). Após a integração forma-se o complexo LPS-LBP e a partir desta formação o LBP pode interagir de duas formas como descritas a seguir. A primeira forma ocorre em baixas concentrações aumentando a sinalização do LPS extraíndo-o da membrana da bactéria direcionando-o para o receptor CD14 e a segunda, em altas concentrações, que inibe a sinalização do LPS enviando-o para o serm de lipoproteínas e pela formação de associações com o LPS. É a partir do contato com o receptor CD14 que se inicia o contato com os macrófagos, dando início a ativação celular (JERALA, 2007).

O receptor CD14 facilita a transferência do LPS-LBP para a ativação de TLR4 (receptores *toll-like 4*) que inicia a geração do sinal transmembranar do macrófago, além de modular o reconhecimento do LPS (JERALA, 2007; KIRSTEN, 2008; LU; YEH; OHASHI, 2008). Com este reconhecimento inicia-se uma série de interações com os TIRs (receptor *toll interleukin-1*) que fazem a mediação da interação com as proteínas (MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM e SARM) até a ativação do fator NF- κ B que segue até o núcleo do macrófago e estimula a expressão de genes responsáveis pela síntese das citocinas pró-inflamatórias: fator de necrose tumoral (TNF- α), a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) dentre outras (HAVA et al, 2006; KIRSTEN, 2008; LU; YEH; OHASHI, 2008; ROMERO et al., 2007;). A figura 3 ilustra o mecanismo de ação do LPS no macrófago.

Devido à liberação destas citocinas, a administração sistêmica de LPS é um método amplamente utilizado para induzir a ativação da resposta imune, principalmente da resposta imune inata (inespecífica) com a participação dos macrófagos. Mais em longo prazo atuam também na resposta imune adquirida (ou adaptativa), referente a resposta de linfócitos que reconhecem antígenos microbianos específicos (com atuação dos TLR4, na ativação de membros da família B7, que ativam células T *naive*) (ADEREM; ULEVITCH, 2000; BORRELL et al, 2002; LEVITON; DAMMANN; DURUM, 2005).

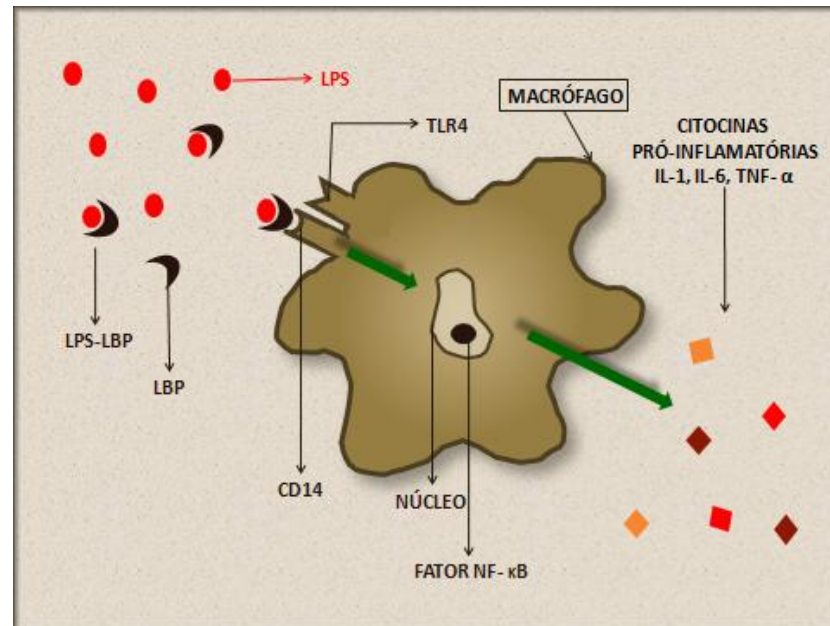


Figura 3 – Mecanismo de ação do LPS em um macrófago (adaptado de KIRSTEN, 2008)

Alguns autores citados por Konsman et al (2008) verificaram a presença de citocinas pró-inflamatórias no sistema nervoso central (SNC) dos animais administrados periféricamente com LPS levantando a hipótese de que o mesmo poderia atuar no SNC. As citocinas se mostraram mediadores cruciais entre o sistema imune e SNC (QUAN; HERKENHAM, 2002) e também responsáveis pelas alterações comportamentais encontradas nos animais como a anorexia, diminuição da exploração ambiental e social, diminuição da atividade locomotora, diminuição da memória, diminuição do comportamento sexual dentre outras alterações características do processo inflamatório (KINOSHITA, 2007).

Dunn (2006), Quan e Herkenham (2002) apresentaram em seus trabalhos as vias pelas quais as citocinas atingem o SNC. São elas:

- As citocinas são proteínas tipicamente pequenas, porém grandes para ultrapassar a barreira hematoencefálica. Após serem liberadas e atingirem a circulação sanguínea, seguem até o encéfalo e, para adentrarem, acessam os órgãos circunventriculares, que são regiões encefálicas as quais apresentam ausência da barreira hematoencefálica. Através da dosagem das citocinas nessa região e dos valores elevados encontrados é possível verificar a importância desta via de acesso.

- Uma importante via de acesso é o nervo vago que é a principal via aferente da cavidade abdominal para o cérebro. Quando liberadas, as citocinas podem entrar em contato com os receptores de citocinas das terminações vagais que enviam um impulso nervoso até o núcleo vagal no cérebro. Experimentos de vagotomia foram realizados e demonstraram uma diminuição na quantidade de citocinas encontradas no encéfalo de animais. Guyon et al. (2008) reforçam a importância da via do nervo vago afirmando também velocidade de transmissão por esta via.
- Outra forma de atingir o SNC é através da secreção de moléculas que possam ultrapassar a barreira hematoencefálica. As células endoteliais do organismo possuem receptores para citocinas que, uma vez ativadas, produzem e secretam essas moléculas que são mediadores inflamatórios lipídicos (como eicosanóides). Alguns trabalhos utilizam alguns inibidores de eicosanóides, como inibidores da enzima COX-2, impedem a produção dos mediadores, suprimindo o comportamento doente característico dos processos inflamatórios (DUNN, 2006; SALUK-JUSZCZAK; WACHOWICZ, 2005; XU et al., 2006).
- As citocinas podem modular a ativação de células nervosas. A microglia, que apresenta uma função direta com infecções e inflamações, em contato com citocinas liberadas pelo LPS, potencializa seus efeitos, estimulando a produção dessas citocinas no encéfalo.
- Outras vias também podem contribuir para a atuação das citocinas no cérebro. Estas, porém, não são as mais eficientes e prováveis. Acredita-se que as citocinas poderiam cruzar a barreira hematoencefálica usando sistemas de captura específicos, porém, Dunn (2006) considera a capacidade desses sistemas relativamente baixa.

1.4 APRENDIZAGEM

As alterações no desenvolvimento do SNC, incluindo as infecções e inflamações maternas durante a gestação, podem interferir e contribuir para

comprometimentos comportamentais e cognitivos assim como no desenvolvimento do sistema sensorio-motor do recém-nascido (ROMERO, 2008).

As deficiências cognitivas podem ocorrer em consequência de distúrbios do desenvolvimento cerebral frequentemente associado à prematuridade, alterações isquêmicas (DUNCAN et al, 2006), ou mesmo a infecções maternas perinatais (BOUSLAMA et al, 2006), sendo as inflamações intrauterinas a maior causa de partos pré-termos (BOUSLAMA et al, 2006; GOLAN et al, 2006; NITSOS et al, 2006; WANG et al, 2007; YANG et al, 2004). A infecção perinatal foi identificada como uma das causas mais comuns de encefalopatias e paralisia cerebral (EKLIND et al, 2005; NITSOS et al, 2006). Ressalte-se que a infecção materna que atuando de forma isolada ou combinada com outros eventos como, por exemplo, a hipoxemia ou isquemia (EKLIND et al, 2005), aumenta dramaticamente o risco de paralisia cerebral acompanhada de decréscimo da idade gestacional.

Para um melhor entendimento de como essas deficiências cognitivas ocorrem nos diferentes organismos, foram criados modelos experimentais. Estes analisam o comportamento aprendido e a memória em ratos e camundongos após infecções perinatais, com o objetivo de evidenciar o real comprometimento e as consequências destas no decorrer da vida (CAVALCANTI, 2007; ROMERO, 2008; WANG et al, 2007).

Para Cavalcanti (2007) os animais se adaptam ao ambiente por meio de aprendizagem bem como pelas associações feitas entre os eventos, este processo de associação relacionado tanto a informações simples quanto às mais complexas, é chamado de condicionamento. O condicionamento depende da relação entre um estímulo e o comportamento do organismo, e por esta razão os animais devem apresentar um sistema de captação e percepção de estímulos para desta forma, adaptar-se.

Para Carlson (2002) aprendizado é o processo por meio do qual as experiências vividas alteram bioquímica e estruturalmente proteínas de células neurais, constituindo o banco de memórias utilizado no desempenho de funções ao que genericamente se chama comportamento. As experiências não são armazenadas, ao invés disso alteram a percepção, a execução de comportamentos, o pensar e o planejar. O autor ainda coloca que a aprendizagem pode então ser definida como resultado de alterações físicas da estrutura do sistema nervoso, de

circuitos neurais que participam ativamente da percepção, execução de comportamentos, pensamento e planejamento.

A aprendizagem depende da memória que juntas são processos fundamentais para a sobrevivência e adaptação do organismo nas diversas condições ambientais. A simples recordação ou lembrança de eventos passados é uma definição extremamente simples e incompleta de memória, pois este complexo processo envolve vários fatores neuroanatômicos, neurofisiológicos, neuroquímicos, comportamentais e ambientais. Desta forma a definição mais adequada de memória é a capacidade de aquisição e armazenamento e evocação das informações (VALADARES, 2006).

Para um desenvolvimento adequado da aprendizagem alguns fatores são importantes, como a integridade do SNC, do sistema sensorial e perceptual (FONSECA, 1995). A alteração em qualquer um desses sistemas pode resultar em adaptações deficitárias ao meio, assim como dificuldade na percepção, aquisição e armazenamento de informações obtidas no ambiente, e desta forma, comprometer a sobrevivência de uma determinada espécie.

Nos ratos um importante sistema de percepção, adaptação e conseqüentemente de aprendizagem, é o sistema olfatório o qual, de acordo com Durand et al (1998), é fundamental para o reconhecimento e processamento cognitivo desses animais.

O sistema olfatório dos ratos, assim como de outros mamíferos, é capaz de detectar e discriminar milhares de diferentes moléculas no ambiente e essa habilidade é crucial para o seu desenvolvimento e sobrevivência. Apesar de estar presente desde o nascimento, o sistema olfatório se desenvolve durante a vida do animal e se aprimora de acordo com as informações olfatórias adquiridas e armazenadas. Os filhotes de ratos são menos sensíveis a odores do que ratos adultos, possivelmente pela quantidade limitada de inervações sensoriais formadas nesta etapa, porém, mesmo na infância, os filhotes já são capazes de se guiar e utilizar as pistas olfatórias para sua sobrevivência (GUTHRIE; GALL, 2003).

Outro fator fundamental para a aprendizagem e desenvolvimento tanto animal quanto humano, é o ambiente em que está inserido e a oferta de estímulos que este sistema recebe e busca. Para que receba esses estímulos e dessa forma se desenvolva, o SNC necessita que suas conexões nervosas se adaptem ao meio em que está inserido e modifique seu comportamento (aprendizagem). Para tanto a

integridade do sistema motor e sensorial deve estar preservada de tal forma a permitir a busca e percepção adequada de estímulos (AYRES, 2005).

Os modelos experimentais que investigam os processos cognitivos utilizam tarefas comportamentais e observam como o animal se locomove e utiliza o sistema sensorial para a exploração e resposta ao ambiente. Um exemplo destes modelos são os labirintos nos quais o animal deve mover-se e interagir com os estímulos a que é exposto. Sem um sistema locomotor e sensorial íntegros, essas tarefas seriam extremamente prejudicadas. (KLEMENT; BLAHNA; NEKOVÁŘOVÁ, 2008).

Kirsten (2008) analisou as alterações comportamentais e neuroquímicas da prole masculina de ratos expostas ao LPS (100 µg/Kg) no DG 9,5 e verificou que apesar da presença de comportamento doentio das mães após a administração do LPS, não houve comprometimento do desenvolvimento físico e reflexológico, tampouco na atividade geral dos filhotes no campo aberto. A dose e tratamento utilizado por Kirsten interferiu em alguns comportamentos desses animais como na diminuição do comportamento de brincar, na interação social na idade adulta e também nos níveis de dopamina estriatal e seus metabólitos, sugerindo que as infecções e inflamações maternas durante a gestação resultam em danos cerebrais e prejuízos comportamentais a longo prazo em seus filhotes.

Considerando evidências apresentadas em estudos envolvendo as infecções gestacionais que provocam alterações comportamentais e neurofisiológicas permanentes em filhotes e, sabendo que humanos estão frequentemente expostos à essas endotoxinas, como citado anteriormente, surge a necessidade de aprofundar as pesquisas para melhor compreender as alterações provocadas por essas infecções. Esse estudo visa dar continuidade aos estudos de Kirsten (2010) analisando as possíveis alterações na aprendizagem e na memória desses animais.

O modelo de estudo de infecção pré-natal com LPS no DG 9,5 foi proposto, por tratar-se de um período crítico para anormalidades (MEYER; YEE; FELDON, 2007) e que provoca alterações comportamentais e neuroquímicas como demonstrado por Kirsten et al. (2010). Neste sentido, este trabalho foi desenvolvido para que se pudesse verificar a extensão dos comprometimentos nos campos relacionados à aprendizagem e memória desses animais através de avaliação comportamental e neuroquímica.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o de estudar os efeitos comportamentais e neuroquímicos da administração pré-natal de LPS no 9,5^o dia da gestação na prole masculina de ratas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar os efeitos da administração de 100µg/Kg de LPS no 9,5^o dia de gestação no comportamento maternal.
- Estudar os efeitos da administração de 100µg/Kg de LPS no 9,5^o dia de gestação na preferência olfatória na prole masculina na infância e na idade adulta.
- Estudar os efeitos da administração de 100µg/Kg de LPS no 9,5^o dia de gestação na atividade geral da prole masculina de ratos na idade adulta.
- Estudar os efeitos da administração de 100µg/Kg de LPS no 9,5^o dia de gestação no aprendizado por condicionamento da prole masculina de ratos na idade adulta.
- Estudar os efeitos da administração de 100µg/Kg de LPS no 9,5^o dia de gestação no reconhecimento de objetos da prole masculina de ratos na idade adulta.

- Estudar os efeitos da administração de 100µg/Kg de LPS no 9,5º dia de gestação no comportamento no labirinto em cruz elevado da prole masculina de ratos na idade adulta.
- Estudar os efeitos da administração de 100µg/Kg de LPS no 9,5º dia de gestação nos níveis de neurotransmissores e de seus metabólitos no hipocampo e bulbo olfatório da prole masculina de ratos na idade adulta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Biotério e Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos e fêmeas Wistar de mesma linhagem, obtidos através de cruzamentos sucessivos do biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Bioética da FMVZ sob o protocolo número 1335/2008.

Estes animais foram alojados em grupos de até quatro animais, em gaiolas de polipropileno medindo 32 X 38 X 16 cm com água e alimento *ad libitum* durante todo o procedimento experimental. Os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}$ C), por meio de ar condicionado e sistema de exaustão e ciclo de 12 horas de claro e escuro, sendo a luz acesa às 6:00 horas.

Inicialmente as fêmeas foram colocadas com machos (2 X 1) até a detecção da prenhes, a qual foi feita no começo da manhã (7:00 - 8:00 horas), por meio de verificação da presença de espermatozóides do lavado vaginal. Este procedimento consiste em introduzir e recolher solução salina 0,9% (cloreto de sódio 0,9%) na vagina de ratas com o auxílio de pipeta plástica tomando-se o cuidado de não aprofundar a inserção de modo a evitar situações experimentais de pseudo-prenhes. Logo após esta etapa, o conteúdo líquido da pipeta (lavado vaginal) é colocado sobre uma lâmina de vidro e observado ao microscópio óptico (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Se verificada a presença de espermatozóides, considerou-se como dia 0 (zero) da gestação (DG 0) daquela fêmea. Esses animais foram então separados e acondicionados individualmente em gaiolas-moradia, e ali permaneceram durante toda a gestação. Após a etapa de acasalamento os machos foram utilizados em outros experimentos.

Após o nascimento da prole as ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes por fêmea, sendo 4 do sexo masculino e 4 do sexo feminino. No 21º dia os animais de sexos opostos foram separados, as fêmeas foram direcionadas para outro experimento enquanto os machos foram utilizados para a realização deste trabalho.

3.2 DROGAS E SOLUÇÕES

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

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

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

3.3 TRATAMENTO

Foram utilizadas 60 ratas divididas em dois grupos com 30 animais em cada. O grupo experimental recebeu no DG 9,5 por via intraperitoneal (i.p.), 100 µg/Kg de LPS e aquelas do grupo controle, 0,1 ml de solução salina pela mesma via dos animais tratados com LPS. Esta etapa do trabalho foi realizada sempre no período da tarde, mais precisamente entre 14:00 às 17:00 horas.

Essa dose de LPS foi escolhida, pois induz alterações comportamentais e endócrinas, além de aumentar os níveis de citocinas na placenta (KIRSTEN et al., 2010; SPENCER et al., 2007; WANG et al., 2006;). O DG 9,5 foi usado, pois coincide, em ratos, com o período de organogênese cerebral, especificamente com a formação da placa neural (BERNARDI, 2006; DESESSO, 2006).

3.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNAI EM RATAS LACTANTES.

Justificativa: Este teste foi realizado uma vez que alterações no comportamento materno podem levar à alterações comportamentais e neuroquímicas na prole.

Método: O teste comportamental foi realizado no 5º dia de lactação com um grupo de 8 animais pré-natalmente tratados com LPS e 8 animais tratados com solução salina. Inicialmente foi anotada a posição dos filhotes e da mãe na gaiola moradia, aproximadamente às 8:00. De acordo com o posicionamento dos animais a situação foi classificada como presença ou ausência de formação do ninho na gaiola moradia. Logo após, a ninhada foi retirada da gaiola, sendo colocada em uma outra gaiola sem maravalha onde permaneceu por 1 hora. Os filhotes foram colocados na gaiola divididos em quadrantes e o comportamento materno foi observado por 30 minutos, aos 45 e 60 minutos.

A observação do comportamento materno foi realizada medindo-se:

- Latência (s) para buscar os 8 filhotes (REC);
- Latência (s) para agrupar esses filhotes dentro do ninho (AGRUP);
- Latência (s) para a rata ficar sobre a ninhada em posição apropriada à amamentação (CROUCH);
- Latência (s) para o comportamento materno total (CMT), o que significa ficar em posição de amamentação sobre o filhote por pelo menos 2 minutos consecutivos.

As ratas que não apresentaram o comportamento materno durante os 10 primeiros minutos do teste foram retiradas do experimento, da mesma forma que as mães que tiveram menos de 8 filhotes (4 fêmeas e 4 machos) por ninhada.

3.5 TESTE DE PREFERÊNCIA OLFATÓRIA EM FILHOTES DE RATAS

Justificativa: Como comentado em trabalho anterior, mostrou-se que filhotes de ratas expostos ao mesmo tratamento com LPS apresentaram redução no comportamento social na infância e na idade adulta (KIRSTEN et al, 2010). Considerando-se estes resultados foi proposto que a inflamação materna neste período poderia representar um modelo de autismo. Uma das deficiências no autismo é a ausência de reconhecimento materno. Portanto, este experimento foi delineado com a finalidade de verificar possíveis alterações na olfação da prole, fato importante no reconhecimento materno.

Método: Um filhote de cada ninhada (8 para o grupo controle e 8 para o grupo experimental) foi submetido ao teste de preferência olfatória no DPN 7. Este experimento foi realizado no período da tarde entre 14:00 e 17:00 horas.

O experimento foi baseado nos estudos de aprendizagem olfatória associativa (RAINEK, et al., 2009) e consiste na escolha de dois odores diferentes: o do ninho e o da maravalha limpa. Para a observação da preferência olfatória foi empregada uma caixa de polipropileno (caixa moradia) medindo 32 X 38 X 16 cm, higienizada com álcool 5% e preparada com 300ml de maravalha limpa colocada em uma das extremidades da caixa e na outra extremidade, 300ml de maravalha retirada da caixa moradia em que o filhote estava abrigado (Figura 4).

O filhote foi colocado do lado oposto, de frente para as duas amostras de maravalha e o tempo em que o filhote (cabeça ou corpo) permaneceu em cada lado foi anotado. A observação teve a duração de um minuto. Os animais foram observados em 5 tentativas com um intervalo de 2 minutos entre elas, intervalo em que o animal foi colocado de volta na sua caixa moradia. Em cada um dos 5 procedimentos as maravalhas eram trocadas de lado (esquerda e direita) e ao final do experimento a caixa de procedimento foi higienizada com álcool 70% para eliminar os odores e não interferir no comportamento do próximo animal a ser observado. Estes procedimentos foram gravados por uma câmera de vídeo.

Os valores numéricos resultantes de cada uma das tentativas foram somados ao final do experimento e com isso foi analisado o tempo total de permanência do filhote do lado da maravalha do ninho e o tempo total de permanência do filhote na

maravalha limpa nas 5 tentativas. Ao final do experimento os animais foram colocados novamente em suas gaiolas de origem.



Figura 4- Esquema da caixa utilizada para a avaliação da preferência olfatória no DPN 7.

3.6. TESTE DA ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO

Justificativa: Este experimento foi planejado para verificar possíveis alterações motoras e de emocionalidade na prole de ratas expostas ao LPS no DG 9,5, as quais poderiam interferir na performance dos experimentos comportamentais subseqüentes.

Método: Um filhote de cada ninhada (9 para o grupo controle e 10 para o grupo experimental) foi observado no campo aberto no DPN 60. O aparato é construído segundo Broadhurst (1960) e modificado por Faggin e Palermo-Neto (1985), para observação da atividade geral dos animais. O experimento foi realizado sempre no período das 8:00 às 12:00 horas e intercalando os animais de diferentes grupos para evitar possíveis interferências do ciclo circadiano sobre o resultado.

Este campo aberto é constituído de uma arena circular com 97 centímetros de diâmetro por 32,5 centímetros de altura, pintado em cinza escuro fosco (Figura 5) e subdividido virtualmente pelo sistema computadorizado EthoVision® (descrito no item 3.6.1).



Figura 5- Arena de campo aberto utilizada para a observação da atividade geral individual dos filhotes no DPN 60 por uma sessão de 5 minutos. A arena foi subdividida virtualmente pelo sistema computadorizado EthoVision®.

Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena e observado por um período de 5 minutos, com o ambiente sempre previamente limpo com álcool 5%, eliminando possíveis odores deixados por outros animais.

Os parâmetros observados e calculados automaticamente pelo EthoVision® foram:

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

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

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

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

Tempo de levantar: tempo em segundos que o animal permaneceu apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, podendo ou não tocar com as patas anteriores as paredes do campo aberto.

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

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

Frequência de auto-limpeza: número de vezes que o animal permaneceu se lambendo ou coçando os próprios pêlos, membros e/ou região genital.

Duração de imobilidade: tempo em segundos, no qual o animal permaneceu imóvel, podendo ou não apresentar movimento de vibrissas.

3.6.1 Sistema de observação computadorizada – EthoVision®

Para análise de comportamento foi utilizado um sistema de rastreamento em vídeo, de análise de movimento e reconhecimento comportamental (NOLDUS, 1997). Este sistema de observação indireta engloba um *software* EthoVision® –

Video Tracking, Motion & Behavior Recognition System – versão 1.90 (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA), uma câmera filmadora (CCD-Iris Color Sony), monitor de vídeo (Sony) disposta dentro de uma sala reservada para o experimento, com iluminação difusa e sem qualquer ruído. Esta câmera está conectada à um microcomputador (Pentium 133, 16MB de memória RAM, 1,2 gB de disco rígido) com placa de captura de vídeo (TARGA + Truevision, n 2D NTSC), monitor SVGA, teclado e mouse, além de cabos e conectores localizado fora da sala (Figura 6).

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

O programa permite ainda sobrepor a imagem da arena (captada pela câmera) com uma representação gráfica de zonas construídas virtualmente no computador – subdividindo a arena em três áreas concêntricas – periférica, intermediária e central (Figura 7).

As imagens capturadas foram digitalizadas e analisadas pelo software e os resultados foram exportados na forma de um arquivo “txt” (extensão de arquivo texto) aberto na planilha do programa Microsoft Excel[®] 7.0.

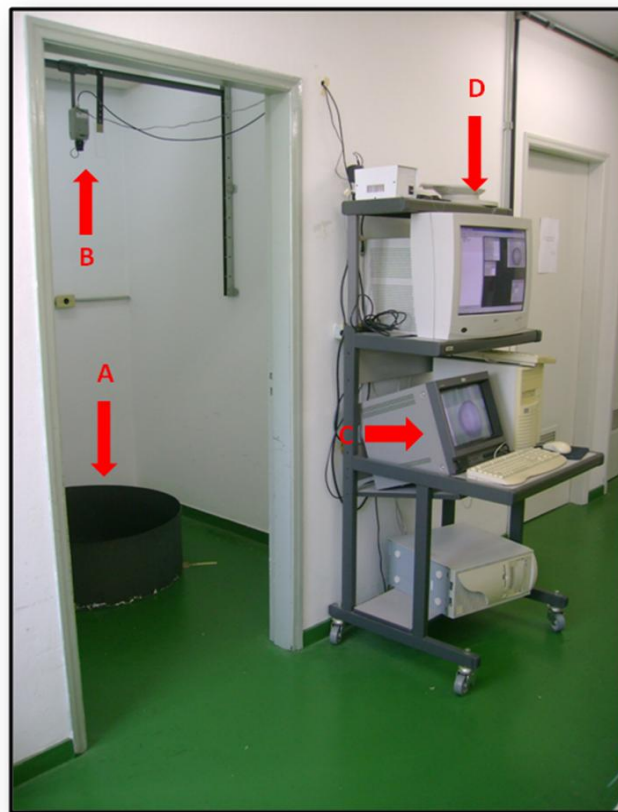


Figura 6- Sistema de observação computadorizada EthoVision®. A: arena de campo aberto; B: câmera para captação das imagens; C: monitor de vídeo ligado ao computador; D: imagem digitalizada representada em pixels. O mesmo programa rastreia e analisa o comportamento animal.

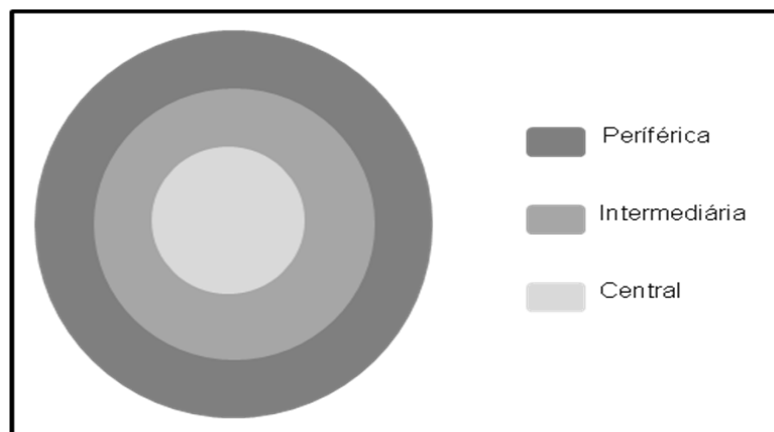


Figura 7- Representação das subdivisões virtuais feitas na arena de campo aberto pelo programa EthoVison®: Periférica, Intermediária e Central.

3.7 TESTE DE RECONHECIMENTO DE UM NOVO OBJETO

Justificativa: O modelo de reconhecimento de um novo objeto está sob a modulação do hipocampo, área tida como importante no estabelecimento de mapas espaciais (MANNNS, EICHENBAUM, 2009). Neste sentido, as alterações comportamentais em roedores relevantes para o autismo incluem deficiências na interação social, comportamento estereotipado e redução na função cognitiva (para revisão- veja DICICCO-BLOOM et al., 2006; MOLDIN et al., 2006; MOY et al., 2006). Adicionalmente Presti-Torres et al (2007) relacionam deficiências na interação social na infância e no reconhecimento de objetos com alterações hipocampais, além de sugerir que estas deficiências possam representar um modelo de autismo. Portanto, este trabalho investigou os possíveis efeitos da administração prenatal de LPS no modelo de reconhecimento de novos objetos com este foco.

Método: Neste experimento, os animais controle (n= 9) e os animais tratados pré-natalmente com LPS (n=9), no DPN 70, passaram por um procedimento de reconhecimento de objetos. O aparato utilizado para este experimento foi um campo aberto que consiste em uma arena redonda de madeira pintada de preto com 40 centímetros de diâmetro e 25,5 centímetros de altura. Os experimentos foram realizados em uma sala isolada de ruídos e registrados por uma câmera de vídeo localizado acima da arena (Figura 8) permitindo analisar o tempo de exploração dos objetos sem a presença do experimentador dentro da sala.

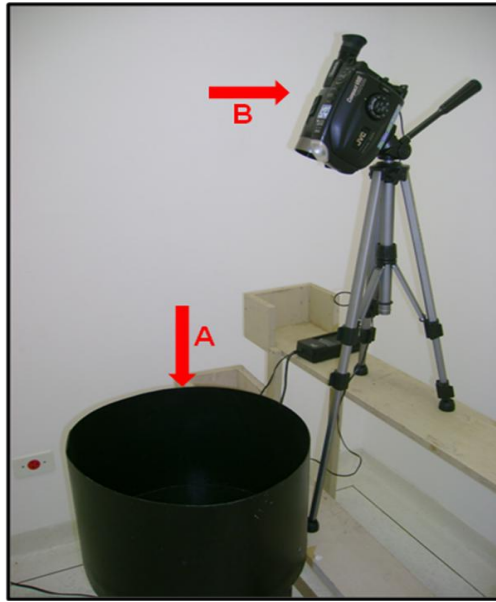


Figura 8- Esquema de campo aberto utilizado com a câmera para captação das imagens.

Os objetos utilizados para o reconhecimento foram dois dados idênticos (objeto A) e um cone de plástico pequeno (objeto B). O material dos objetos utilizados não poderia ser reconhecido por vias olfatórias e sua forma não apresenta significância no comportamento dos animais (GARCIA-CAPDIVILA, et al., 2009). Esses objetos (Figura 9), após cada tentativa, foram imersos no álcool 5% para eliminar pistas olfatórias, assim como o campo aberto foi higienizado com o mesmo álcool (DODART; MATHIS; UNGERER, 1997). Outro cuidado foi colocar os objetos exatamente no mesmo lugar e os dados virados sempre da mesma forma.

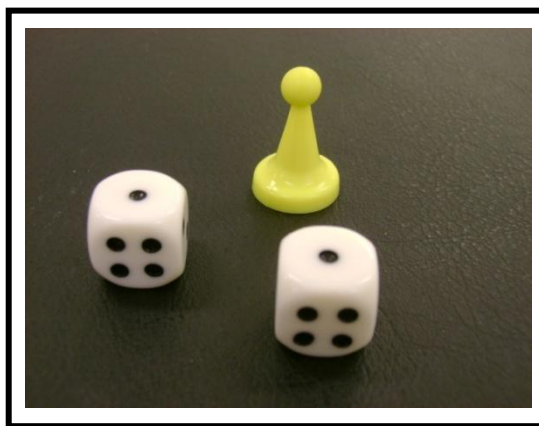


Figura 9- Objetos utilizados para o reconhecimento

Inicialmente os animais foram expostos à arena sem a presença de qualquer objeto, para adaptação ao ambiente, durante três dias consecutivos por um período de 30 minutos diários. No quarto dia iniciaram-se os testes de reconhecimento, em que os animais foram colocados no campo aberto com a presença dos objetos A (objetos idênticos), por um período de 5 minutos (habituação). Após a habituação passaram por um período de descanso de 10 minutos na gaiola de origem e, em seguida foram, colocados novamente na arena para a avaliação da memória de reconhecimento. Na avaliação do reconhecimento, um dos objetos A foi substituído por um objeto B e os animais ficaram por mais 5 minutos expostos aos dois objetos.

Foram calculados os tempos de exploração dos objetos A na habituação (Tempo A1 e A2), o tempo de exploração do objeto A na avaliação do reconhecimento (Tempo A3), do objeto B (Tempo B) e o índice de discriminação dos objetos (ID) obtido através da relação (GARCIA-CAPDIVILA, et al., 2009):

$$\frac{\text{Tempo B} - \text{Tempo A3} \times 100}{\text{Tempo A3} + \text{Tempo B}}$$

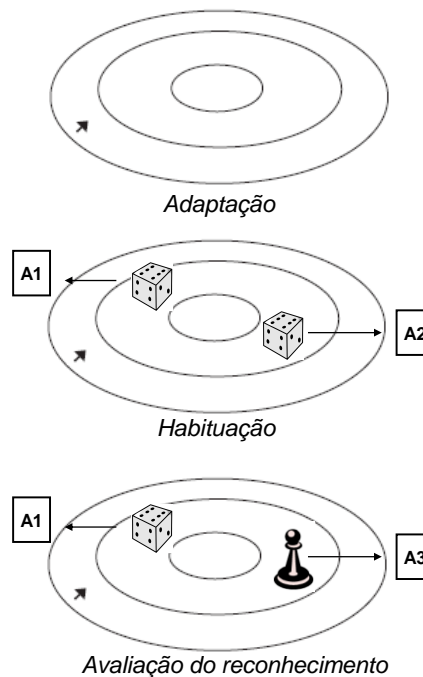


Figura 10- Esquema do teste de reconhecimento de objeto (adaptado de VENTURA, 2004).

3.8 CONDICIONAMENTO OPERANTE DE RATOS

Justificativa: Dentro da perspectiva do presente trabalho procurou-se enfatizar outro aspecto relacionado ao autismo: “Padrões restritivos repetitivos e estereotipados de comportamento, interesses e atividades” incluindo preocupações abrangentes, intensas e rígidas com padrões estereotipados e restritos de interesse; adesão inflexível a rotinas ou rituais não-funcionais específicos; maneirismos estereotipados e repetitivos (KLIN, 2006). Assim, a prole das ratas expostas ao LPS no DG 9,5 foi treinada em esquema de condicionamento operante com reforço na presença de luz até o aprendizado estar estabelecido. Nesse momento, inverteu-se o estímulo para o reforço, ou seja, este somente foi liberado na ausência de luz.

Método: Um filhote de cada ninhada (5 para o grupo controle e 5 para o grupo experimental) foi submetido à avaliação da aprendizagem na caixa de condicionamento no DPN 90. O aparato da Funbec[®] consiste em uma caixa (26 x 22,5 x 31 cm) de laterais de alumínio, com o teto e a frente de acrílico transparente, piso em barras de aço, uma barra em aço do lado direito para acionar o bebedouro (a 7cm do piso), uma luminária com luz de 2 leds de alta potência, no topo da caixa do lado direito em suporte fixo. A caixa apresenta um controle manual externo com um contador de pressões da barra, um controle com um interruptor que aciona o bebedouro com a pressão da barra ou manualmente e um controle de intensidade de luz como ilustra a figura 11 e 12.

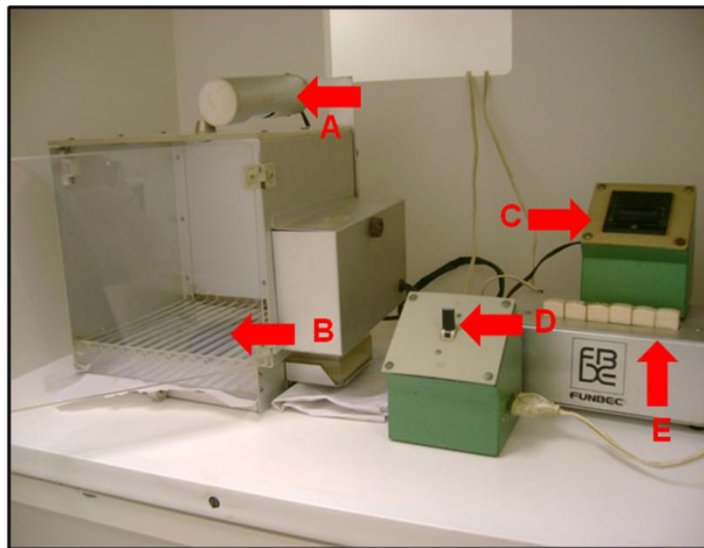


Figura 11- Caixa de condicionamento operante. A: Luz superior; B: Piso com barras de aço; C: Contador de pressões na barra; D: Controle manual do bebedouro; E: Controle de intensidade da luz.

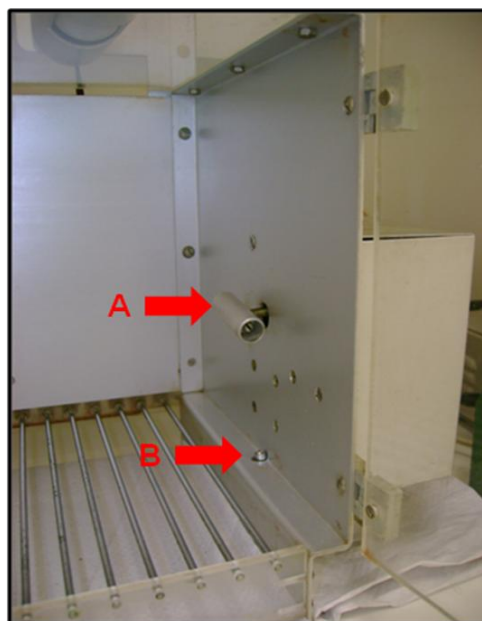


Figura 12- Parte interna da caixa de condicionamento operante. A: Barra de pressão; B: Bebedouro

O experimento consistiu em condicionar os animais controle e experimental à resposta de pressão na barra da caixa de condicionamento, na discriminação e

reversão do aprendizado. Para a aquisição do condicionamento os animais foram submetidos a uma sequência de procedimentos: modelagem, reforço contínuo da resposta de pressão (CRF), discriminação e reversão (CAVALCANTI, 2007). Antes dos animais serem submetidos ao experimento foram privados de água por 18 horas.

Inicialmente os animais passaram pela etapa de modelagem que consistiu em treinar os animais para a pressão na barra. Todos os comportamentos apresentados pelos animais voltados para a barra resultavam no acionamento do bebedouro pelo experimentador, acompanhado do “click” característico do mecanismo da barra em funcionamento. O objetivo foi aproximar o animal do bebedouro quando ouvia o ruído de funcionamento deste, com a intenção de associar o som do bebedouro com a presença da água.

Para encerrar a modelagem foi considerada a emissão de dez respostas consecutivas de pressão à barra, com uma ou ambas as patas dianteiras. Ocorrendo isto a chave de comando da caixa foi deixada no automático para que as respostas de pressão à barra passassem a ser reforçadas automaticamente. Logo após a modelagem ter sido finalizada, deu-se início ao reforço contínuo da resposta de pressão à barra (CRF). O efeito do CRF é fortalecer a resposta de pressão à barra, e mantê-la em alta frequência no repertório do comportamento animal. Nesta etapa foi registrada a frequência de respostas durante 30 minutos sendo que toda resposta de pressão foi reforçada pela apresentação imediata de uma gota de água.

Durante as etapas de modelagem e CRF, a luz foi mantida acesa em 100% e ao final da etapa CRF foi realizada a etapa de discriminação, na qual os animais controle e experimental aprenderiam a discriminar, emitindo respostas no claro e no escuro total.

O animal foi colocado na caixa com luz acesa e observada por 1 minuto a frequência de resposta com a chave do bebedouro ligada, ou seja, respostas com reforço. Depois de 1 minuto a luz e a chave do bebedouro foram desligadas (respostas sem reforço) e os animais foram observados por mais 1 minuto. Este procedimento seguiu por 16 minutos por sessão.

Quando o animal atingiu 80% de respostas corretas, ou seja, pressionar a barra na presença de luz, procedeu-se ao teste de reversão que teve a intenção de mudar para o oposto do que foi ensinado. Nesta última etapa os animais foram observados durante 1 minuto no claro e 1 minuto no escuro por 16 minutos em cada

sessão, porém no claro, a chave do bebedouro permaneceu desligada enquanto que no escuro a chave foi acionada reforçando as respostas de pressão à barra.

Atingido 80% de respostas no escuro com reforço foi considerado aprendido e o aprendizado revertido.

3.9. TESTE DE PREFERÊNCIA OLFATÓRIA EM RATOS ADULTOS

Justificativa: Este experimento investigou se as alterações na preferência olfatória da prole masculina de ratas expostas ou não pré-natalmente ao LPS, observada na infância, se referiam a interferências na olfação e se as mesmas seriam persistentes.

Método: Um filhote de cada ninhada (8 para o grupo controle e 8 para o grupo experimental) foi submetido ao teste de preferência olfatória no DPN 90. Para tanto, empregou-se um aparato de acrílico transparente medindo 154 x 25 x 25 centímetros, a 5 centímetros da plataforma de apoio, com abertura superior. Este aparato foi separado e demarcado com as seguintes medidas, como ilustram as figuras 13 e 14.

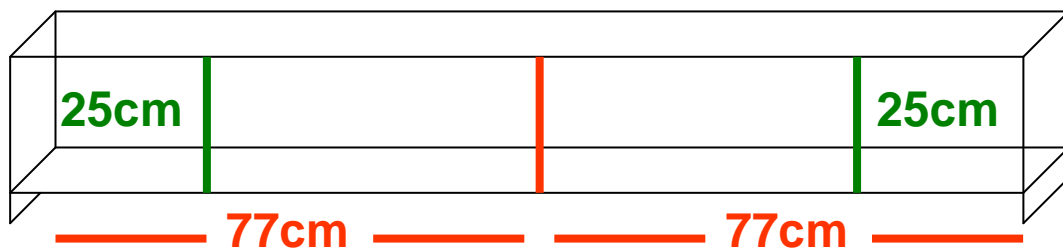


Figura 13 – Esquema das medidas do aparato para o experimento de preferência olfatória na idade adulta,



Figura 14 – Aparato utilizado para o experimento de preferência olfatória na idade adulta no DPN 90. O aparato foi dividido com marcações na parte externa da caixa de acrílico.

Em cada extremidade do aparato foi colocada maravalha limpa, preenchendo todo o espaço de 25 x 25 centímetros, sendo que no lado esquerdo deste, foi despejada uma amostra de 2 ml de sangue de rato Wistar, obtida no mesmo dia do experimento para manter-se fresca e, homogenizada com heparina para evitar a coagulação.

Imediatamente após a preparação do aparato, o animal foi colocado na linha média demarcada para o início do experimento. Cada animal permaneceu no aparato por dois minutos enquanto seu comportamento foi registrado por uma câmera de vídeo para avaliação. Após os dois minutos, os animais foram retirados e colocados de volta na mesma gaiola de origem.

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

Os parâmetros avaliados foram: tempo em que o animal permaneceu em cada lado do aparato, especificando o tempo em que permaneceu em cima das maravalhas (com sangue e limpa), nos corredores centrais e o primeiro lado a que o animal se dirigiu.

3.10. TESTE EM LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Justificativa: Este experimento foi planejado e executado uma vez que os ratos tratados pré-natalmente com LPS apresentaram respostas exacerbadas ao ruído da barra no teste de condicionamento operante fato que poderia indicar aumento de ansiedade.

Método: O estudo dos níveis de ansiedade foi realizado no labirinto em cruz elevado como descrito por Pellow et al (1985) no DPN 90. O teste consiste em colocar o animal em um labirinto formado por dois braços abertos protegidos por uma borda (50 x 10 x 0,5 cm) cruzados por dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) e elevado a 50 cm do piso (Figura 15).

A avaliação do comportamento nesse labirinto foi feita colocando-se cada animal, individualmente, no centro do aparelho, com a cabeça voltada para um dos braços fechados. Foi considerada como “entrada” em um dos braços, ou permanência nos braços, o ato de o animal colocar as quatro patas dentro de cada área do aparelho. Cada animal foi observado por 5 minutos, através do sistema de observação indireta EthoVision[®], conforme descrito em 3.6.1.

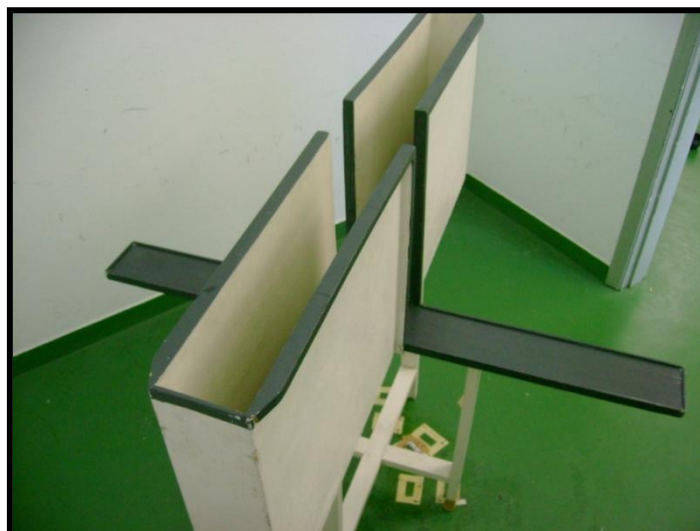


Figura 15- Labirinto em cruz elevado

Como indicativo da avaliação do comportamento foram registrados os seguintes parâmetros:

- **Número de entradas nos braços abertos (EA):** corresponde ao ato de o animal entrar nos braços abertos com as quatro patas;
- **Número de entradas nos braços fechados (EF):** corresponde ao ato de o animal entrar nos braços fechados com as quatro patas;
- **Tempo de permanência nos braços abertos (TA):** corresponde ao tempo de permanência neste braço, em segundos;
- **Tempo de permanência nos braços fechados (TF):** corresponde ao tempo de permanência neste braço, em segundos.

Assim como na avaliação da atividade geral no campo aberto, outros parâmetros foram registrados e avaliados: velocidade média, frequência e duração da imobilidade, tempo e frequência de auto-limpeza, duração e frequência de levantar.

3.11 DOSAGEM DE NEUROTRANSMISSORES

Justificativa: Os níveis de neurotransmissores centrais foram avaliados no hipocampo e no bulbo olfatório pois estas áreas estão relacionadas com alguns dos modelos comportamentais estudados nesta dissertação.

Método: O estudo da neuroquímica foi realizado com o fim da determinação das concentrações de neurotransmissores e de seus metabólitos no cérebro dos animais. Para tal, duas estruturas do encéfalo foram colhidas – o hipocampo e o bulbo olfatório no DPN 90 – e preparadas para posterior análise por sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O método foi previamente descrito em nossos laboratórios (FELICIO et al., 1996), como segue.

3.11.1 Coleta dos tecidos e preparo das amostras

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

Cada estrutura retirada foi então pesada em balança analítica, acondicionada em *ependorf* e estocada em freezer a -80°C para posterior homogeneização por um período de 20 dias. Estes procedimentos de coleta duraram no máximo 3 minutos por animal.

As estruturas retiradas do encéfalo do animal foram homogeneizadas com o auxílio de uma caneta sonicadora de alta frequência na proporção de 15 vezes o seu peso com solução diluente gelada de ácido perclórico (ClHO₄) 0,1 M (Merk®) contendo 0,02 % de metabissulfito de sódio (Na₂S₂O₅), EDTA dissódico (ácido dissódico etilenodiaminotetracético) e uma concentração conhecida de DHBA (ácido 3,4-dihidroxibenzilamina), utilizado como padrão interno para as dosagens de

monoaminas. O DHBA foi escolhido como padrão interno por ter as mesmas características físico-químicas que as monoaminas dosadas.

Os homogenatos foram deixados para pernoitar em refrigerador (0°C) com a finalidade de se obter uma boa precipitação das proteínas e ácidos nucléicos, e conseqüentemente melhor purificação das amostras. Após esta etapa, o material foi centrifugado a 5.590g por um período de 30 minutos (centrífuga Harrier 18/80 MSE da Sanyo® - refrigerada a 4°C).

Logo em seguida o sobrenadante foi retirado, acondicionado em *ependorf* e estocado em freezer a -80°C para ser utilizado na quantificação bioquímica no HPLC após 30 dias.

3.11.2 Aparelho

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

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

3.11.3 Preparo das soluções

A fase móvel, ou seja, o meio de arraste neste tipo de cromatografia era constituída de: 4,20 g/l de ácido cítrico, 7,16 g/l de fosfato de sódio dibásico (NaH₂PO₄), 556,0 mg/l de ácido heptanossulfônico (HSA), 40,0 mg/l de EDTA e

80,0 ml/l de metanol absoluto. O pH desta solução foi ajustado para 3,0 com auxílio do ácido ortofosfórico (H₃PO₄).

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

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

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

Segundo a técnica cromatográfica, as substâncias foram reconhecidas a partir do seu tempo de retenção na coluna cromatográfica, comparando-as com os padrões.

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

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

3.11.4 Calibração

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

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

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

3.11.5 Cálculo das concentrações dos neurotransmissores e seus metabólitos

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

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

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

Para todas as dosagens foram estabelecidas curvas de calibração tendo sido calculados os coeficientes de correlação linear sendo considerados adequados valores superiores a 0,9.

Para o estabelecimento da precisão intra-ensaio do método cromatográfico, foram calculados os coeficientes de variação das diferentes concentrações dos neurotransmissores analisados e foram considerados adequados valores inferiores a 15%.

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

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística inicialmente verificou-se a normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov e Smirnov. Os dados paramétricos foram analisados pelo teste *t* de Student e os dados não paramétricos foram analisados pelo teste *U* de Mann-Whitney.

Foram utilizados os *softwares* GraphPad InStat versão 3.01[®] e SigmaStat versão 3.2[®] e o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado suficiente para mostrar diferenças significativas em todos os dados analisados.

4 RESULTADOS

4.1. COMPORTAMENTO MATERNAL DE RATAS LACTANTES ADMINISTRADAS COM 100µg/Kg DE LPS NO DG 9,5.

A tabela 1 mostra e a figura 16 ilustra a latência para buscar os 8 filhotes durante a avaliação do comportamento maternal das ratas lactantes tratadas pré-natalmente com LPS ou salina. Os resultados mostram que as ratas tratadas com LPS apresentaram menor latência na busca do primeiro filhote com relação às ratas não tratadas, não apresentando alterações na busca dos demais filhotes. A tabela 2 mostra e a figura 17 ilustra a latência para agrupamento dos filhotes, de permanência da rata sobre a ninhada em posição adequada para amamentação (CROUCH) e do comportamento maternal total. A análise estatística não mostrou diferenças entre as ratas tratadas ou não com LPS.

Com relação ao comportamento maternal total a tabela 3 mostra que somente 1 animal em cada grupo não apresentou este comportamento aos 45 e 60 minutos e também a construção do ninho na caixa moradia antes do experimento. Todas as caixas apresentaram a formação de ninho pelas ratas.

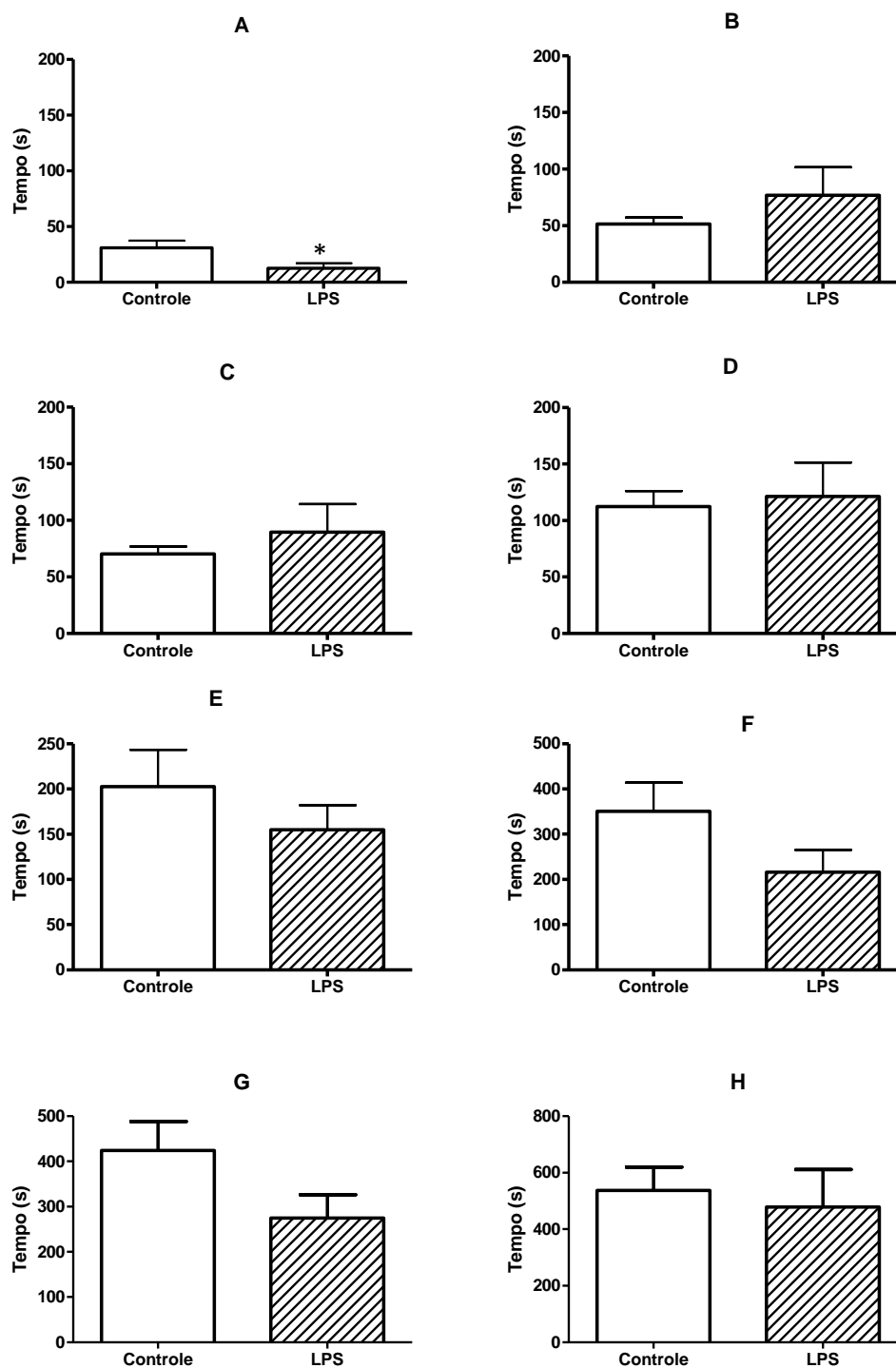


Figura 16- Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 μ g/kg) no DG 9,5 sobre o comportamento materno de recolhimento dos filhotes de ratas. (A) Recolhimento do 1^o filhote; (B) Recolhimento do 2^o filhote; (C) Recolhimento do 3^o filhote; (D) Recolhimento do 4^o filhote; (E) Recolhimento do 5^o filhote; (F) Recolhimento do 6^o filhote; (G) Recolhimento do 7^o filhote; (H) Recolhimento do 8^o filhote. * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle (Teste t de Student). Os valores são representados pela média e erro padrão. $n=8$

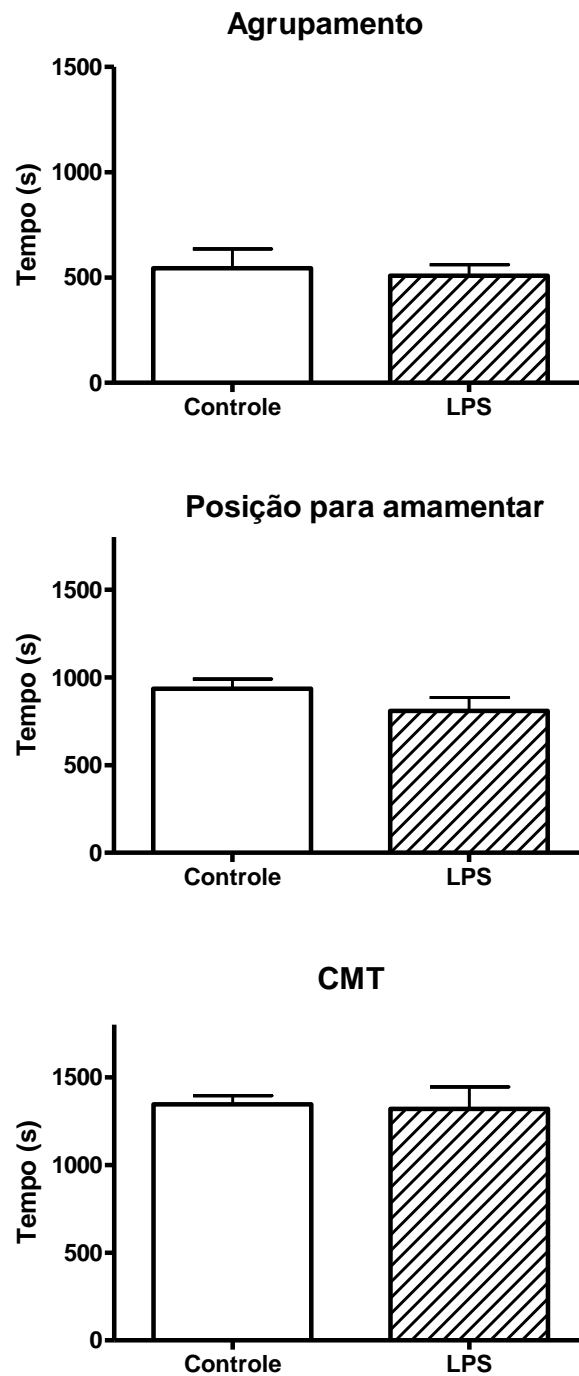


Figura 17- Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 μ g/kg) no DG 9,5 sobre o comportamento maternal de ratas. (CMT – Comportamento Maternal Total) * $p < 0,05$, comparado com o grupo controle (Teste t de Student). Os valores são representados pela média e erro padrão. $n=8$

Tabela 1- Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 µg/Kg) no DG 9,5 na latência (segundos) de recolhimento dos filhotes de ratas. Os valores são representados pela média e erro padrão. n=8.

Parâmetros	Grupos		
	Controle	LPS	p
Recolhimento do filhote 1	30,88 ± 6,60	12,75 ± 4,34 *	0,0377
Recolhimento do filhote 2	51,38 ± 51,38	76,75 ± 76,75	0,3355
Recolhimento do filhote 3	70,25 ± 6,55	89,63 ± 24,55	0,4584
Recolhimento do filhote 4	112,38 ± 13,68	121,25 ± 30,23	0,7930
Recolhimento do filhote 5	202,50 ± 40,88	155,00 ± 27,28	0,3502
Recolhimento do filhote 6	350,63 ± 63,47	216,00 ± 49,36	0,1162
Recolhimento do filhote 7	424,13 ± 64,07	274,75 ± 51,80	0,0913
Recolhimento do filhote 8	536,88 ± 82,80	478,25 ± 133,0	0,7139

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

Tabela 2- Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 µg/Kg) no DG 9,5 na latência em segundos de agrupamento dos filhotes, permanência da rata sobre a ninhada em posição adequada para amamentação e do comportamento maternal total de ratas. Teste *t* de Student. Os valores são representados pela média e erro padrão. n=8.

Parâmetros	Grupos		
	Controle	LPS	p
Agrupamento	544,38 ± 90,98	509,75 ± 51,11	0,7450
Posição para amamentação	936,50 ± 53,95	809,38 ± 76,13	0,1946
Comportamento maternal total	1346,88 ± 48,88	1320,13 ± 125,00	0,8449

Tabela 3- Avaliação do comportamento maternal total das ratas observado aos 45 e 60 minutos e a presença de ninho na caixa moradia antes da separação. n=8.

Parâmetros	Grupos	
	Controle	LPS
Presença de ninho	8/8	7/8
45 minutos	7/8	7/8
60 minutos	7/8	7/8

4.2 PREFERÊNCIA OLFATÓRIA DA PROLE MASCULINA DE RATOS NO DPN 7 CUJAS MÃES RECEBERAM NO GD 9,5, 100µg/Kg DE LPS

A tabela 4 mostra e a figura 18 ilustra a avaliação da preferência olfatória da prole masculina de ratas expostas ou não ao LPS no DG 9,5. Os animais tratados permaneceram menos tempo no lado da maravalha do ninho em relação aqueles do grupo controle.

Como visto na tabela 4 e na figura 18, os animais tratados pré-natalmente com LPS, permaneceram menos tempo no lado da maravalha do ninho com relação ao grupo controle apenas nas tentativas 3 ($p= 0,0319$) e 4 ($p= 0,004$), nas tentativas 1 ($p= 0,0915$), 2 ($p=0,5937$) e 5 ($p= 0,1691$), o tempo dos animais tratados se mostrou inalterado em relação ao grupo controle.

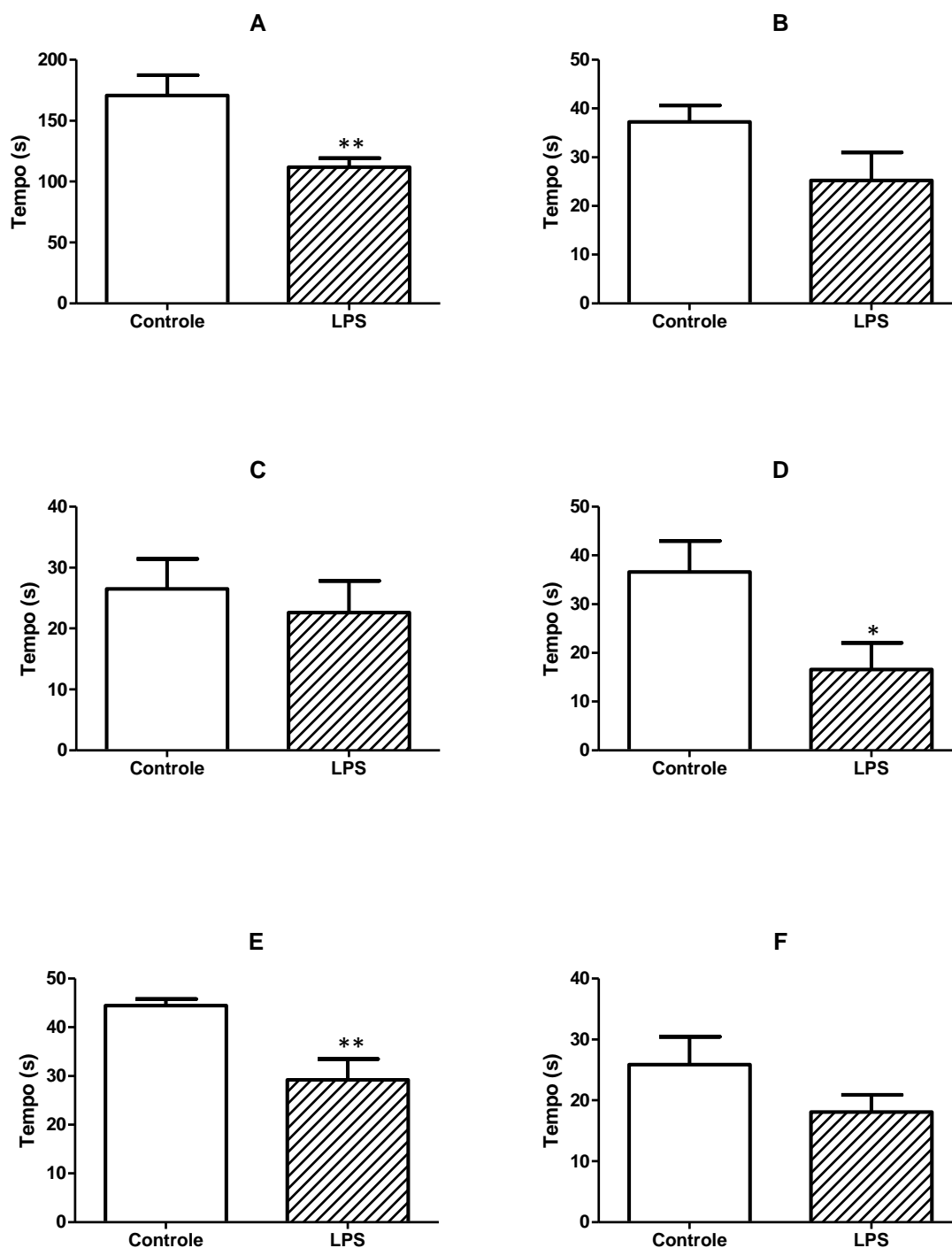


Figura 18- Efeitos da exposição pré-natal de LPS (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ no DG 9,5) no tempo total de permanência e o tempo de permanência nas 5 tentativas no lado da maravalha do ninho da prole masculina de ratos observadas no DPN 7. (A) Tempo total na maravalha do ninho; (B) 1^a tentativa; (C) 2^a tentativa; (D) 3^a tentativa; (E) 4^a tentativa; (F) 5^a tentativa. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, comparado com o grupo controle (Teste t de Student). Os valores são representados como média e erro padrão. $n=8$

Tabela 4- Efeitos da exposição pré-natal de LPS (100 µg/Kg no DG 9,5) na preferência olfatória na prole masculina de ratas observadas no DPN 7. *p<0,05 e ** p<0,01, comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student). Os valores são representados como média e erro padrão. n=8

Parâmetros com relação à permanência no lado da maravalha do ninho	Grupos		p
	Controle	LPS	
Tempo total	170,69 ± 16,74	111,74 ± 7,45**	0,0062
1 ^a . tentativa	37,28 ± 3,37	25,25 ± 5,72	0,0915
2 ^a . tentativa	26,51 ± 4,9	22,62 ± 5,18	0,5937
3 ^a . tentativa	36,58 ± 6,35	16,60 ± 5,47*	0,0319
4 ^a . tentativa	44,44 ± 1,34	29,18 ± 4,3**	0,0044
5 ^a . tentativa	25,87 ± 4,58	18,08 ± 2,81	0,1691

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

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

4.3.ATIVIDADE GERAL EM CAMPO ABERTO DA PROLE MASCULINA DE RATOS CUJAS MÃES RECEBERAM NO DG 9,5, 100µg/Kg DE LPS

A tabela 5 mostra e a figura 19 ilustra os resultados da atividade geral observada em campo aberto no DPN 60 da prole masculina de ratas que receberam no DG 9,5 100µg/Kg de LPS.

Em relação ao grupo controle, os animais tratados pré-natalmente com LPS não apresentaram alterações nos tempos das zonas periférica ($p= 0,2603$), intermediária ($p= 0,2445$) e central ($p= 0,6391$), nem mesmo no número de entradas nas zonas periférica ($p= 0,9999$), intermediária ($p= 0,8570$) e central ($p= 0,8808$). No entanto, esses animais apresentaram maior frequência de imobilidade na arena com relação aos animais não tratados ($p= 0,0326$).

A distância percorrida, a velocidade média, frequência e tempo de auto-limpeza, frequência e tempo de levantar e o tempo de imobilidade não foram alteradas comparando-se os animais tratados pré-natalmente ou não com LPS. Os valores estatísticos de p para cada um destes parâmetros encontram-se na tabela 5.

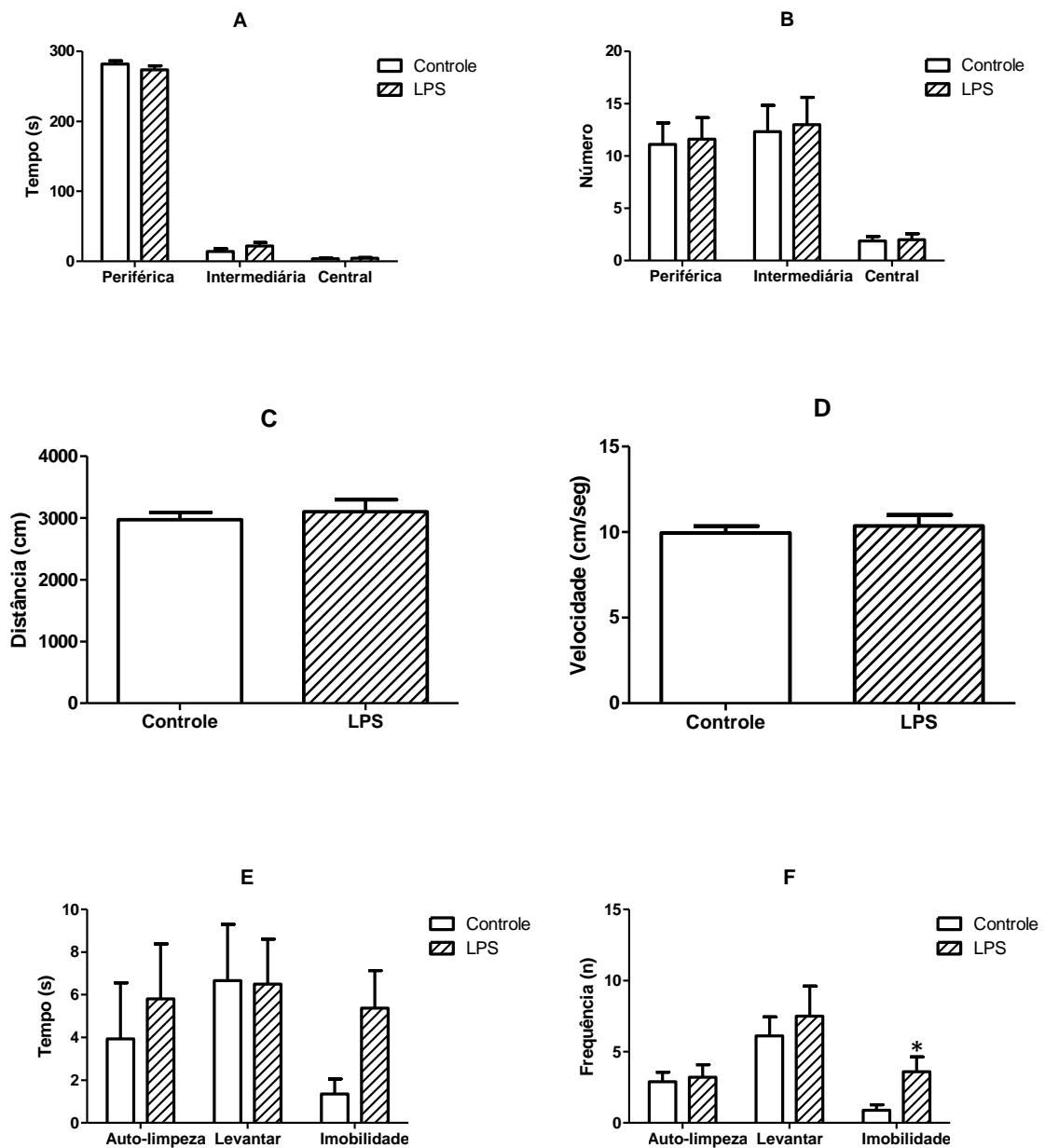


Figura 19- Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) no DG 9,5 na atividade geral observada em campo aberto da prole masculina de ratas. Os valores são representados pela média e erro padrão. (A) Tempo de permanência nas zonas; (B) Número de entradas nas zonas; (C) Distância percorrida; (D) Velocidade média; (E) Tempo de comportamentos; (F) Frequência de comportamentos. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Teste t de Student). $n = 9$ animais do grupo controle e $n = 10$ animais do grupo experimental

Tabela 5- Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no DG 9,5) na atividade geral observada em campo aberto da prole masculina de ratas observadas no DPN 60. Os valores são representados pela média e erro padrão. * p<0,05 comparado com o grupo controle (Teste *t* de Student) n=9 animais do grupo controle e n=10 animais do grupo experimental.

Parâmetros	Zona	Grupos		p
		Controle	LPS	
Tempo na zona (s)	Central	3,69 ± 1,04	4,43 ± 1,15	0,6391
Tempo na zona (s)	Intermediária	14,22 ± 3,94	21,98 ± 4,97	0,2445
Tempo na zona (s)	Periférica	282,1 ± 4,43	273,58 ± 5,66	0,2603
Número de entradas	Central	1,89 ± 0,42	2,00 ± 0,58	0,8808
Número de entradas	Intermediária	12,33 ± 2,51	13,00 ± 2,61	0,8570
Número de entradas	Periférica	11,11 ± 2,07	11,60 ± 2,06	0,9999
Distância percorrida (cm)	Arena	2974 ± 119,1	3100 ± 196,5	0,6126
Velocidade média (cm/seg)	Arena	9,94 ± 0,40	10,35 ± 0,66	0,6073
Frequência de auto-limpeza	Arena	2,89 ± 0,68	3,20 ± 0,89	0,7881
Tempo de auto-limpeza (s)	Arena	3,93 ± 2,63	5,80 ± 2,59	0,6191
Frequência de levantar	Arena	6,11 ± 1,34	7,50 ± 2,12	0,5991
Tempo de levantar (s)	Arena	6,67 ± 2,63	6,50 ± 2,11	0,9610
Frequência de imobilidade	Arena	0,89 ± 0,39	3,60 ± 1,05*	0,0326
Tempo de imobilidade (s)	Arena	1,35 ± 0,71	5,37 ± 1,77	0,0595

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

4.4 MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS DA PROLE MASCULINA DE RATOS CUJAS MÃES RECEBERAM NO DG 9,5, 100µg/Kg DE LPS

A tabela 6 mostra e a figura 20 ilustra os parâmetros analisados com relação à memória de reconhecimento de objetos no DPN 70 da prole masculina de ratas que receberam no DG 9,5 100µg/Kg de LPS.

A análise estatística não mostrou diferenças entre o grupo de animais controle com relação ao grupo de animais experimentais.

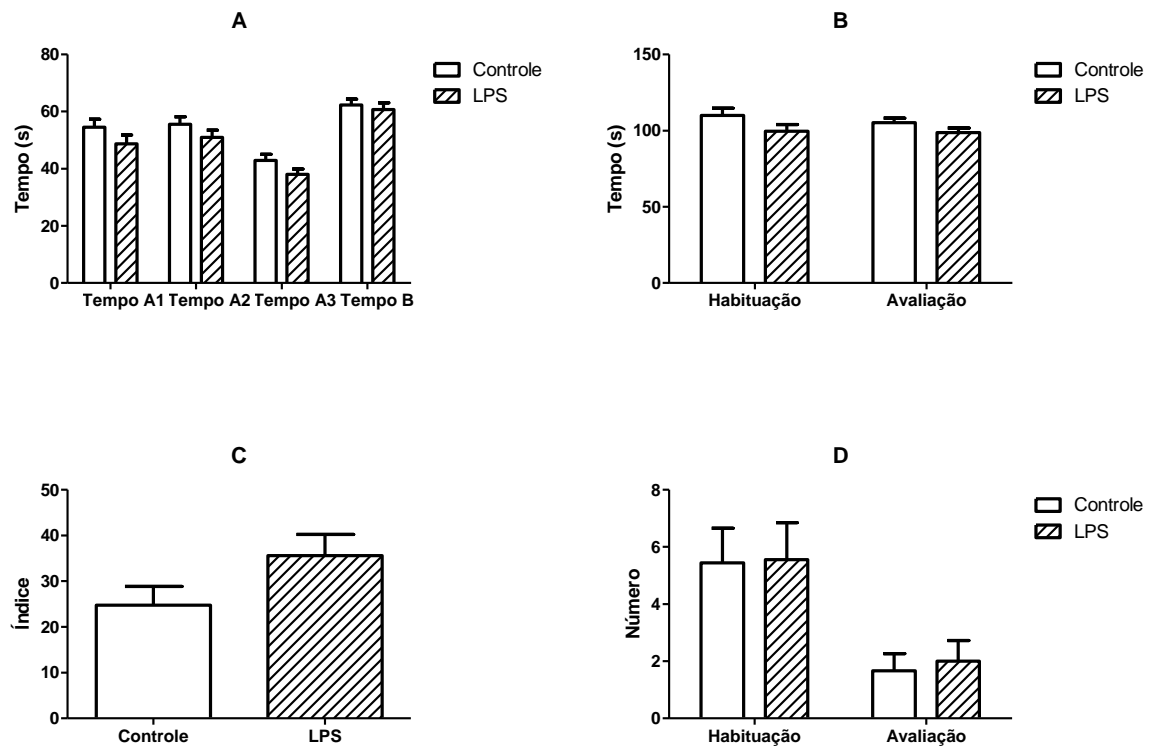


Figura 20- Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) no DG 9,5 na memória de reconhecimento de objetos da prole masculina de ratas. Os valores são representados pela média e erro padrão.(A) Tempo de exploração dos objetos; (B) Tempo total de exploração dos objetos; (C) Índice de discriminação;(D) Bolos fecais. (Teste *t* de Student). $n=9$

Tabela 6- Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 µg/kg) no DG 9,5 na memória de reconhecimento de objetos da prole masculina de ratas no DPN 70. Os valores são representados pela média e erro padrão. n=9

Parâmetros	Grupos		p
	Controle	LPS	
Tempo A1	54,50 ± 2,88	48,70 ± 3,12	0,1907
Tempo A2	55,58 ± 2,64	50,98 ± 2,53	0,2260
Tempo total da habituação	110,08 ± 4,61	99,68 ± 4,37	0,1212
Tempo A3	42,92 ± 2,13	38,03 ± 1,84	0,1010
Tempo B	62,39 ± 2,03	60,70 ± 2,42	0,5992
Tempo total da avaliação	105,31 ± 2,89	98,72 ± 3,05	0,1660
Índice de discriminação	24,78 ± 4,06	37,06 ± 4,61	0,0971
Bolos fecais habituação	5,44 ± 1,22	5,56 ± 1,29	0,9508
Bolos fecais avaliação	1,67 ± 0,6	2,00 ± 0,73	0,7283

4.5 .APRENDIZADO POR CONDICIONAMENTO DA PROLE MASCULINA DE RATOS CUJAS MÃES RECEBERAM NO DG 9,5, 100µg/Kg DE LPS

A tabela 7 mostra e a figura 21 a ilustra os parâmetros analisados com relação à aquisição da tarefa de pressionar a barra na presença de luz para obtenção da resposta de água no bebedouro.

Os animais tratados com LPS no período gestacional não apresentaram alterações com relação ao grupo não tratado na quantidade de sessões de modelagem e discriminação. No entanto, quando avaliada a reversão do aprendizado adquirido, os animais do grupo tratado realizaram a tarefa de modo mais rápido com relação ao grupo controle ($p= 0,0325$).

Na etapa de reforço contínuo da resposta de pressão na barra, os animais expostos ao LPS não mostraram alterações com relação ao grupo controle na quantidade de pressões na barra nesta etapa ($p= 0,1811$).

A figura 22 ilustra as sessões de aprendizado (discriminação e reversão) de cada um dos animais de acordo com as pressões na barra no período de luz e a curva com a média de pressões nos dois grupos analisados.

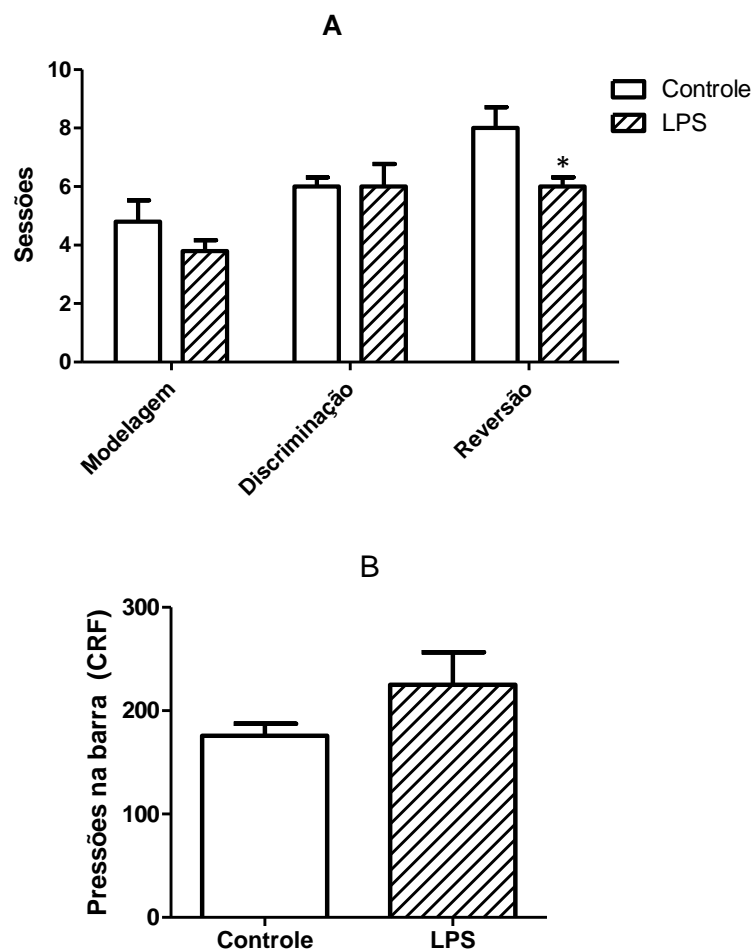


Figura 21- Efeitos administração pré-natal de LPS (100 µg/kg no DG 9,5) na aprendizagem por condicionamento de pressão na barra da prole masculina de ratas no DPN 90, nos parâmetros de modelagem, discriminação e reversão (A), e número de pressões na barra no período de luz (B). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Teste t de Student) com relação com grupo controle. Os valores são representados como média \pm desvio padrão. $n=9$ para animais do grupo controle e $n=10$ para animais do grupo experimental.

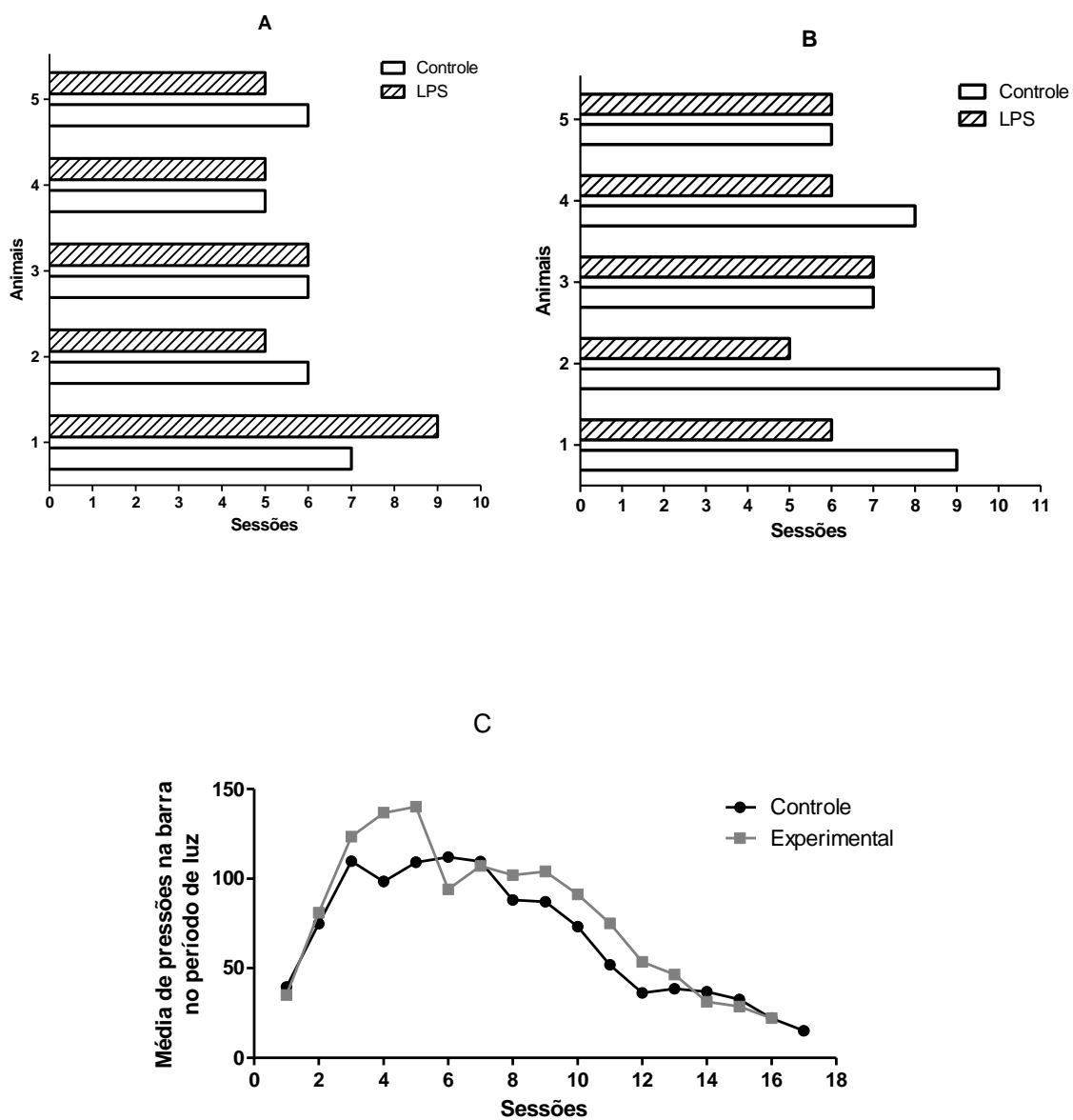


Figura 22- Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 μ g/kg no DG 9,5) na aprendizagem por condicionamento de pressão na barra da prole masculina de ratas no DPN 90. (A) Sessões de discriminação; (B) Sessões de reversão; (C) Curva média de aprendizagem dos grupos tratados e não tratados.

Tabela 7- Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 µg/kg) no DG 9,5 na aprendizagem por condicionamento de pressão na barra da prole masculina de ratas no DPN 90. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Teste t de Student). Os valores são representados pela média e erro padrão. $n=8$

Parâmetros	Grupos		p
	Controle	LPS	
Sessões de Modelagem	4,80 ± 0,73	3,80 ± 0,37	0,2598
Sessões de Discriminação	6,00 ± 0,32	6,00 ± 0,77	0,9999
Sessões de Reversão	8,00 ± 0,71	6,00 ± 0,32*	0,0325
Pressões no CRF	175,60 ± 11,81	225,00 ± 31,59	0,1811

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

4.6 PREFERÊNCIA OLFATÓRIA DA PROLE MASCULINA DE RATOS NO DPN 70 CUJAS MÃES RECEBERAM NO DG 9,5, 100µg/Kg DE LPS

A tabela 8 mostra e a figura 23 ilustra os parâmetros analisados da preferência olfatória na idade adulta de ratos. A análise estatística não indicou diferenças entre todos os parâmetros analisados dos animais do grupo experimental em relação aos do grupo controle.

A tabela 8 mostra e a figura 23 ilustra o tempo total de permanência na maravalha com sangue, o tempo na maravalha limpa, assim como o tempo no corredor da maravalha com sangue, o tempo no corredor da maravalha limpa, e a quantidade de bolos fecais.

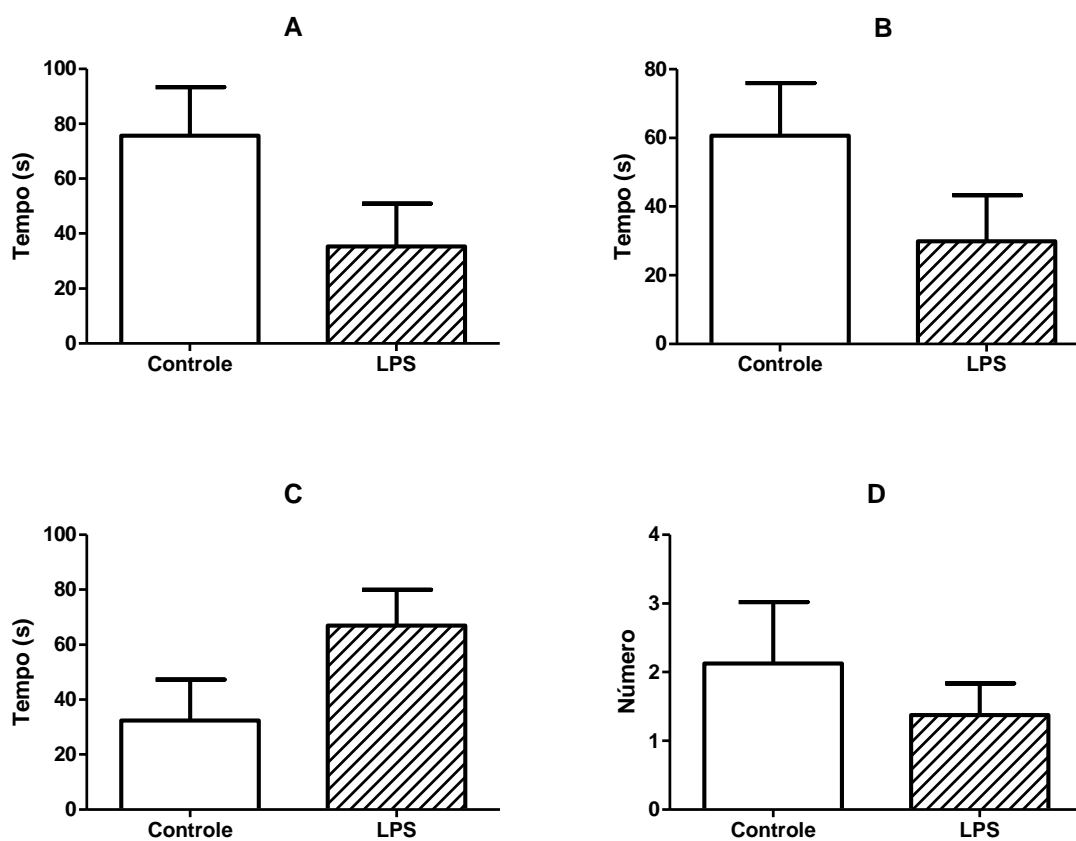


Figura 23- Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no DG 9,5) na preferência olfatória da prole masculina de ratas no DPN 70 (Teste *t* de Student). (A) Tempo total no lado da maravalha com sangue; (B) Tempo sobre a maravalha com sangue; (C) Tempo sobre a maravalha limpa; (D) Bolos fecais. Os valores são representados como média e erro padrão. $n=8$

Tabela 8- Efeitos da exposição pré-natal ao LPS (100 µg/kg no DG 9,5) na preferência olfatória da prole masculina de ratas no DPN 70. (Teste *t* de Student). Os valores são representados como média e erro padrão. n=8

Parâmetros	Grupos		P
	Controle	LPS	
Tempos total no lado da maravalha com sangue	75,63 ± 17,74	35,26 ± 15,65	0,1100
Tempos sobre maravalha com sangue	60,62 ± 15,35	29,89 ± 13,42	0,1539
Tempo sobre maravalha limpa	32,35 ± 14,91	66,94 ± 12,99	0,1021
Bolos fecais	2,1 ± 0,46	1,38 ± 0,89	0,4686

4.7. COMPORTAMENTO DA PROLE MASCULINA DE RATOS CUJAS MÃES RECEBERAM NO DG 9,5, 100 μ g/Kg DE LPS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

A tabela 9 mostra e a figura 24 ilustra os efeitos da administração de LPS (100 μ g/Kg) no DG 9,5 no comportamento dos animais no labirinto em cruz elevado. A análise estatística não mostrou nenhuma diferença nos comportamentos analisados dos animais do grupo controle com relação aos animais do grupo experimental.

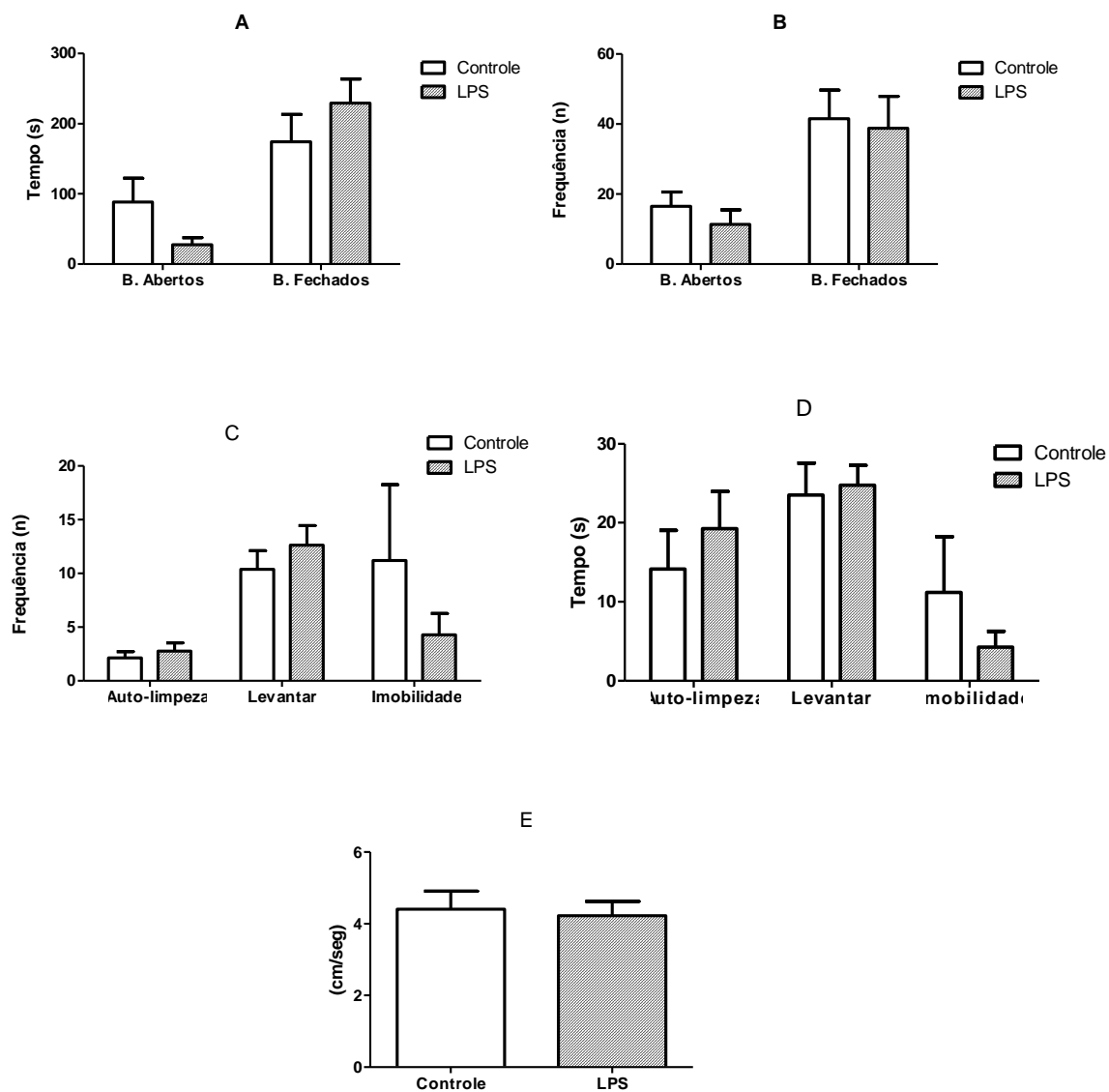


Figura 24 - Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 μ g/kg no DG 9,5) no labirinto em cruz elevado da prole masculina de ratas no DPN 90. (A) Tempo nos braços; (B) Frequência de entrada nos braços; (C) Frequência de comportamentos; (D) Tempo de comportamentos; (E) Velocidade média. (Teste *t* de Student) Os valores são representados pela média e erro padrão. n=8

Tabela 9 - Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 µg/kg no DG 9,5) no comportamento no labirinto em cruz elevado da prole masculina de ratas no DPN 90. (Teste *t* de Student) Os valores são representados pela média e erro padrão. n=8

Parâmetros	Grupos		P
	Controle	LPS	
Tempo nos braços abertos	88,60 ± 33,77	27,50 ± 10,10	0,1050
Tempo nos braços fechados	174,17 ± 38,90	229,34 ± 34,20	0,3052
Entradas nos braços abertos	16,50 ± 4,13	11,38 ± 4,11	0,3943
Entradas nos braços fechados	41,50 ± 8,15	38,75 ± 9,12	0,8254
Velocidade média (cm/seg)	4,41 ± 0,51	4,23 ± 0,4	0,7817
Frequência de imobilidade	1,75 ± 0,82	1,63 ± 0,63	0,9051
Tempo de imobilidade (s)	11,20 ± 7,06	4,27 ± 2,0	0,3933
Frequência de auto-limpeza	2,13 ± 0,58	2,75 ± 0,77	0,4622
Tempo de auto-limpeza (s)	14,15 ± 4,9	19,27 ± 4,68	0,5286
Frequência de levantar	10,38 ± 1,73	12,63 ± 1,82	0,3858
Tempo de levantar (s)	23,50 ± 4,07	24,77 ± 2,5	0,7945

4.8 NÍVEIS DE NEUROTRANSMISSORES E METABÓLITOS DA PROLE MASCULINA DE RATAS EXPOSTA OU NÃO PRÉ-NATALMENTE AO LPS NO BULBO OLFATÓRIO E NO HIPOCAMPO

A tabela 10 mostra e a figura 25 ilustra os níveis de neurotransmissores e respectivos metabólitos de dopamina, serotonina e noradrenalina no bulbo olfatório de ratos expostos ou não pré-natalmente ao LPS. Os resultados mostram redução nos níveis de dopamina nesta estrutura ($p < 0,0068$).

Os níveis dos neurotransmissores e seus metabólitos no hipocampo dos animais são mostrados na tabela 11 e ilustrados na figura 26. A análise estatística não mostrou diferenças entre os grupos nos níveis de dopamina, serotonina, noradrenalina e seus respectivos metabólitos.

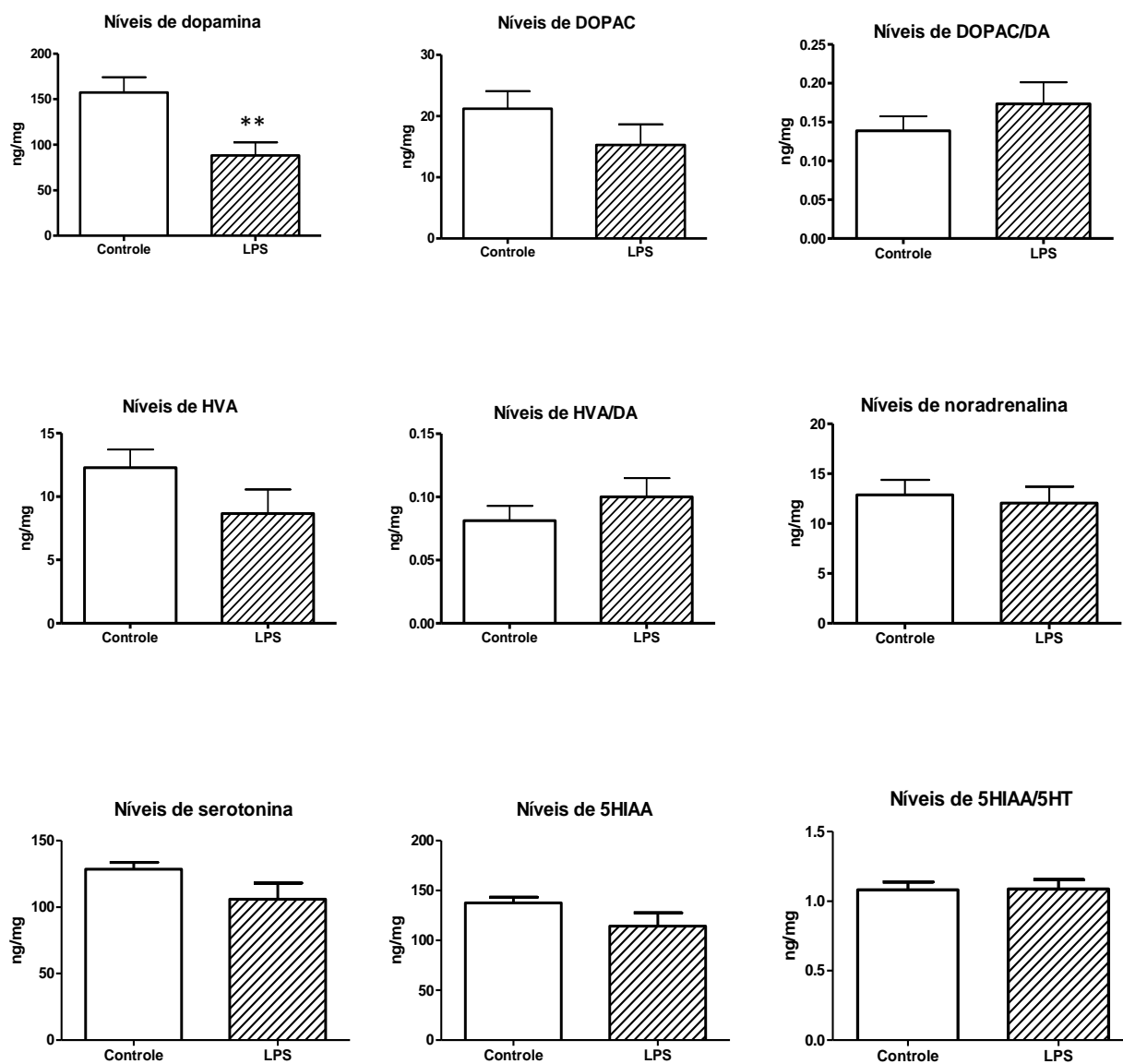


Figura 25- Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 μ g/kg no DG 9,5) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no bulbo olfatório da prole masculina de ratas. ** $p < 0,01$ comparado com o grupo controle (Teste t de Student) com relação com grupo controle Os valores são representados pela média e erro padrão.

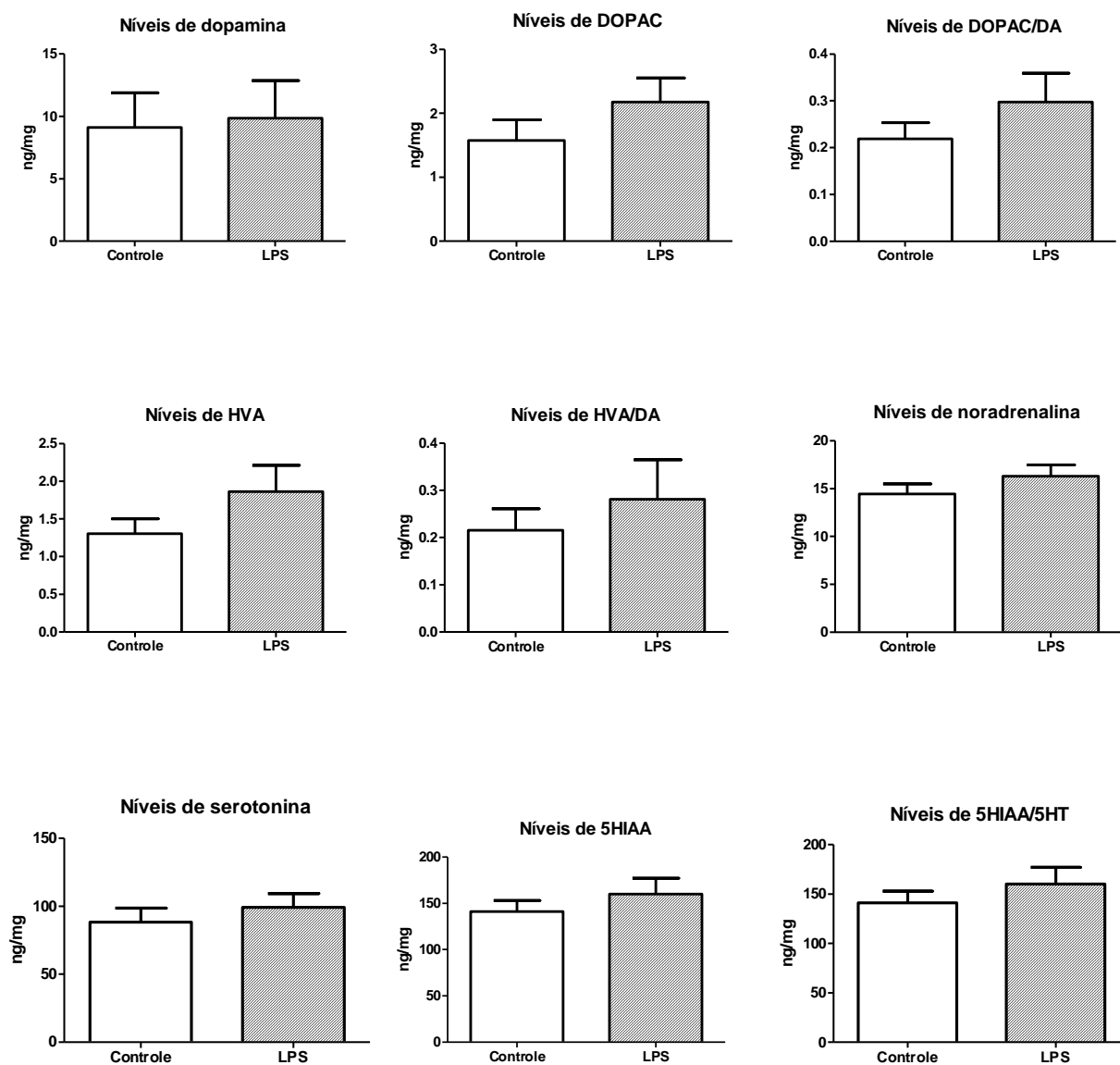


Figura 26- Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no DG 9,5) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no hipocampo da prole masculina de ratas. (Teste t de Student). Os valores são representados pela média e erro padrão. $n=9$

Tabela 10- Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 µg/kg no DG 9,5) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no bulbo olfatório da prole masculina de ratas. Os valores são representados pela média e erro padrão. n=8 animais do grupo controle e n=9 animais do grupo experimental

Parâmetros	Grupos		
	Controle	LPS	P
DA	157,2 ± 48,0	88,2 ± 42,9**	0,0068
DOPAC	21,2 ± 8,1	15,3 ± 10,2	0,2063
HVA	12,3 ± 4,1	8,6 ± 5,7	0,1551
DOPAC / DA	0,14 ± 0,5	0,17 ± 0,8	0,3323
HVA / DA	0,08 ± 0,03	0,10 ± 0,05	0,3450
5HT	128,6 ± 14,4	106,0 ± 36,4	0,1227
5HIAA	137,7 ± 16,3	114,4 ± 40,2	0,1480
5HIAA / 5HT	1,08 ± 0,16	1,09 ± 0,20	0,9320
NOR	12,9 ± 4,3	12,1 ± 4,9	0,7225

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

Tabela 11- Efeitos da administração pré-natal de LPS (100 µg/kg no DG 9,5) nos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no hipocampo da prole masculina de ratas. Os valores são representados pela média e erro padrão. n=9

Parâmetros	Grupos		
	Controle	LPS	P
DA	9,10 ± 8,35	9,85 ± 9,05	0,8575
DOPAC	1,58 ± 0,97	2,17 ± 1,13	0,2468
HVA	1,31 ± 0,60	1,86 ± 1,05	0,1815
DOPAC / DA	0,22 ± 0,10	0,30 ± 0,18	0,2804
HVA / DA	0,22 ± 0,14	0,28 ± 0,25	0,5020
5HT	88,36 ± 30,57	99,23 ± 30,32	0,4602
5HIAA	141,01 ± 36,38	160,12 ± 50,94	0,3734
5HIAA / 5HT	1,69 ± 0,42	1,68 ± 0,47	0,9623
NOR	14,44 ± 3,17	16,31 ± 3,53	0,2542

5. DISCUSSÃO

Kirsten (2008), analisando as alterações comportamentais e neuroquímicas na prole masculina de ratos expostas pré-natalmente ao LPS (100 µg/Kg) no DG 9,5, mostrou que animais expostos ao LPS apresentam comportamento doentio após a administração com diminuição da atividade geral no campo aberto nos parâmetros relacionados à locomoção, movimentos de levantar e auto-limpeza, diminuição na ingestão de alimentos nos três dias seguintes e aumento da temperatura corporal somente após 48 horas da administração. Esses animais apresentam prejuízos nos parâmetros reprodutivos, ganhando menos peso durante a gestação e dando a luz a um número menor de filhotes, sem apresentar interferências na duração da gestação e no peso total desta prole. Na prole masculina, as alterações mais relevantes foram a redução no comportamento de brincar na infância e na interação social na idade adulta em animais isolados, e nos níveis de dopamina e metabólitos estriatais. A atividade geral no DPN 21, exceto com relação a auto-limpeza, a catatonía e a estereotípia, não foram modificadas sendo que os mesmos resultados foram obtidos da análise dos demais neurotransmissores e metabólitos no estriado, hipotálamo e córtex frontal e na morfologia cerebral.

À luz do trabalho de Kirsten (2008), outros aspectos deste tratamento e desta administração foram avaliados neste trabalho com o objetivo de dar continuidade a esta investigação inicial. Como descrito nos resultados do presente trabalho, a dose de 100 µg/Kg de LPS administrada no DG 9,5 de ratas, provocou diversas alterações nestes animais e nos seus filhotes. Em relação ao grupo controle houve uma diminuição no tempo de recolhimento do primeiro filhote da ninhada durante a avaliação do comportamento maternal das ratas. Na prole masculina de ratos, verificou-se alterações na análise da preferência olfatória no DPN 7, apresentando uma diminuição no tempo total na maravalha do ninho materno, e redução no tempo na maravalha do ninho materno nas terceira e na quarta tentativas. Não foram notadas alterações na atividade geral desses filhotes analisadas no campo aberto e labirinto em cruz elevado, assim como alterações na memória de reconhecimento de objetos e na análise da preferência olfatória no DPN 90 desses animais. Com relação ao condicionamento operante dos animais analisado na caixa de Skinner, foram notadas alterações com relação ao grupo controle. Os animais do grupo

experimental reverteram a aprendizagem em menor tempo com relação àqueles do grupo controle. Na análise neuroquímica verificou-se redução nos níveis de dopamina no bulbo olfatório dos animais do grupo tratado, sendo que os demais neurotransmissores e seus metabólitos não apresentaram alterações.

Neste trabalho investigaram-se os aspectos sociais e de plasticidade envolvidos no desenvolvimento e na idade adulta na prole masculina de ratas expostas ao LPS pré-natalmente. Os aspectos investigados buscam compreender as possíveis causas das alterações apresentadas por estes animais analisando desde comportamentos maternos até níveis de neurotransmissores centrais na idade adulta.

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

O comportamento maternal é um comportamento complexo e instintivo com características específicas para cada espécie e que consiste em uma série de cuidados que as fêmeas maduras realizam em torno dos indivíduos imaturos para auxiliar na propagação de sua espécie sendo determinante no desenvolvimento neurológico (NUMAN, 1994; HABR, 2008).

Os cuidados maternos se expressam desde a preparação da mãe para o nascimento da prole e se mantém por todo o período de lactação dos filhotes. Esse comportamento vai se modificando de acordo com o tempo e crescimento dos filhotes. Durante este período o principal objetivo da fêmea é garantir a sobrevivência dela e dos seus filhotes (NUMAN, 1994; TEODOROV, 2008).

Os dados referentes à avaliação dos parâmetros do comportamento maternal mostraram que o tratamento pré-natal com LPS (100 µg/Kg) reduziu a latência de recolhimento do primeiro filhote com relação ao grupo controle. Para Champagne et al. (2007) essa diminuição na latência de recolhimento dos filhotes reflete a resposta às novas situações e a reatividade ao estresse. Essa habilidade das fêmeas é extremamente importante para que mesmo em situações de estresse consigam proteger seus filhotes.

Os resultados apresentados sugerem que a administração de LPS não interfere de modo importante no comportamento maternal das ratas, permitindo que as mesmas ofereçam aos seus filhotes os cuidados necessários para seu desenvolvimento, estando responsivas às alterações provocadas no ambiente. Proporcionam cuidado e proteção aos seus filhotes além de uma relação mãe-filhote adequada. Essa relação estável é crítica para o crescimento normal e desenvolvimento comportamental dos roedores (RAINEKI, et al., 2009).

A identificação da mãe é fundamental para a sobrevivência e desenvolvimento dos mamíferos. Os filhotes rapidamente aprendem a identificar, orientar e preferir o odor materno naturalmente, e em ratos as bases moleculares da aprendizagem olfatória na infância envolvem a ativação de neurônios do bulbo olfatório do filhote (RAINEKI, et al., 2009; ROTH e SULIVAN, 2005). Os resultados da preferência e reconhecimento do odor materno na infância mostraram que a prole masculina tratada pré-natalmente com o LPS apresentou prejuízo no comportamento. De fato, os animais tiveram redução no tempo total de permanência no lado da maravalha do ninho materno, fato que evidenciou esse prejuízo na identificação do odor materno. Ocorreu diminuição significativamente diferente em relação ao grupo controle na terceira e na quarta tentativa que, de acordo com os autores Raineiki et al., pode ocorrer devido à manipulação do experimentador e à exposição repetida à diferentes odores durante a realização do experimento.

O sistema olfatório dos mamíferos detecta e discrimina diferentes moléculas no ambiente e para muitos animais, como é o caso dos roedores, essa habilidade é crucial para sua sobrevivência (GUTHRIE; GALL, 2003). Para investigar se as alterações permaneceram na idade adulta foi realizado o teste de preferência olfatória no DPN 90. Nota-se então que nos parâmetros comportamentais não houveram diferenças com relação ao grupo controle. Esse resultado mostra que as alterações comportamentais no reconhecimento do odor materno, não permanecem na idade adulta dos animais quando testados com odor de sangue da mesma espécie. Para os roedores, o odor de sangue fresco da mesma espécie é um estímulo biologicamente relevante e aversivo (ZANGROSSI JUNIOR; FILE, 1992).

A investigação dos níveis de neurotransmissores no bulbo olfatório foi realizada com a intenção de investigar possíveis alterações centrais ao nível neuroquímico deste reconhecimento pois, existe uma representação dos odores reconhecidos no sistema nervoso central, especificamente no bulbo olfatório

(BENNETT e REED, 2004). Todos os estímulos olfatórios enviados ao sistema nervoso central estabelecem conexões no bulbo olfatório formando desta forma o mapa olfatório. Esse mapa, portanto, é formado de acordo com a quantidade de estímulos recebidos e processados por este sistema. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho notou-se um atraso na formação deste mapa olfatório dificultando desta forma o reconhecimento do odor materno que, apesar deste atraso, foi estabelecido durante seu desenvolvimento. De fato, não houveram alterações comportamentais no teste de preferência olfatória na idade adulta desses mesmos animais.

Apesar da ausência de alterações olfatórias na idade adulta, quando se analisaram os níveis de neurotransmissores nesta idade, notou-se redução nos níveis de dopamina no bulbo olfatório. O sistema dopaminérgico apresenta relação direta com a modulação da transmissão olfatória e é um dos mais abundantes neurotransmissores do bulbo olfatório (GÓMEZ, et al., 2007). Durante o desenvolvimento são necessários como já foi dito, estímulos olfatórios que irão formar o mapa olfatório e a rede neural dopaminérgica desta região anatômica. As privações ocorridas na infância podem resultar em diminuição das formações neurais e baixos níveis de dopamina neste sistema diminuindo sua função, interferindo no reconhecimento e discriminação olfatória (GÓMEZ, et al., 2006). Desta forma, parece que durante o desenvolvimento do animal houve compensação do déficit olfatório, porém as alterações no âmbito olfatório foram permanentes. Assim, é fato conhecido que filhotes de ratas gestantes tratadas com LPS no DG 10,5 apresentam uma permanente e significativa perda de neurônios dopaminérgicos (LING, et al., 2002), e que a dopamina é um neurotransmissor relacionado também com as funções cognitivas (DAW, KAKADE; DAYAN, 2002; IKEMOTO, 2007). Com isso pode-se concluir que o sistema nervoso central de roedores ao nascimento é marcado pelo não desenvolvimento do sistema sensorial e comportamental, porém por se tratar de um sistema extremamente plástico, desenvolve-se rapidamente atingindo a maturação semelhante ao adulto em poucas semanas (RUDY; CHEATLE, 1977). Conclui-se também que as infecções durante a gestação podem provocar alterações olfatórias permanentes no sistema nervoso central desses animais e que durante seu desenvolvimento podem utilizar outras estratégias para preservar as funções com alterações neurofisiológicas.

A atividade geral analisada no campo aberto da prole masculina de ratas tratadas pré-natalmente com LPS não se mostrou significativamente diferente daquela dos animais do grupo controle, incluindo aqui parâmetros exploratórios como distância percorrida e frequência de levantar. A avaliação destes dados em conjunto com aqueles obtidos nos experimentos desenvolvidos com a utilização do labirinto em cruz elevado, que também não se mostraram alterados, sugere que este tratamento não interfere na atividade locomotora desses animais. Esses resultados estão de acordo com Meyer et al. (2005) que da mesma forma ativaram o sistema imune de camundongos no DG 9 utilizando PolyI:C. Os autores mostraram que não houveram alterações nos padrões referentes à locomoção, assim como neste trabalho. Os autores afirmam que as pequenas alterações que podem estar presentes e não significativamente diferentes do grupo controle, podem estar relacionadas à alterações emocionais, mais especificamente à aspectos sociais (neofobia) (MEYER; FELDON; FATEMI, 2009) e não à aspectos motores.

Desta forma, a ausência de alterações na atividade geral em campo aberto e no labirinto em cruz elevado, bem como os resultados apresentados por Kirsten (2008) descartam a hipótese de que a administração pré-natal de LPS tenha modificado a atividade motora da prole masculina de ratos.

Com relação aos resultados relacionados aos aspectos cognitivos da prole masculina tratada com LPS, verificou-se que na memória de reconhecimento de objetos não houve alterações com relação ao grupo controle. Sabe-se que a aprendizagem e a memória espacial são processos imprescindíveis para a sobrevivência do organismo em diversas situações ambientais (VALADARES, 2006). A memória de reconhecimento de objetos é um teste comumente utilizado para análise da memória declarativa que pode ser adquirida com poucas exposições ao material a ser aprendido (WINTERS; SAKSIDA; BUSSEY, 2008). Para este comportamento é necessária a integridade do hipocampo, pois este é fundamental para o reconhecimento de novos objetos (WINTERS; SAKSIDA; BUSSEY, 2008) e também direcionamento espacial (KLEMENT; BLAHNA; NEKOVÁŘOVÁ, 2008).

Os dados referentes a ausência de alterações na memória de reconhecimento de objeto e nos níveis de neurotransmissores e seus metabolitos no hipocampo corroboram entre si. A formação hipocampal é uma estrutura que desempenha um importante papel na aprendizagem e na memória dos animais (VALADARES, 2006). De acordo com Winters, Saksida e Bussey (2008), o hipocampo é fundamental para

a associação entre uma informação espacial com um objeto específico. Inúmeras evidências experimentais sugerem que alterações nos sistemas neurotransmissores estejam envolvidas com déficits de memória e dentre eles estão as catecolaminas, a serotonina e a acetilcolina (SILVA, 1997).

Estudos mostram que prejuízos na memória espacial foram correlacionados com as alterações fisiológicas e neuroanatômicas da formação hipocampal. Resultados encontrados neste trabalho referentes à memória de reconhecimento de objetos e aos níveis de neurotransmissores no hipocampo, estão de acordo com esta correlação já que ambos não apresentaram alterações (VALADARES, 2006).

Valadares (2006) relata em seu trabalho que o hipocampo atua na aprendizagem e armazenamento da representação do ambiente espacial codificando-o em mapas cognitivos. Esse conceito refere-se ao estabelecimento de representações de pistas associadas a um determinado local e das posições relativas à este local, capacitando o organismo a utilizar esta informação. Esta teoria proposta por O'Keefe e Nadel em 1978, sustenta que os animais podem estabelecer relações espaciais entre os objetos no ambiente e relacionar esses eventos com o contexto espacial em que ocorrem.

Finalmente, quanto ao comportamento de aprendizagem na caixa de condicionamento operante, vale ressaltar que todos os animais, controles e tratados, aprenderam a pressionar a barra de respostas. A análise dos resultados demonstra que embora ambos os grupos tenham adquirido o aprendizado inicial no mesmo tempo, os animais do grupo experimental apresentaram desempenho superior ao grupo controle quando foi exigida a capacidade de reverter o aprendizado. Esse resultado não era esperado já que se sabe que a administração pré-natal de LPS é um dos modelos de estudo de doenças como a esquizofrenia e autismo as quais comprometem o aprendizado (ASDOWN et al., 2006; FORTIER et al. 2004; KIRSTEN, et al., 2010; MEYER; FELDON; FATEMI, 2009,).

Alguns estudos relatam que a capacidade de reversão do aprendizado adquirido está associada à áreas da córtex pré-frontal relacionadas com funções executivas e também à alterações no processo de discriminação (WINTER; DIECKMANN; SCHWABE, 2009) e está normalmente associada à distúrbios psiquiátricos (CHEN et al., 2009). As alterações segundo os autores, estão relacionadas principalmente às alterações dopaminérgicas da córtex pré frontal, o que de acordo com resultados obtidos por Kirsten (2008) não se aplica ao modelo

animal utilizado neste trabalho, considerando-se que o autor analisou aspectos morfológicos e níveis de neurotransmissores e seus metabólitos (dentre eles a dopamina) e não foram detectadas alterações. Com relação à hipótese de interferência no processo de discriminação citado pelos autores e, especificamente relacionada ao hipocampo como já citado nesta discussão, também não se aplica, pois não foram encontradas alterações na estrutura em questão bem como nos aspectos comportamentais relacionados à esta capacidade (memória de reconhecimento de objetos e etapa da discriminação no experimento de condicionamento operante na caixa de condicionamento) em que também não foram encontradas alterações com relação ao grupo controle.

A ação da dopamina está diretamente relacionada com as funções executivas do comportamento e sua alteração afeta funções como o planejamento da resposta, diminuição da capacidade de iniciar uma atividade, diminuição ou ausência de motivação, alteração no planejamento e na realização da sequência de atividades (PAPAZIAN et al., 2006, VERTE, et al., 2005), características essas que não foram notadas neste trabalho corroborando com o observado por Kirsten (2008). Como já citado, existem outros neurotransmissores e outras vias relacionadas às funções cognitivas. Dentre elas pode-se citar a acetilcolina que poderia justificar as alterações e respostas relacionadas à reversão do aprendizado. Neste sentido, Chen et al.(2009) após utilizar um inibidor de acetilcolinesterase aumentou o potencial de reversão de aprendizado em ratos sugerindo que a inibição de acetilcolinesterase central é um caminho terapêutico potencial para o tratamento de inflexibilidades comportamentais presentes em distúrbios psiquiátricos. Esta hipótese deverá, no futuro, ser melhor investigada.

Tomados em conjunto, a hipótese para explicar os resultados deste trabalho envolve redução clara na capacidade de discriminação olfatória da prole, expressa pela diminuição do comportamento de reconhecimento do odor materno na infância e pela redução dos níveis de dopamina no bulbo olfatório dos animais tratados e um aumento da capacidade de reversão de aprendizado mantendo as funções relacionadas à memória sem alterações.

Desde que as alterações de aprendizagem e memória são utilizadas em estudos de comprometimento provocados por infecções durante a gestação relacionadas ao autismo, e partindo dos resultados encontrados por Kirsten (2008),

pode-se especular que a exposição de ratas gestantes ao LPS no DG 9,5, poderia representar um modelo experimental para esta doença.

No autismo ocorre dificuldade de interação social, de compartilhar emoções e de demonstrar reciprocidade social ou emocional como foi demonstrado por Kirtsten.

O autismo é um transtorno com um modelo complexo pois para compreendê-lo é necessária uma análise em muitos níveis diferentes como do comportamento à cognição, da neurobiologia à genética (KLIN; MERCADANTE, 2006) e para que seu diagnóstico seja realizado são necessários seis critérios comportamentais um de cada um dos três agrupamentos de distúrbios na interação social, comunicação e padrões restritos do comportamento e interesses (KLIN, 2006). Desta forma muitos aspectos devem ser analisados de forma crítica principalmente os relacionados aos aspectos genéticos, pois sabe-se que esse é um dos fatores predominantes para esta doença (KLIN; MERCADANTE, 2006).

Dentre as características comportamentais mais marcantes encontra-se além dos aspectos sociais já citados e demonstrados por Kirsten, a observação de padrões repetitivos de comportamentos e dificuldades em flexibilizar comportamentos dificultando desta forma o processo de aprendizagem.

Portanto, os presentes resultados mostram que uma única dose de LPS no DG 9,5 de ratas, prejudica a discriminação olfatória na infância com alterações a longo prazo nos níveis de dopamina no bulbo olfatório e diminuição no tempo de reversão do aprendizado na idade adulta, sugerindo que a infecção e inflamação materna causam efeitos a longo prazo nos filhotes e que, apesar das características sociais, estes dados necessitam de mais investigações para que se possa afirmar que representam um modelo animal para o estudo do autismo, tendo em vista os aspectos relacionados a falta de flexibilidade para aprender que não foram observados neste trabalho. Em vista disso, outros experimentos estão sendo conduzidos em nossos laboratórios para uma melhor compreensão dos mecanismos que interferiram nos comportamentos e nos níveis neuroquímicos desses animais.

6. CONCLUSÕES

A administração de LPS (100 µg/Kg) no DG 9,5 causou a diminuição do tempo de recolhimento do primeiro filhote da ninhada no comportamento maternal.

Essa dose e tratamento também interferiram no comportamento dos filhotes desses animais, diminuindo o reconhecimento e busca desses animais pelo odor materno na infância, alteração esta que não foi observada na idade adulta, ainda que os níveis de dopamina no bulbo olfatório desses animais apresentou-se alterado. Reverteu a aprendizagem em menor tempo na idade adulta e não mostrou alterações no sistema motor já que a atividade geral no campo aberto e no labirinto em cruz elevado não foi alterada.

Dessa forma, infecções e inflamações maternas, por bactérias, durante a gestação, podem resultar em alterações cerebrais a longo prazo com prejuízos comportamentais nos seus filhotes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEN,U., DAHLBER,V., FREDHOLM,B.B., LAI, L.J., CHEN, Z., BJELKE,B., MRI evaluation and functional assessment of brain injury after hypoxic ischemia in neonatal mice. **Stroke**, v.33, p.1405-1410, 2002

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

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

AYRES, J. A., **Sensory integration and the child**. 25th anniversary edition, Los Angeles: Western Psychological Services, 2005

BENNETT, M. K., REED, R. R., Silence sets on a sensory map. **Neuron**, v. 42, p. 521-527, 2004

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

BORRELL, J.; VELA, J. M.; ARÉVALO-MARTIN,A.; MOLINA-HOLGADO, E.; GUAZA, C., Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats: implications for the etiopathogenesis of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 204-215, 2002.

BOUSLAMA, M., CHAUVIÈRE, L., FONTAINE, R. H., MTROT, B., GRESSENS, P., GALLEGU, J., Treatment-induced prevention of learning deficits in newborn mice with brain lesions. **Neuroscience**, v.141, p.795-801, 2006

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

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

CAVALCANTI, H. M., **Desenvolvimento de um modelo animal para autismo induzido pelo valproato: domínio do comportamento de aprendizagem**. 2007 145 f. Dissertação (Mestrado em Distúrbios do Comportamento)- Universidade Presbiteriana Makenzie, São Paulo, 2007

CARLSON, N.R. **Fisiologia do Comportamento**, 7^a ed. São Paulo: Manole, 2002

CAROFF, M.; KARIBIAN, M. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 23, p. 2431-2447, 2003.

CHAMPAGNE, F. A., CURLEY, J. P., KEVERNE, E. B., BATESON, P. P. G., Natural variation in postpartum maternal care in inbred and outbred mice. **Physiology & Behavior**, n. 91, p. 325-334, 2007

CHEN, W. S., WONG, F. K., CHAPMAN, P. F., PEMBERTON, D., J. Effects of donepezil on reversal learning in a touch screen-based operant task. **Behavioral Pharmacology**, august 3, 2009

DAW, N. D., KAKADE, S., DAYAN, P., Opponent interactions between serotonin and dopamine. **Neural Networks**, v. 15, p. 603-616, 2002.

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

DODART, J.C.; MATHIS, C. & UNGERER, A. Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. **Neuroreport**, v.8, p. 1173-1178, 1997.

DUNCAN, J.R., COCK, M.L., SUZUKI, K., SCHEERLINCK, J.Y., HARDING, R., REES, S.M., Chronic endotoxin exposure causes brain injury in the ovine fetus in the absence of hypoxemia. **J Soc Gynecol Investg**, v.13, n.2, p. 87-96, 2006

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

DURAND, M., CORONAS, V., JOURDAN, F., QUIRIONS, R., Developmental and aging of the cholinergic innervations of the olfactory bulb. **Int. J. Devl. Neuroscience**, v. 16, n. 7/8, p. 777-785, 1998

EKLIND,S., MALLARD,C., ARVIDSSON,P., HAGBERG,H., Lipopolysaccharide induces both a primary and secondary phase of sensitization in the developing rat brain. **Pediatric Research**,v.58, n.1, p.112-116, 2005

ERRIDGE, C.; BENNETT-GUERRERO, E.; POXTON, I. A., Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection* v. 4, p. 837–851, 2002.

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

FELICIO, L. F.; FLORIO, J. C.; SIDER, L. H.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; BRIDGES, R. S. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. **Brain Research Bulletin**, v. 40, n. 4, p. 253-256, 1996.

FONSECA, V. **Introdução às dificuldades de aprendizagem**, 2ª ed, Porto Alegre: Artes Médicas, 1995

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

GARCIA-CAPDEVILA, S., PORTELL-CORTES, I., TORRAS-GARCIA, M., COLL-ANDREU, M., COSTA-MISERACHS, D., Effects of long-term voluntary exercise on learning and memory process: dependency of the task and level of exercise. **Behavioral brain research**, v. 202, p. 162-170, 2009

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

GIRARD, S., KADHIM, H., ROY, M., LAVOIE, K., BROCHU, M., LAROUCHE, A., SÉBIRE, G., Role of perinatal inflammation in cerebral palsy. **Pediatr Neurol**, v. 40,p. 168- 174, 2009

GOLAN, H., STILMAN, M., LEV, V., HULEIHEL, M. Normal aging of offspring mice of mothers with induced inflammation during pregnancy. **Neuroscience**, v.141, p.1909-1918, 2006.

GÓMEZ, C., BRIÑÓN, J. G., COLADO, M. I., ORIO, L., VIDAL, M., BARBADO, M. V., ALONSO, J. R., Differential effects of unilateral olfactory deprivation on noradrenergic and cholinergic systems in the main olfactory bulb of the rat. **Neuroscience**, v. 141, p. 2117-2128, 2006

GÓMEZ, C., BRIÑÓN, J. G., VALERO, J., RECIO, J. S., MURIAS, A. R., CURTO, G. G., ORIO, L., COLADO, M. I., ALONSO, J. R., Sex differences in catechol contents in the olfactory bulb of control and unilaterally deprived rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 1517-1528, 2007.

GUTHRIE, K. M., GALL, C., Anatomic mapping of neuronal odor responses in the developing rat olfactory bulb. **The journal of comparative neurology**, v. 71, p. 455-456, 2003.

GUYON, A. et al. How cytokines can influence the brain: a role for chemokines? **Journal of Neuroimmunology**, v. 198, p. 46-55, 2008.

HARB, S. F., **Efeitos da administração de interleucina-2 na liberação *in vivo* de dopamina no *nucleus accumbens* e no comportamento maternal em ratas.** 2008, 97 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Ciências Biomédicas- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008

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

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

JERALA, R., Structural biology of the LPS recognition. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 353- 363, 2007

KARROW, N.A. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system during inflammation and altered programming of neuroendocrine-immune axis during fetal and neonatal development: Lessons learned from the

model a inflammage, lipopolysaccharide. **Brain, Behavior and Immunity**,v.20, p.144-158, 2006

KINOSHITA, D., **Avaliação dos efeitos do LPS sobre parâmetros comportamentais e imunológicos em camundongos idosos**. 2007 133f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

KIRSTEN, T. B. **Avaliação comportamental e neuroquímica da prole masculina de ratas exposta pré-natalmente ao lipopolissacarídeo**. 2008 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008

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

KLEMENT, D., BLAHNA, K., NEKOVÉŘOVÁ, T., Novel behavioral tasks for studying spatial cognition in rats. **Physiological Research**. n. 57, suppl. 3, p. S161- S165, 2008

KLIN, A., Austim and Aspenger syndrome: an overview. **Rev Bras Psiquiatr**, n. 28 (Suppl I), p. 3-12, 2006

KLIN, A., MERCADANTE, M. T., Autism and the pervasive developmental disorders. **Rev Bras Psiquiatr**, n.28 (Suppl I), p. S1-S2, 2006

KONSMAN, J.P. et al. Central nervous action of interleukin-1 mediates activation of limbic structures and behavioral depression in response to peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 2499-2510, 2008.

LAROUCHE, A., ROY, M., KADHIM, H., TSANACLIS, A. M., FORTIN, D., SÉBIRE, G., Neuronal injuries induced by perinatal hypoxic-ischemic insults are potentiated by prenatal exposure to lipopolysaccharide: animal model for perinatally acquired encephalopathy. **Developmental Neuroscience**, v. 27, p. 134-142, 2005

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

LEONARDO, C. C., PENNYPACKER, K. R., Neuroinflammation and MMPs: potential therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 6, n. 13, p. 1-7, 2009

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

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

LU, Y.; YEH, W.; OHASHI, P., LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine** v. 42, p. 145-151, 2008

MANNS, J.R., EICHENBAUM, H., A cognitive map for object memory in hippocampus. **Learn Mem**, n. 16, v. 10, p. 616- 624, 2009

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

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

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

MEYER, U.; FELDON, J.; FATEMI, H., In-vivo rodent models for the experimental investigation of perinatal immune activation effects in neurodevelopment brain disorders. **Neurosci. Biobehav. Rev.** (2009), doi: 10.1016/j.neurobiorev.2009.05.001

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

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

MWANZA, A.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ,H., KINDAHL,H., EINARSSON,S., Postovulatory effect of intravenous administration of lipopolysaccharide (E. coli, O55:B5) on the contractile activity of the oviduct, ova transport, binding of accessory spermatozoa to the zona pellucida and embryo development in sows. **Reprod Dom Anim**, v.37, p.269-274, 2002

NITSOS,I.,REES,S.M.,DUNDCAN,J., KRAMER,W., HRADING,R., NEWNHAM,J.P., et al. Chronic Exposure to Intra-Amniotic Lipopolysaccharide Affects the Ovine Fetal Brain. **J Soc Gynecol Investg**,v.13, p.439-247, 2006

NOLDUS INFORMATION TECHNOLOGY. EthoVision: Video Tracking, Motion Analysis & Behavior Recognition System. **Reference Manual**. Wageningen, 1997.

NUMAN, M., Maternal behavior, In: KNOBIL, E., NEILL, J., **The physiology of reproduction** 2^a ed., New York: Raven Press, p. 221- 302, 1994.

PAXINOS, G; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**, 4. ed. San Diego: Academic Press, 1998.

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

QUAN, N.; HERKENHAM, M., Connecting cytokines and brain: a review of current issue. **Histol Histopathol**,v. 17, p. 273-238, 2002

RAINEK, C., DE SOUZA, M. A., SZAWKA, R. E., LUTZ, M. L., VASCONCELLOS, L. F. T., SANVITTO, G. L., IZQUIERDO, I., BEVILAQUA, L. R., CAMMAROTA, M., LUCION, A .B., Neonatal handling and the maternal odor preference in rats pups: involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. **Neuroscience**, n. 159, p. 31-39, 2009

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

ROMERO, E., GUAZA, C., CASTELLANO, B., BORREL, J., Ontegeny of sensorimotor gating and immune impairment induced by prenatal immune challenge in rats: implications for the etiopathology of schizophrenia. **Molecular Psychiatry** 2008

ROTH, T. L., SULIVAN, R. M., Memory of early maltreatment: neonatal behavior and neural correlates of maternal maltreatment within the context of classical conditioning. **Biological Psychiatry**, n. 57, p. 823-831, 2005.

RUDY, J. W., CHEATLE, M. D., Odor aversion in neonatal rats. **Science**, v. 198, p. 845-846, 1977

SALE, A., CENNI, M. C., CIUCCI, F., PUTIGNANO, E., CHIERZI, S., MAFFEI, L., Maternal enrichment during pregnancy accelerates retinal development of the fetus. **PLoS ONE**, v. 2, n. 11: e1160.doi:10.13.71/journalphone.00011160, 2007

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

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

SILVA, R. H., Efeitos do monossialogangliosídeo GM1 sobre a memória de ratos. 1997, 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Departamento de Farmacologia- Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1997

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

SUSSMAN, M. **Escherichia coli: mechanism of virulence**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p. 639.

TEN, V.S., WU, E.X., TANG, H., BRANDLEY-MOORE, M., FEDARAU, M.V, RATNER, V.I. et al, Late measures of brain injury after neonatal hypoxia-ischemia in mice. **Stroke**, v.35, p.2183-2188, 2004

TEODOROV, E., **Comportamento maternal e o papel dos receptores opióides na substância cinzenta periaquedutal de ratas lactantes.** 2008, 153 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Ciências Biomédicas- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008

VALADARES, C. T., **Efeitos da desnutrição protéica pós-natal no desempenho de ratos em diferentes tarefas de aprendizagem e memória.** 2006. 127f. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto, 2006.

VENTURA, R., PASCUCCI, T., CATANIA, M. V., MUSUMECI, S A., PUGLISI-ALLEGRA, S., Object recognition impairment in Fmr1 knockout mice is reversed by amphetamine: involvement of dopamine in the medial prefrontal cortex. **Behavioral Pharmacology**, v. 15, p. 433- 442, 2004

WANG, X., HAGBERG, H., ZHU, C., JACOBSSON, B., MALLARD, C., Effects of intrauterine inflammation on the developing mouse brain. **Brain Research**, v. 1144, p. 180-185, 2007

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

WINTERS, B. D., SAKSIDA, L. M., BUSSEY, T. J., Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, p. 1055-1070, 2008

XU, D. X., CHEN, Y. H., WANG, H., ZHAO, L., WANG, J. P., WEI, W., Effect of N-Acetylcysteine on lipopolysaccharide-Induced Intra-uterine fetal death and intra-uterine growth retardation in mice. **Toxicological Sciences**, v. 88. N.2, p. 525-533, 2005

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

ZANGROSSI JUNIOR, H., FILE, S., Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to a cat odor. **Brain Research Bulletin**, v. 29, p. 381-388, 1992