



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

CHARLLYANY SABINO CUSTÓDIO

**DESAFIO IMUNE NEONATAL COM LIPOPOLISSACARÍDEO DESENCADEIA
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E IMUNOLÓGICAS/NEUOTRÓFICAS
DURADOURAS RELACIONADAS AO SEXO E A IDADE EM CAMUNDONGOS:
RELEVÂNCIA PARA O TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. DANIELLE MACEDO GASPAR

FORTALEZA

2017

CHARLLYANY SABINO CUSTÓDIO

**DESAFIO IMUNE NEONATAL COM LIPOPOLISSACARÍDEO DESENCADEIA
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E IMUNOLÓGICAS/NEUROTRÓFICAS
DURADOURAS RELACIONADAS AO SEXO E A IDADE EM CAMUNDONGOS:
RELEVÂNCIA PARA O TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Macedo Gaspar

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C991 Custódio, Charllyany Sabino Custódio.
DESAFIO IMUNE NEONATAL COM LIPOPOLISSACARÍDEO DESENCADEIA ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS E IMUNOLÓGICAS/NEUROTÓFICAS DURADOURAS RELACIONADAS
AO SEXO E A IDADE EM CAMUNDONGOS: RELEVÂNCIA PARA O TRANSTORNO DO
ESPECTRO AUTISTA (TEA) / Charllyany Sabino Custódio Custódio. – 2017.
99 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Danielle Macedo Gaspar.

1. Lipopolissacarídeo. 2. Neurodesenvolvimento. 3. Desafio imune neonatal. 4. Transtorno do espectro
autista (TEA). 5. Diferença de sexo. I. Título.

CDD 616.9

CHARLLYANY SABINO CUSTÓDIO

**DESAFIO IMUNE NEONATAL COM LIPOPOLISSACARÍDEO DESENCADEIA
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E IMUNOLÓGICAS/NEUROTRÓFICAS
DURADOURAS RELACIONADAS AO SEXO E A IDADE EM CAMUNDONGOS:
RELEVÂNCIA PARA O TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Microbiologia Médica.

Aprovada em: 27/04/2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. David Freitas de Lucena
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos Patrocínio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho à minha família. Eles vitalícios de amor, eles são a fonte do melhor que existe em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pai de bondade, Senhor do impossível, por me cuidar e me permitir realizar grandiosos sonhos - como este que vivencio hoje. Ele ilumina a minha mente, toca o meu coração e destrava os meus pés, incansavelmente, nunca desiste de mim.

À Nossa Senhora, Mãe de Jesus Cristo e intercessora de todos nós, por me envolver em seu Manto Sagrado de amor e doçura, me protegendo como filha querida e intercedendo à Deus por minhas preces.

Aos meus pais, Francisco das Chagas Cândido Custódio e Cláudia Maria Sabino Custódio, por toda educação, orientação, apoio, encorajamento, cuidado e amor dedicados a mim durante toda a minha vida. Vocês são exemplo de resiliência, honestidade, humildade, trabalho, coragem, força e fé para mim. Tudo o que sou hoje devo a vocês.

Às minha irmãs, Charllene Sabino Custódio e Chayandra Sabino Custódio, por todo amor, atenção, cuidado, companherismo, carinho e orações dedicados a mim.

À minha sobrinha, Francisca Mirhella Custódio Teixeira, por sua pureza, amor, energia e alegria em minha vida.

Ao meu sobrinho e afilhado, Francisco das Chagas Cândido Custódio Neto, presente de Deus em minha vida. Uma criança linda e amável que transborda a minha vida de felicidade.

À minha orientadora Profa. Dra. Danielle Macedo Gaspar, que desde o mestrado tem sido bom exemplo em minha vida. Uma mulher de fibra, uma mãe bondosa figurando como orientadora, uma amiga atenciosa e sempre resolutiva, possuidora de um neurodesenvolvimento invejável, sempre sábia e jamais ofensiva. Foram seis anos muito felizes de convívio ao seu lado.

À Universidade Federal do Ceará – UFC e ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica - PPGMM, representado pelos professores e demais funcionários, pelo empenho na formação científica dos alunos, propiciando a realização desse trabalho.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP pelo suporte financeiro que viabilizou a execução desse trabalho.

À todos que fazem parte do laboratório de Neuropsicofarmacologia do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos - NPDM/UFC pela colaboração na execução desse trabalho.

À doutoranda Bruna Stefânia Ferreira Mello e ao nosso aluno de iniciação científica, Adriano José Maia Chaves Filho, por todo o empenho e contribuições para a realização desse trabalho.

À Banca Qualificadora, Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos Patrocínio e Dra. Camila Nayane de Carvalho Lima, pelas relevantes contribuições.

À Banca Examinadora, por aceitar cordialmente o convite.

À minha orientadora de graduação, amiga e fonte de inspiração, Profa. Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes, por toda a força, encorajamento, credibilidade, reconhecimento e carinho desde 2006 (quando nos conhecemos) até hoje.

Aos meus amigos de todas as épocas (infância, adolescência e idade adulta) e de todas as circunstâncias, aos meus colegas de mestrado e doutorado e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse meu sonho.

À minha "babá", Maria Valéria Cavalcante Araújo, por ser minha família aqui em Fortaleza, cuidando de mim, me fazendo companhia, estando sempre com um sorriso no rosto e pronta para me ajudar.

À todos aqueles, que, mesmo não mencionados, estiveram ao meu lado, contribuindo para as minhas realizações pessoais e profissionais, o meu mais sincero agradecimento.

RESUMO

Adversidades precoces na vida, como infecções e estresse, estão relacionados à manifestação de transtornos neuropsiquiátricos, tais como autismo e esquizofrenia. Estas alterações podem ser desencadeadas por mecanismos inflamatórios e/ou neurotróficos. Neste contexto decidimos realizar uma ampla gama de testes comportamentais e neurobiológicos, como a participação da indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) - a primeira enzima de degradação do triptofano que limita a velocidade na via das quinureninas, associada a diminuição da serotonina (5-HT) e do ácido quinolínico (um composto neurotóxico) - , interleucinas, estresse oxidativo e de outros marcadores neuroquímicos relevantes ao estudo em camundongos swiss machos e fêmeas periadolescentes [dia pós-natal (PN) 35] e adultos (PN70) desafiados neonatalmente (PN 5 e 7) com Lipopolissacarídeo (LPS) da cepa *Escherichia coli*, com o intuito de contribuir com a determinação dos chamados períodos críticos do desenvolvimento, possibilitando no futuro a prevenção e o tratamento de alterações nos períodos mais prejudiciais, o que viabilizará uma melhor qualidade de vida para o paciente, familiares e para a sociedade, bem como a redução nos gastos com saúde pública com patologias desencadeadas pela exposição ao LPS durante o neurodesenvolvimento. Uma vez que os transtornos do neurodesenvolvimento são influenciados pelo sexo, avaliamos camundongos machos e fêmeas. Os camundongos machos desafiados com LPS apresentaram comportamento tipo-depressivo, ansiedade, comportamento repetitivo e déficits de memória de trabalho no PN35, enquanto no PN70 só os comportamentos de ansiedade e tipo-depressivo foram mantidos. As fêmeas apresentaram déficits de inibição pré-pulso (IPP) em ambas as idades estudadas. As alterações neuroquímicas foram determinadas no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e hipotálamo (HT). Observamos aumento de interleucina (IL-4) (CPF, HC e HT) e níveis diminuídos de IL-6 (CPF, HC e HT). Ocorreu aumento do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (HC) em ambos os sexos e idades avaliadas. Apenas camundongos machos desafiados com LPS apresentaram aumento da atividade de mieloperoxidase (MPO) no HC na adolescência e idade adulta e aumento dos níveis de interferon gama (IFN γ), nitrito, expressão da IDO e diminuição da parvalbumina quando adulto. Na via das quinureninas, houve diminuição de serotonina (5-HT)(HC) somente em camundongos machos, enquanto o ácido quinolínico (QUIN) diminuiu em ambos os sexos no PN70. Em conjunto, essas foram as principais diferenças comportamentais e neuroquímicas observadas no presente estudo entre machos e fêmeas que sofreram o desafio imune neonatal por LPS. Concluímos que o desafio por LPS neonatal desencadeia um espectro de

comportamentos e alterações neurobiológicas que se manifestam durante a adolescência e se assemelham ao transtorno do espectro autista inespecífico (atípico), sendo, possivelmente, um modelo relevante para o estudo das diferenças deste transtorno.

Palavras-chave: Desafio imune neonatal. Lipopolissacárido. Neurodesenvolvimento. Transtorno do espectro autista (TEA). Diferença de sexo.

ABSTRACT

Early life adversities, such as infections and stress, are related to the manifestation of neuropsychiatric disorders, such as autism and schizophrenia. These changes may be triggered by inflammatory and / or neurotrophic mechanisms. In this context, we decided to carry out a wide range of behavioral and neurobiological tests, such as the participation of indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) - the first tryptophan degradation enzyme that limits the speed in the kynurenine pathway, associated with a decrease in serotonin and interleukins, oxidative stress, and other neurochemical markers relevant to the study in male and female swiss mice (postnatal day (PN) 35) and neonatal challenged adults (PN70) (PN 5 and 7) with Lipopolysaccharide (LPS) of the strain *Escherichia coli*, with the purpose of contributing to the determination of the so-called critical periods of development, making it possible in the future to prevent and treat changes in the most harmful periods, Quality of life for the patient, family and society, as well as the reduction in Gies triggered by LPS exposure during neurodevelopment. Since neurodevelopmental disorders are influenced by sex, we evaluated male and female mice. Male mice challenged with LPS showed type-depressive behavior, anxiety, repetitive behavior and working memory deficits in the PN35, whereas in PN70 only the anxiety and depressive-type behaviors were maintained. Females had pre-pulse inhibition (PPI) deficits at both ages studied. Neurochemical changes were determined in the prefrontal cortex (CPF), hippocampus (HC) and hypothalamus (HT). We observed increased interleukin (IL-4) (PFC, HC and HT) and decreased levels of IL-6 (PFC, HC and HT). There was an increase in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (HC) in both sexes and ages evaluated. Only male mice challenged with LPS showed increased myeloperoxidase (MPO) activity in HC in adolescence and adulthood and increased levels of interferon gamma (IFN γ), nitrite, IDO expression, and parvalbumin decrease in adult. In the kinurenin pathway, serotonin (5-HT) (HC) decreased only in male mice, whereas quinolinic acid (QUIN) decreased in both sexes in PN70. Together, these were the main behavioral and neurochemical differences observed in the present study between males and females who underwent neonatal immune challenge by LPS. We conclude that the challenge for neonatal LPS triggers a spectrum of neurobiological behaviors and changes that occur during adolescence and resemble non-specific (atypical) autistic spectrum disorder, possibly being a relevant model for the study of the differences of this disorder.

Keywords: Neonatal immune activation. Lipopolysaccharide. Neurodevelopment. Autistic Spectrum Disorder (ASD). Difference of sex.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Etapas do desenvolvimento do cérebro e diferentes janelas de vulnerabilidade...	19
Figura 2	Micografia eletrônica da <i>Escherichia coli</i> e representação esquemática do LPS...	20
Figura 3	Mecanismos de ação do LPS	23
Figura 4	A inflamação por LPS no metabolismo do TRP	25
Figura 5	Via das quinureninas	26
Figura 6	Manifestações comportamentais do TEA concomitantes ao Neurodesenvolvimento	33
Figura 7	Aparelho de Inibição pré-pulso	41
Figura 8	Ilustração do Teste de nado forçado	42
Figura 9	Teste de Interação Social	43
Figura 10	Ilustração representativa do teste de labirinto em Y	44
Figura 11	Teste do odor do gato	46
Figura 12	Teste de campo aberto	47
Figura 13	Efeito do desafio neonatal por LPS sobre % de IPP	54
Figura 14	Efeito do desafio neonatal de LPS em % de tempo de imobilidade (A) e o consumo de sacarose (B)	55
Figura 15	Efeito do desafio neonatal com LPS em % de preferência social (A), % correto alternâncias (B) e tempo de contato do pano (C)	56
Figura 16	Efeito do desafio neonatal do LPS no número de cruzamentos (A), <i>grooming</i> (B) e tempo gasto no centro do campo (C)	57
Figura 17	Efeito do desafio neonatal com LPS na atividade de mieloperoxidase (MPO) [Córtex pré-frontal (A), hipocampo (B) e hipotálamo (C)]	58
Figura 18	Efeito do desafio neonatal com LPS na IL-4 [córtex pré frontal (A), hipocampo (B) e hipotálamo (C)]	59
Figura 19	Efeito do desafio neonatal com LPS na IL-6 [córtex pré-frontal (A) Hipocampo (B) e hipotálamo (C)]	60
Figura 20	Efeito do desafio neonatal com LPS nos níveis de BDNF no hipocampo	61
Figura 21	Efeito do desafio neonatal com LPS nos níveis de IFN- γ no hipocampo	62
Figura 22	Efeito do desafio neonatal com LPS nos níveis de nitrito no hipocampo	63
Figura 23	Efeito do desafio neonatal com LPS na expressão daIDO no hipocampo	64
Figura 24	Efeito do desafio neonatal com LPS nos metabólitos da via das kinuereninas: triptofano (A), serotonina (B) e ácido quinolínico (C)	65
Figura 25	Efeito do desafio neonatal com LPS na expressão de parvalbumina	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Associação do LPS com transtornos neuropsiquiátricos de acordo com o período neurodesenvolvimental de exposição	28
Quadro 2	Protocolo experimental e tratamento	39
Quadro 3	Gradiente de fluxo para determinação simultânea de triptofano e seus metabólitos por HPLC	52
Quadro 4	Resumo dos resultados comportamentais obtidos	67
Quadro 5	Resumo dos resultados neuroquímicos obtidos	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-HK	3-Hidroxiquinurenina
5-HT	Serotonina
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CD14	<i>Cluster of Differentiation 14</i>
COR	Corticosterona
COX-2	Ciclooxigenase 2
CPF	Córtex pré-frontal
DSM	Manual Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GSH	Glutathiona Reduzida
HC	Hipocampo
HIV	Virús da Imunodeficiência Humana
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HT	Hipotálamo
i.c.	intracerebral
i.p.	intraperitoneal
IDO	Indolamina 2,3-Dioxigenase
IFN- γ	Interferon Gama
IPP	Inibição Pré-pulso
Kyn	Ácido Quinurênico
KYNA	Quinurenina
LBP	<i>Lipopolysaccharide binding protein</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NFk β	<i>Nuclear factor kappa β</i>
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PN	Dia Pós-Natal
Poly I:C	Ácido polirribinosínico-polirribocitidílico
QUIN	Ácido Quinolínico
SGZ	Zona subgranular SGZ

SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Ácido Tiobarbitúrico
TDO	Triptofano 2,3 dioxigenase
TEA	Transtorno do Espectro Autista
TH	Triptofano hidroxilase
Th1/Th2	Receptor <i>T Helper</i> 1 e 2
TLR4	Receptor <i>Toll Like</i> 4
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRP	Triptofano

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Neurodesenvolvimento e a interferência de eventos adversos precoces	18
2.2	Desafio imune neonatal por LPS	20
2.3	Alterações imunológicas e neurotróficas produzidas por desafio imune neonatal com LPS	21
2.4	Transtornos neuropsiquiátricos relacionados ao desafio imune neonatal com LPS	27
2.5	Transtorno do Espectro Austista (TEA)	32
2.6	Diferenças de gênero e possíveis mecanismos associados a transtornos neuropsiquiátricos	34
3.	HIPÓTESE	36
4.	OBJETIVO GERAL	36
4.1	Objetivos específicos	37
5.	METODOLOGIA	38
5.1	Animais	38
5.2	Drogas e soluções	38
5.3	Protocolo experimental e tratamento	39
5.4	Testes comportamentais	40
5.4.1	Inibição Pré-pulso (IPP)	40
5.4.2	Teste do Nado Forçado	42
5.4.3	Teste da preferência à sacarose	42
5.4.4	Teste de Interação Social	43
5.4.5	Teste labirinto em Y (Y-maze)	44
5.4.6	Teste de odor de gato	46
5.4.7	Campo aberto	46
5.5	Testes Neuroquímicos	47
5.5.1	Ensaio para Mieloperoxidase (MPO)	47
5.5.2	Teste de ELISA para Dosagem das citocinas IL-6, IL-4 e IFN γ	48
5.5.3	Determinação dos Níveis de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) por ELISA	48
5.5.4	Determinação dos níveis de Nitrito	49
5.5.5	Expressão protéica de Parvalbumina e IDO	49

5.5.5.1	Método Bradford para dosagem de proteína	49
5.5.5.2	Método Bradford para dosagem de proteína	50
5.5.5.3	Western Blotting	51
5.5.6	Quantificação do triptofano e seus metabólitos por HPLC	52
5.5.7	Análise Estatística	53
6.	RESULTADOS	54
6.1	Resultados comportamentais	54
6.2	Resultados das análises neuroquímicas	58
7.	DISCUSSÃO	69
8.	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	80
	ANEXO A: ABSTRACT DO ARTIGO PUBLICADO	99

1. INTRODUÇÃO

As adversidades da primeira infância podem desencadear transtornos neuropsiquiátricos (KESSLER *et al.* 1997). As conseqüências imediatas e duradouras dessas adversidades foram estudados em modelos animais baseados, por exemplo, na exposição neonatal ao estresse (ROTH *et al.*, 2009) ou por meio da administração intracerebral ou sistêmica de endotoxina, o lipopolissacarídeo (LPS) (PANG *et al.*, 2003; PANG *et al.*, 2016).

O LPS é o principal constituinte da membrana externa de bactérias Gram negativas. Trabalhos prévios mostram que a administração neonatal de LPS imita alterações fisiológicas e comportamentais induzidas por uma infecção bacteriana Gram negativa (ALEXANDER; RIETSCHER, 2001) que é de alta prevalência durante o período pré-natal e neonatal. Não apenas isso, o desafio neonatal com LPS em roedores pode imitar desequilíbrios precoces na microbiota do intestino, também referida como disbiose intestinal. Na verdade, observou-se que crianças infectadas pelo HIV que não estavam em terapia apresentaram translocação microbiana do intestino, considerada uma das principais causas de ativação imune (PILAKKA -KANTHIKEEL *et al.*, 2014), sendo LPS plasmático um marcador desta ativação imunitária (VASSALLO *et al.*, 2012).

As alterações comportamentais a longo prazo induzidas pela exposição pré- e pós-natal de roedores ao LPS variam de comportamentos semelhantes ao autismo [induzidos pelo desafio no dia embrionário 9,5 (KIRSTEN *et al.*, 2013) ou pelo desafio neonatal no dia pós-natal (PN) 3 (PANG *et al.*, 2016)], alterações tipo esquizofrenia [induzidas por LPS em PN 15 e 16] (WISCHHOF *et al.*, 2015)] a comportamentos de ansiedade [Induzida pelo desafio de LPS nas PN 3 e 5] (WALKER *et al.*, 2009)] e tipo-depressão (TISHKINA *et al.*, 2016). É importante mencionar que a ansiedade pode ocorrer em até 65% dos pacientes com esquizofrenia (TEMMINGH; STEIN 2015) e nos transtornos do espectro autista (TEA) (CHALFANT *et al.*, 2007).

Até a presente data, poucos estudos associaram a exposição pós-natal precoce ao LPS com a ocorrência de alterações comportamentais relacionadas ao TEA. Neste contexto, um estudo demonstrou que o desafio de LPS no PN3 resultou em disfunções na comunicação (avaliadas no PN10) e cognitivas (avaliadas no PN40). Esses autores associaram as

anormalidades neurocomportamentais desencadeada por LPS no desafio neonatal com TEA (PANG *et al.*, 2016).

O autismo é um transtorno do desenvolvimento neurológico caracterizado por déficits interação, cognição, dificuldades com a linguagem e comportamento repetitivo / restrito. Este transtorno é 4-5 vezes mais prevalente em homens, além de apresentar uma importante influência do sexo na manifestação dos sintomas (LAI *et al.*, 2015).

A ocorrência de sintomas distintos entre os sexos torna o diagnóstico de TEA em mulheres mais difícil. As dificuldades na avaliação são parcialmente responsáveis pela subestimação da prevalência desse transtorno em mulheres (BEGGIATO *et al.*, 2016). É importante destacar que, até a presente data, poucos estudos pré-clínicos avaliaram influências sexuais nas alterações neurobiológicas presentes no TEA. As alterações neurobiológicas subjacentes parecem depender da gravidade deste transtorno. Nesse sentido, os níveis séricos do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) foram significativamente maiores em pacientes portadores de Autismo atípico (fenótipo clinicamente mais suave sem comprometimento cognitivo importante) em comparação com os controles, mas não em casos típicos de TEA (fenótipo clinicamente grave com importante comprometimento cognitivo) (KASARPALKAR *et al.*, 2014). A desregulação imune caracterizada por níveis anormais de citocinas como a interleucina (IL) -6, IL-4, IFN- γ é observada no autismo (GOINES; ASHWOOD, 2013). Esta desregulação imune observada na TEA também está relacionada a altos níveis de produção de óxido nítrico (NO). De fato, crianças com TEA apresentam níveis plasmáticos mais altos de NO, este aumento possivelmente está ligado à atividade do interferon gama (IFN- γ) (SWEETEN *et al.*, 2004). Além disso, os neurônios imunorreativos de parvalbumina (putativamente, GABAérgico) foram associados com déficits cognitivos e sintomas negativos de esquizofrenia e autismo.

A indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima de catabolização do triptofano, cuja atividade é induzida pela inflamação, sendo relacionada com achados de comportamentos tipo-depressivo. Esta enzima está associada à via das quinureninas, e o aumento de sua atividade leva à produção do metabólito ácido quinolínico resultando em danos neuronais por estresse oxidativo através da estimulação dos receptores de NMDA. Estudos demonstraram que a expressão de IDO pode ser regulada por outros estímulos

inflamatórios além do IFN γ , incluindo o LPS (CONNOR *et al.*, 2008; NISAPAKULTORN *et al.*, 2009).

De acordo com o exposto, nós hipotetizamos que as alterações induzidas por LPS na cognição, ansiedade e/ou depressão, relatadas em alguns estudos anteriores podem não ser um sintoma isolado, mas parte de um transtorno mais complexo, como TEA ou esquizofrenia, que não poderiam ser totalmente avaliadas nesses estudos prévios devido às avaliações comportamentais limitadas. Portanto, conclusões conflitantes foram observadas em estudos pré-clínicos prévios ao nosso sendo que acreditamos que as alterações comportamentais a longo prazo induzidas pela exposição precoce ao LPS podem refletir sintomas de sobreposição entre TEA e esquizofrenia (STONE; IGUCHI, 2011) tendo a ansiedade e depressão como co-morbididades. Assim, o presente estudo foi projetado para realizar um amplo espectro de testes comportamentais e neurobiológicos como uma tentativa de contribuir para um melhor conhecimento sobre as consequências comportamentais e neuroquímicas do desafio imune neonatal por LPS.

2. REVISÃO DE LITERATURA

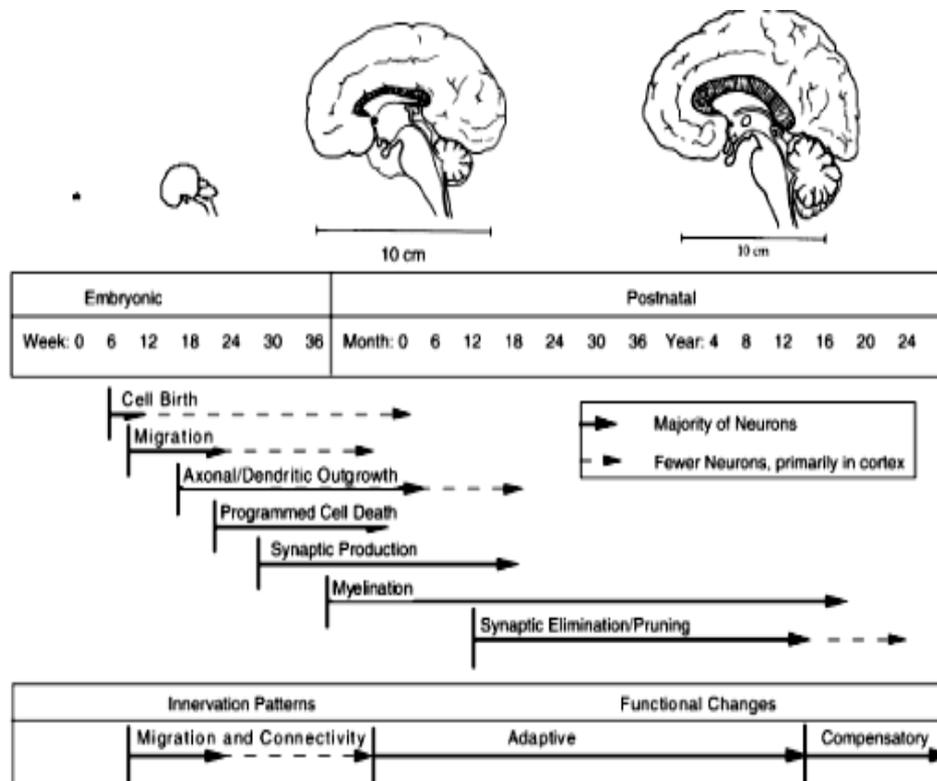
2.1 Neurodesenvolvimento e a interferência de eventos adversos precoces

O desenvolvimento do cérebro é um processo notável. Células progenitoras nascem se diferenciam e migram para suas posições definitivas. Importantes conexões sinápticas são formadas de axônios e dendritos que preparam potencialmente o campo para a codificação de informações para o resto da vida. No cérebro de mamíferos, as sinapses e os receptores presentes na maioria das regiões cerebrais são produzidos em excesso e eliminados quase que pela metade durante duas fases da vida: imediatamente antes do nascimento (poda neuronal) e durante as transições da infância, adolescência, até a idade adulta. Este processo resulta em diferentes períodos críticos e sensíveis do desenvolvimento do cérebro. Dessa forma, o cérebro tornou-se um tema desafiador para corresponder às necessidades do ambiente. A exposição a elementos positivos e negativos (por exemplo, desafios imunes) antes da adolescência pode interferir sobre a formação final do cérebro do adulto de um modo que difere da exposição a esses mesmos elementos após a adolescência (ANDERSEN, 2003; DANTZER, 2008; CALLAGHAN, 2008; CZAPSKI *et al.*, 2010; TAVARES *et al.*, 2011;

ZUNSZAI, 2012, GRIN'KINA, 2012), estas exposições em diferentes fases da vida podem ter conseqüências diversas ainda pobremente conhecidas.

Os processos do neurodesenvolvimento ocorrem em fases (figura1), preparando o palco para períodos potenciais de vulnerabilidade. Desse modo, acredita-se que insultos no início da vida serão assimilados em inervações padrões do cérebro, enquanto insultos depois da fase pré-puberal causarão mudanças funcionais que podem ser mais adaptativas.

Figura 1 - Etapas de desenvolvimento do cérebro e diferentes janelas de vulnerabilidade:



Fonte: ANDERSEN, 2003

Os dias pós-natais (PNs) 1-3 em roedores correspondem a 23-32 semanas de gestação humana, sendo um período caracterizado pelo desenvolvimento do sistema imunológico e estabelecimento da barreira hemato-encefálica. Já nos PNs 5-10, o sistema imunológico está se consolidando, enquanto a densidade axonal e dendrítica estão aumentando, assim como a gliogênese está em pico. Portanto, os PNs de exposição ao LPS têm relevância para as alterações comportamentais e neurobiológicas observadas em diferentes fases da vida que podem ser característicos de transtorno do TEA, esquizofrenia, ansiedade e depressão. Achados moleculares têm sido usados para mostrar similaridades entre humanos e roedores,

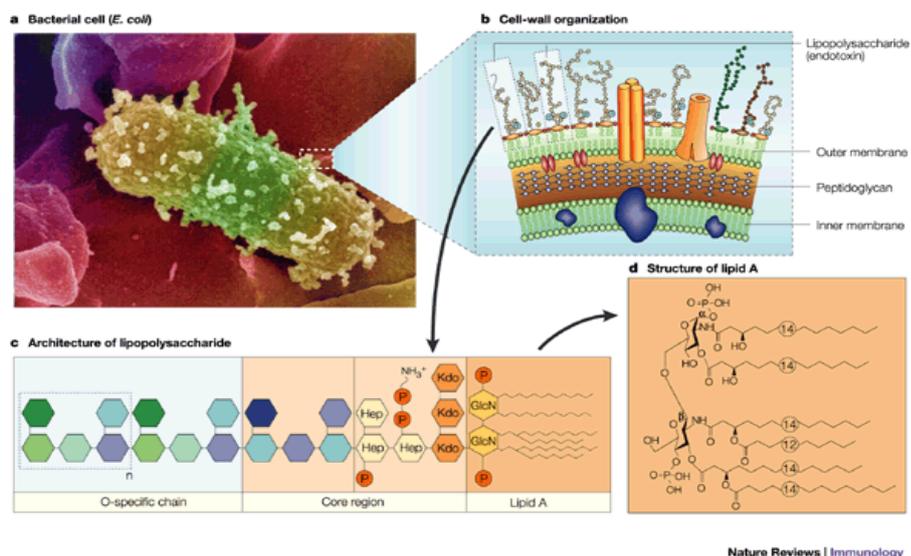
dando suporte à visão de que alterações comportamentais são ligadas a mudanças moleculares (CLAYPOOLE *et al*, 2016.; ABAZYAN *et al.*, 2010, ASHWOOD *et al.*, 2010, 2011; CAREAGA *et al.*, 2010; GARAY; MCALLISTER, 2010; MULLER; ACKENHEIL, 1998; PACE; HEIM, 2011; SCHWARZ; BILBO, 2012; WATNABE *et al.*, 2010; MACRAE *et al.*, 2015; SCHWARZ *et al.*, 2011; PANG *et al.*, 2016).

2.2 Desafio imune neonatal por LPS

A ativação imunológica do início da vida regula a programação do desenvolvimento cerebral e influencia o comportamento na vida adulta. O sistema imunológico está envolvido no desenvolvimento do cérebro de forma significativa, e vários tipos de ativações imunológicas neonatais exercem influências sobre o cérebro e comportamento na idade adulta (YANG, *et al.*, 2016).

O desafio imune neonatal por LPS - endotoxina da parede celular de bactérias Gram negativas (ex. *Escherichia coli*) - maior fator de virulência dessas bactérias (figura 2) - desencadeia alterações neurobiológicas que resultam na amplificação das reações inflamatórias sistêmicas por toda a vida (MACRAE, 2015).

Figura 2 - Micrografia eletrônica de *Escherichia coli* (a), juntamente com uma representação esquemática da localização do LPS na parede celular bacteriana (b). Também é mostrada a arquitetura (c) do LPS e a estrutura primária do seu centro tóxico, o componente de lípido A (d):



Fonte: BEUTLER; RIETSCHER, 2003

A inflamação da primeira infância é comumente associada à interrupções de memória espacial em uma variedade de tarefas comportamentais (DINEL *et al.*, 2014, VORHEES *et al.*, 2015 e ZHANG; VAN PRAAG, 2015). Além disso, estudos demonstram a existência de "janelas críticas" durante as quais um desafio imune deve acontecer para que resultados comportamentais específicos ocorram (HARRÉ *et al.*, 2008). Essas interrupções também são mediadas de maneira dependente do tempo em relação à trajetória de quando elas são expressas (ou seja, adolescência *versus* idade adulta). Portanto, dois eventos podem ocorrer pela ativação imunológica no início da vida: i) modulação direta ou interrupção do neurodesenvolvimento ou ii) alteração da resposta neuroimune a um desafio imune subsequente na idade adulta (MACRAE, 2015).

Independente do modelo utilizado, parece bem estabelecido por estudos que a exposição neonatal aos LPS afeta o desenvolvimento por longa duração, com mudanças de comportamentos e alterações neuroendócrinas (BARTH *et al.*, 2016; ZOLBANIN *et al.*, 2013; LUNARDELLI, 2013; BOISS *et al.*, 2004; SHANKS *et al.*, 2000), ficando claro que intervenções nestes períodos importantes provocam o que tem sido chamado de "programming", ou seja, uma "marca" no desenvolvimento de diferentes sistemas que permanecem e se perpetuam ao longo da vida (CHINTAMANENI *et al.*, 2014; XIONG & ZHANG, 2013; BILBO *et al.*, 2005).

2.3 Alterações imunológicas e neurotróficas produzidas por desafio imune neonatal com LPS

O sistema imunológico tem um papel crítico na função cerebral, no desenvolvimento, saúde e doença (CLAYPOOLE *et al.*, 2016). As células imunocompetentes primárias do cérebro, a microglia, estão cada vez mais implicadas na etiologia de muitos distúrbios neuropsiquiátricos (RICO *et al.*, 2010). A ativação imunológica durante o desenvolvimento neonatal, um tempo de enorme maturação e maior vulnerabilidade a fatores ambientais como uma infecção bacteriana (MCGOWAN, 2015), tem mostrado afetar a função microglial no cérebro (WILLIAMSON *et al.*, 2011), susceptibilidade à doença, reatividade ao estresse e neuropsicopatologias (WILLIAMSON; BILBO, 2013; SCHWARZ; BILBO, 2012; WILLIAMSON *et al.*, 2011; MOUIHATE *et al.*, 2010; BILBO; SCHWARZ, 2009; KARROW, 2006; SPENCER *et al.*, 2006). Uma vez que o LPS entra em contato com o organismo animal, seja a partir de uma bactéria Gram-negativa como a *E. coli*, ou pela administração direta do mesmo, inicia-se uma série de respostas no organismo infectado

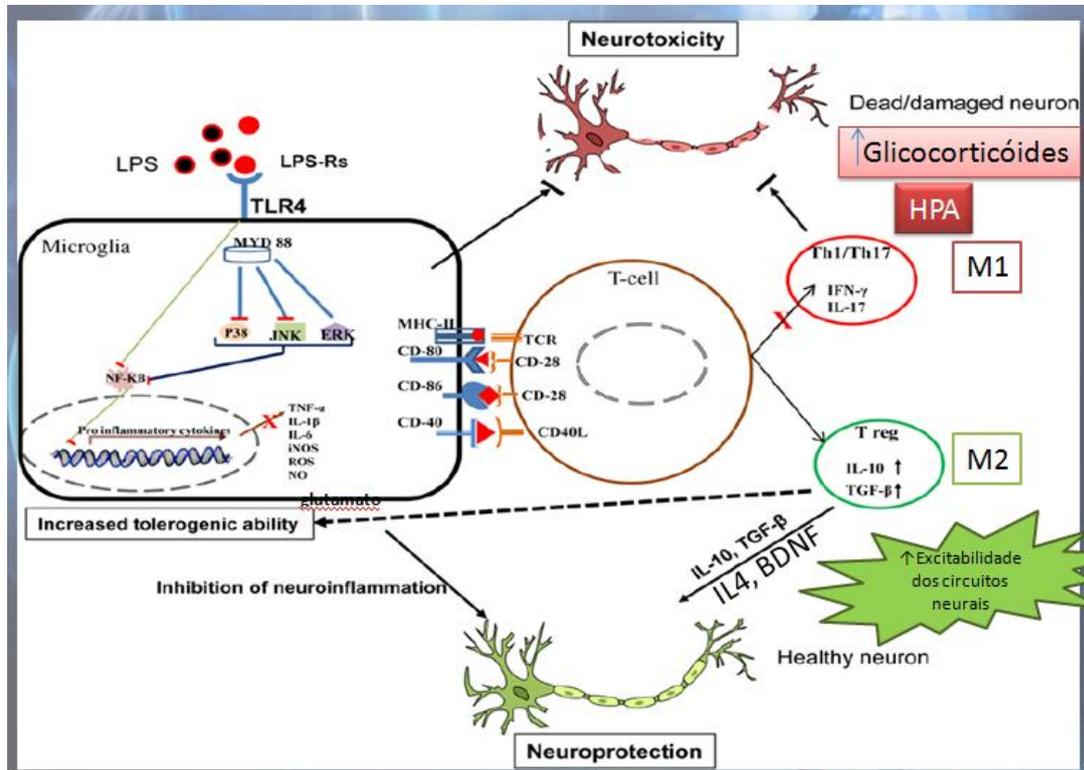
(Figura 3). Esta endotoxina pode atuar em macrófagos, monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas e células endoteliais (SALUKJUSZCZAK; WACHOWICZ, 2005).

O LPS que se encontra no plasma liga-se a uma proteína de fase aguda do hospedeiro, o LBP (proteína ligadora de LPS, ou *lipopolysaccharide binding protein*), produzida no fígado do animal, formando um complexo chamado de LPS:LBP. O complexo transfere o LPS para a proteína de membrana periférica CD14 na superfície dos macrófagos, iniciando a ativação celular (FENTON; GOLENBOCK, 1998; ADEREM; ULEVITCH, 2000; MIYAKE, 2003; MURPHY *et al.*, 2010). O novo complexo formado, chamado de LPS:CD14, ativa a sinalização do receptor semelhante ao Toll (ou *toll-like receptor*, TLR)-4, ao qual é complexada à proteína MD-2, gerando o sinal transmembranar para o núcleo. Dentro do macrófago ocorre uma série de reações em cascata, incluindo a atuação de MyD88, IRAK, TRAF6, TAK-1, quinase I κ B, AP-1, dentre outras (algumas ainda não elucidadas), até a ativação do fator nuclear de transcrição NF- κ B (envolvido na plasticidade, desenvolvimento e neurodegeneração em neurônios e células da glia), que ativa os genes que codificam as proteínas envolvidas na defesa contra a infecção, que são as citocinas pró-inflamatórias (IL1 β , IL6, TNF α) (ADEREM; ULEVITCH, 2000; HARJU *et al.*, 2005; HAVA *et al.*, 2006; ROMERO *et al.*, 2007; MURPHY *et al.*, 2010) (Fig.3).

Diversas regiões do cérebro expressam receptores para citocinas tanto na glia quanto nos neurônios (AVITSUR; YIRMIYA, 1999). No SNC as citocinas podem modular neurotransmissores centrais como dopamina, serotonina, noradrenalina, ácido gama-aminobutírico (GABA), acetilcolina, neuropeptídeos, dentre outros. Atuam ainda na diferenciação e crescimento neuronal, na migração dos neurônios para seus alvos e na modificação da plasticidade sináptica. Portanto, em níveis fisiológicos, as citocinas desempenham importantes papéis no cérebro, como, por exemplo, na neurogênese, neuromodulação, na memória e no sono (LORTON *et al.*, 2006; MCAFOOSE; BAUNE, 2009). Porém, as citocinas podem causar morte celular durante o desenvolvimento cerebral (DANTZER, 2005; GOLAN *et al.*, 2005; DUNN, 2006; HAVA *et al.*, 2006), ativar o eixo HPA com a liberação do fator liberador de corticotrofina do hipotálamo, que secreta o hormônio adrenocorticotrópico da glândula pituitária, resultando em aumento de glicocorticóides na corrente sanguínea periférica. Esses glicocorticóides têm função básica de frear a ativação do sistema imune. Em níveis elevados no SNC e em exposições crônicas são

prejudiciais ao indivíduo, sendo conhecido como o hormônio do estresse, podendo causar danos, como por exemplo, a morte de neurônios (SAPOLSKY, 2000) (Figura 3).

Figura 3 - Mecanismos de ação do LPS



Fonte: Figura adaptada de GAIKWAD *et al.*, 2016

Estudos anteriores descrevem ainda, desequilíbrios no fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), na resposta hipocampal e periférica de leptina e nos níveis de mieloperoxidase (MPO), redução na expressão de neurônios imunorreativos a parvalbumina e outras modificações crônicas precipitadas pela ativação imune sistêmica, como as alterações comportamentais (COYLE *et al.*, 2003; MEYER *et al.*, 2008a, SHI *et al.*, 2003; PATTERSON, 2009) observadas nos testes de nado forçado (aumento no tempo de imobilidade animal), em vários parâmetros do teste de campo aberto (aumento do tempo no meio, *grooming*), comportamento de risco avaliado pelo teste de odor do gato, déficits sensorio-motor no testes de inibição pré-pulso, interação social e labirinto em Y (memória) (KIRSTEN, 2012).

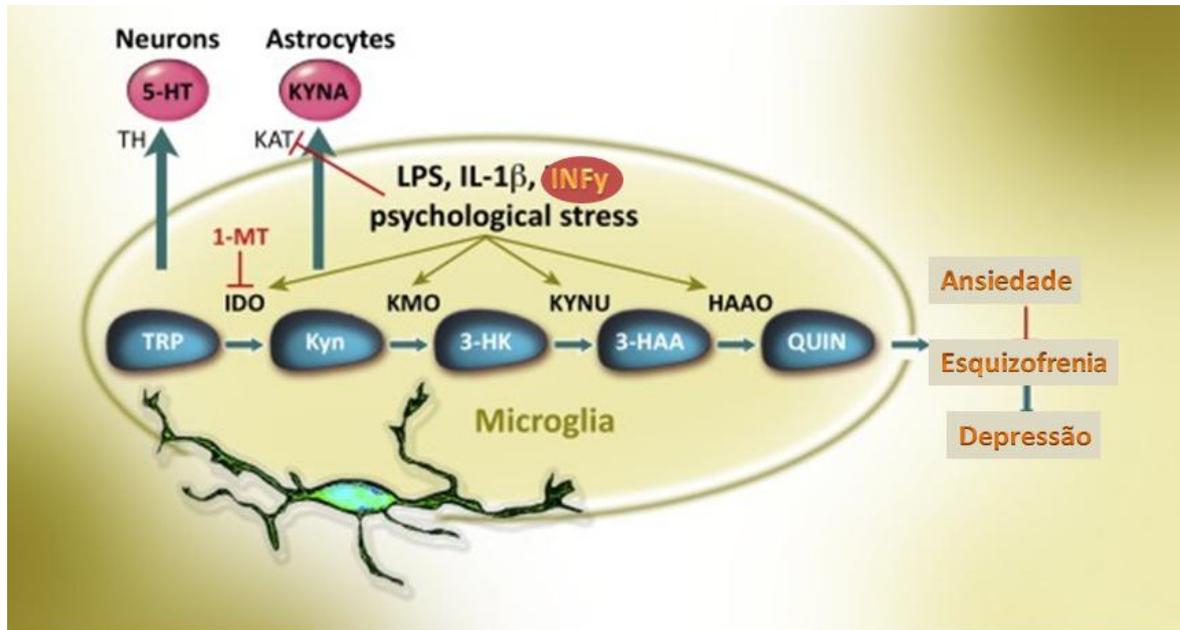
LPS é ainda capaz de produzir a enzima óxido nítrico sintase, que leva a produção do óxido nítrico (Figura 3), que é um importante mediador inflamatório, com ação vasodilatadora, podendo agir também no SNC (ROCHE *et al.*, 2006; MURATORE *et al.*,

2009). Sabendo disso, o estresse oxidativo tem sido proposto como um mecanismo subjacente a interrupções em modelos animais de ativação imune, bem como esquizofrenia e autismo (DO *et al.*, 2000; BOSKA, 2010; GU *et al.*, 2015).

Conforme previamente mencionado, alterações sutis no ambiente imune perinatal podem alterar o curso normal de desenvolvimento, aumentando potencialmente a susceptibilidade ao insulto secundário ao SNC e predispondo a transtornos neuropsiquiátricos como esquizofrenia e autismo na idade adulta (BROWN *et al.*, 2004; SHI *et al.*, 2003; RANTAKALLIO *et al.*, 1997; HOMIG *et al.*, 1999). Durante a vida neonatal precoce, o potencial neurogênico é progressivamente restringido à zona subventricular dos ventrículos laterais e à zona subgranular (SGZ) do giro dentado do hipocampo, com a sua persistência ao longo da idade adulta (GAGE *et al.*, 1998; ERIKSSON *et al.*, 1998; CURTIS *et al.*, 2007). Esta hipótese apoia o papel importante do hipocampo na aprendizagem e na memória. Sob condições fisiológicas, a microglia tem numerosas funções, incluindo a manutenção sináptica (TREMBLAY *et al.*, 2010) e a fagocitose de células recém-nascidas no hipocampo (SIERRA *et al.*, 2010). Em resposta a alterações patológicas no microambiente do SNC, a microglia assume rapidamente um fenótipo "*upregulated*" ou "ativado"; sofrendo alterações na morfologia e expressão do antígeno de superfície, e sintetizando numerosas citocinas pró- e/ou anti-inflamatórias (KREUTZBERG *et al.*, 1996; HANISCH *et al.*, 2002; DAVALOS *et al.*, 2005; NIMMERJAHN *et al.*, 2005). No nível mais amplo este fenótipo ativado pode ser classificado como proinflamatório (M1) ou anti-inflamatório (M2) (COLTON *et al.*, 2009), uma categorização dependente da natureza do perfil inflamatório geral de cada célula, que é influenciado pela natureza e duração do estímulo inflamatório (BUTOVAKY *et al.*, 2006; CACCI *et al.*, 2008). A microglia exibe tanto o potencial neuroprotetor como o potencial neuro-regenerador (BUTOVAKY *et al.*, 2006; STRIET *et al.*, 2002) e, além disso, abrigam atividade microbicida, facilitada pela produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (INNAMORATO *et al.*, 2009; SMITH *et al.*, 2014) (Figura 3).

Outros estudos têm focado em mecanismos potenciais que podem ligar os transtornos neurodesenvolvimentais induzidos por inflamação ao metabolismo do triptofano (TRP) (Figura 4), particularmente no cérebro, onde uma redução na biodisponibilidade do triptofano pode afetar a neurotransmissão serotoninérgica e desempenhar um papel sinérgico na indução de sintomas depressivos (WIDNER *et al.*, 2002; NEUMEISTER, 2003; FITZGERALD *et al.*, 2008).

Figura 4 - A inflamação por LPS no metabolismo do TRP



Fonte: adaptada de YIRMIYA *et al.*, 2015

O aminoácido TRP é o precursor da serotonina (5-HT) e da melatonina pela ativação da triptofano-hidroxilase (TH). O TRP serve como o precursor da via das quinureninas. Pela ativação da IDO, a primeira enzima de degradação do TRP que limita a velocidade na via das quinureninas (RAISON *et al.*, 2006, O'CONNOR *et al.*, 2009a, b). Quando o TRP é desviado pela via das quinureninas há, portanto, menos substrato disponível para formar 5-HT e melatonina. Apesar de a quinurenina (KYNA) não possuir atividade biológica até o momento (CAPURON *et al.*, 2002, RUDDICK *et al.*, 2006), ela serve como substrato na produção de vários metabólitos neuroativos, incluindo ácido quinurênico (KYN) e ácido quinolínico (QUIN) (GUILLEMIN *et al.*, 2005) (Figura 5). A desregulação mediada pela inflamação na via das quinureninas tem sido implicada como um contribuinte para uma série de principais transtornos cerebrais (PÉREZ-DE LA CRUZ *et al.*, 2007), incluindo a depressão (DANTZER *et al.*, 2008a) e a esquizofrenia (ARAÚJO, 2015)(Figura 4).

aos modelos de depressão e ansiedade. A microglia, bem como astrócitos, células endoteliais e neurônios, são todos capazes de produzir IDO (DANTZER *et al.*, 2008a).

2.4 Transtornos neuropsiquiátricos relacionados ao desafio imune neonatal com LPS

As estreitas inter-relações entre o sistema imunológico e o sistema nervoso estão bem documentadas, mas pouco elucidadas. O sistema nervoso controla o funcionamento do sistema imunitário enquanto que as células imunes afetam a atividade nervosa principalmente através de mecanismos de sinalização mediados por citocinas. Essas interações são particularmente importantes na ontogenia precoce quando a diferenciação e a maturação dos neurônios ocorrem em regiões específicas do cérebro. Vários eventos no sistema imunológico dos recém-nascidos podem contribuir para o desenvolvimento de anormalidades comportamentais e transtornos neuropsiquiátricos em adolescentes e adultos (HORNIG *et al.*, 1999; SHI *et al.*, 2003).

Em roedores recém-nascidos, a infecção bacteriana ou a administração de LPS mostram ter efeitos a longo prazo em diferentes funções cerebrais. Dependendo da dose de LPS, do modo e da repetição da administração durante o período neonatal, ocorre dano ao SNC de diferentes gravidades e os efeitos em roedores adolescentes ou adultos podem ser bastante diversos (TISHKINA *et al.*, 2016) (Quadro 1).

As perturbações do neurodesenvolvimento que acompanham alguns desafios imunes são interessantes, dadas as suas semelhanças com o momento e a expressão fenotípica do autismo e da esquizofrenia por exemplo, particularmente no que se refere ao funcionamento cognitivo (ZUCKERMAN *et al.*, 2003, MEYER *et al.*, 2006b e BOKSA, 2010). Os paralelos na patogênese e a inflamação precoce também abrangem comportamento tipo-depressivo, ansiedade e déficits sociais que cursam com alterações neurobioquímicas. Estudos em modelos animais fornecem um apoio convincente para o crescente corpo de evidências epidemiológicas de que as etiologias de algumas doenças psiquiátricas em seres humanos são de origem neurodesenvolvimental (Quadro 1). A exposição a vários insultos durante o período crítico de desenvolvimento, incluindo a do estresse materno pré-natal e a infecção / ativação imune neonatal, alteram a estrutura e a função do cérebro fetal, agindo assim como fatores de risco para aparecimento de psicose mais tarde na vida (MEYER; FELDON, 2010; BILBO e SCHWARZ, 2009).

Quadro 1 - Associação do LPS com transtornos neuropsiquiátricos de acordo com o período neurodesenvolvimental de exposição:

Período de Exposição (NN - neonatal) ou (PN - posnatal) dias*	Dose de LPS	Alterações Observadas	Transtorno Neuropsiquiátrico associado	Autores
NN 9,5	100 µg/kg	Déficits comunicação, cognição, medo Comportamento repetitivo/restrito ↑IL1-β	Autismo	KIRSTEN, 2012
NN 15 e 16	100 µg / kg	↓IPP ↓memória ↓Paralbumina Hipomielinização Déficits cognitivos	Esquizofrenia	WISCHHOF <i>et al.</i> , 2015
PN 3	1 mg/kg	Fenótipos mistos microgliais (M1, M2) ↓comunicação ↓interação Déficits cognitivos	Autismo	PANG <i>et al.</i> , 2016
PN 5	1 mg/kg	↑ TNFα, IL1β, IL6, iNOS Hipomielinização Lesão no desenvolv. subst. branca	Autismo	PANG <i>et al.</i> , 2003
PN 3 e 5	50 µg/Kg	↑comportamentos de ansiedade ↑corticosterona	Ansiedade	WALKER <i>et al.</i> , 2009
PN 3 e 5	50 µg / kg	↑estresse oxidativo ↓interação social	Depressão	MACRAE <i>et al.</i> , 2015
PN 3 e 5	50 µg/Kg	↑comportamentos de ansiedade e depressão ↑corticosterona Comprometimento no eixo HPA e HC (neuroplasticidade e memória)	Depressão	THISHKINA <i>et al.</i> , 2016
PN 3 e 10	100 mg/Kg	↓TNFα, IL-6, IL-10 ↑Neutrófilos		BARTH <i>et al.</i> , 2016

PN 4 e 6	6 mg/kg	↓peso corporal e cerebral Hipoplasia cerebelar Perda neuronal Mielinização retardada		CARDOSO <i>et al.</i> , 2015
PN 7 e 9	500 µg/Kg	↓ Parvalbumina CPF	Esquizofrenia	JENKINS <i>et al.</i> , 2009
PN 10	100 µg/Kg	↑peso corporal ↑ingestão de alimento ↑leptina sérica ↓citocinas HT	Depressão	IWASA <i>et al.</i> , 2010
PN 14	100 µg/Kg	↑IL-6 sérica ↑cox-2 HT	Depressão	KENTNER <i>et al.</i> , 2010

Fonte: próprio autor

Os transtornos neuropsiquiátricos associados ao desafio imune nas fases iniciais do desenvolvimento neurológico com LPS são: Esquizofrenia, Transtornos de Ansiedade, Depressão e Transtorno do Espectro Autista (TEA).

Esquizofrenia

A esquizofrenia é um grave transtorno mental crônico e incapacitante, que afeta aproximadamente 1% da população em geral, com perturbações das funções cognitivas, sociais e comportamentais, comprometendo o pensamento, a vontade própria, percepção, afeto e interação social. As causas são ainda desconhecidas, variando desde influências genéticas, fatores ambientais, disfunções de áreas cerebrais, alterações fisiopatológicas e comprometimentos neurodesenvolvimentais (ARAÚJO, 2015; MONTE, 2013; MORERA-FUMERO; ABREU-GONZALEZ, 2013). Evidências sugerem que um desequilíbrio no sistema imune em períodos críticos do neurodesenvolvimento estaria envolvido na patogênese da esquizofrenia (RIBEIRO, 2013; BORELLA, 2013; MULLER; J. SCHWARZ, 2010). Os sintomas geralmente começam no final da adolescência ou início da idade adulta (15-25 anos) com incidência maior em homens (MEYER; FELDON, 2010). O início da esquizofrenia geralmente é precedida por uma fase prodrômica, caracterizada por sintomas psicóticos subliminares, alta probabilidade de um histórico familiar de esquizofrenia e um declínio nas tarefas do cotidiano (DE LA FUENTE-SANDOVAL *et al.*, 2011). As anormalidades do período psicótico são chamadas sintomas positivos porque refletem a presença de comportamentos anormais como delírios, paranóia, alucinações visuais e auditivas,

pensamentos desordenados e incoerentes e perda da associação normal entre as idéias. Os sintomas do período não psicótico são chamados de sintomas negativos, pois são caracterizados pela ausência de comportamentos sociais e interpessoais. Geralmente são crônicos e os mais difíceis de tratar, como retraimento social, apatia, anedonia e alogia. Já os sintomas cognitivos da esquizofrenia envolvem distúrbios nas funções executivas, como perda de memória, incapacidade de manter a atenção e falta de percepção (MONTE, 2013; MEYER; FELDON, 2010).

Transtornos de Ansiedade

Considerada por especialistas como um mal dos tempos modernos, a ansiedade vem tomando conta do Brasil e do mundo. Trata-se de um dos transtornos neuropsiquiátricos mais comuns que pode levar à redução da qualidade de vida e afetar o funcionamento cognitivo em seres humanos. Subestimado por décadas, esse transtorno mental pode inviabilizar a vida social e a profissional. Levantamentos da Organização Mundial da Saúde (OMS), mostram que atualmente cerca de 65% da população mundial sofre de transtornos de ansiedade [transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), transtorno do pânico, estresse pós-traumático, fobias (agorafobia, fobia social) e ansiedade induzida por substâncias]. O Brasil tem aparecido sempre entre os primeiros das listas da organização. Segundo a Previdência Social, os transtornos mentais já são a terceira razão de afastamentos do trabalho no Brasil, sendo que os gastos do INSS (Instituto Nacional do Seguro Social) giram em torno de R\$ 200 milhões em pagamentos de benefícios anuais (SANTOS; SIQUEIRA, 2010). Esta desordem é uma condição emocional complexa relacionada com o aumento da excitação fisiológica e comportamental após a exposição a eventos estressantes. Os estudos realizados até o momento em animais têm mostrado achados conflitantes dos efeitos da exposição neonatal ao LPS no desenvolvimento de comportamentos relacionados ao aumento de ansiedade (WALKER *et al.*, 2004; SOMINSKY *et al.*, 2012), diminuição ou ausência de alteração (SPENCER *et al.*, 2005; TENK *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013) em roedores. A etiologia está relacionada a genética e a exposição a fatores externos, como o estresse do dia a dia e a qualidade de vida. Com a prevalência no sexo feminino e fatores de risco como: trauma na infância, doenças concomitantes, associação de outros transtornos de personalidade (ex. borderline), genética e abuso de substâncias. Os sinais e sintomas englobam alterações de pressão arterial (hipotensão ou hipertensão), tremores, sudorese, espasmos musculares, fadiga, dificuldade de

concentração, irritabilidade, distúrbios do sono, inquietação, cefaléias, náuseas, alterações gastrointestinais (diarréia, vômito), medo (MAJIDI-ZOLBANIN *et al.*, 2013).

Depressão

Figurando como um dos mais prevalentes transtornos psiquiátricos da humanidade, a depressão está relacionada a um conjunto de alterações comportamentais, emocionais e de pensamento, tais como: afastamento do convívio social, perda de interesse nas atividades do dia a dia, embotamento afetivo, perda do prazer nas relações interpessoais, sentimento de culpa ou autodepreciação, tristeza, melancolia, baixa auto estima, desesperança, diminuição ou ausência de apetite, alterações de peso e do sono, sensação de falta de energia e vigor e dificuldade de concentração (CUSTÓDIO, 2012; MAES *et al.*, 2010; EISENBERGER, 2010). Com uma estimativa de 350 milhões de pessoas afetadas mundialmente, a depressão é a principal causa de incapacidade em todas as faixas etárias, desde os jovens até os idosos, prevalecendo em mulheres. Esse transtorno neuropsiquiátrico pode acarretar em suicídio, cerca de 800 mil pessoas morrem a cada ano, sendo a segunda principal causa de morte entre pessoas com idade entre 15 e 29 anos (OMS, 2016).

Além do papel bem estabelecido das disfunções do sistema monoaminérgico na fisiopatologia da depressão, a hipótese neuroinflamatória mostra uma convicta ligação entre depressão e fenômenos inflamatórios. Existe uma comunicação bidirecional entre o sistema imunológico e o cérebro. Essa comunicação neuroimune é relevante e essencial para montar as respostas imunológicas, fisiológicas e comportamentais adequadas. Estas respostas imunes/inflamatórias inatas elevadas no cérebro estão implicadas na etiologia de vários distúrbios psiquiátricos, incluindo depressão transtornos de ansiedade, autismo e esquizofrenia. O desafio imune é um importante fator predisponente no desenvolvimento desses distúrbios e uma fonte potencial de inflamação no cérebro. A este respeito, um desafio imune, agudo ou crônico, irá desencadear sinais inflamatórios periféricos e centrais (CUSTÓDIO, 2012; MELLO, 2013; RIBEIRO, 2013).

2.5 Transtorno do Espectro Austista (TEA)

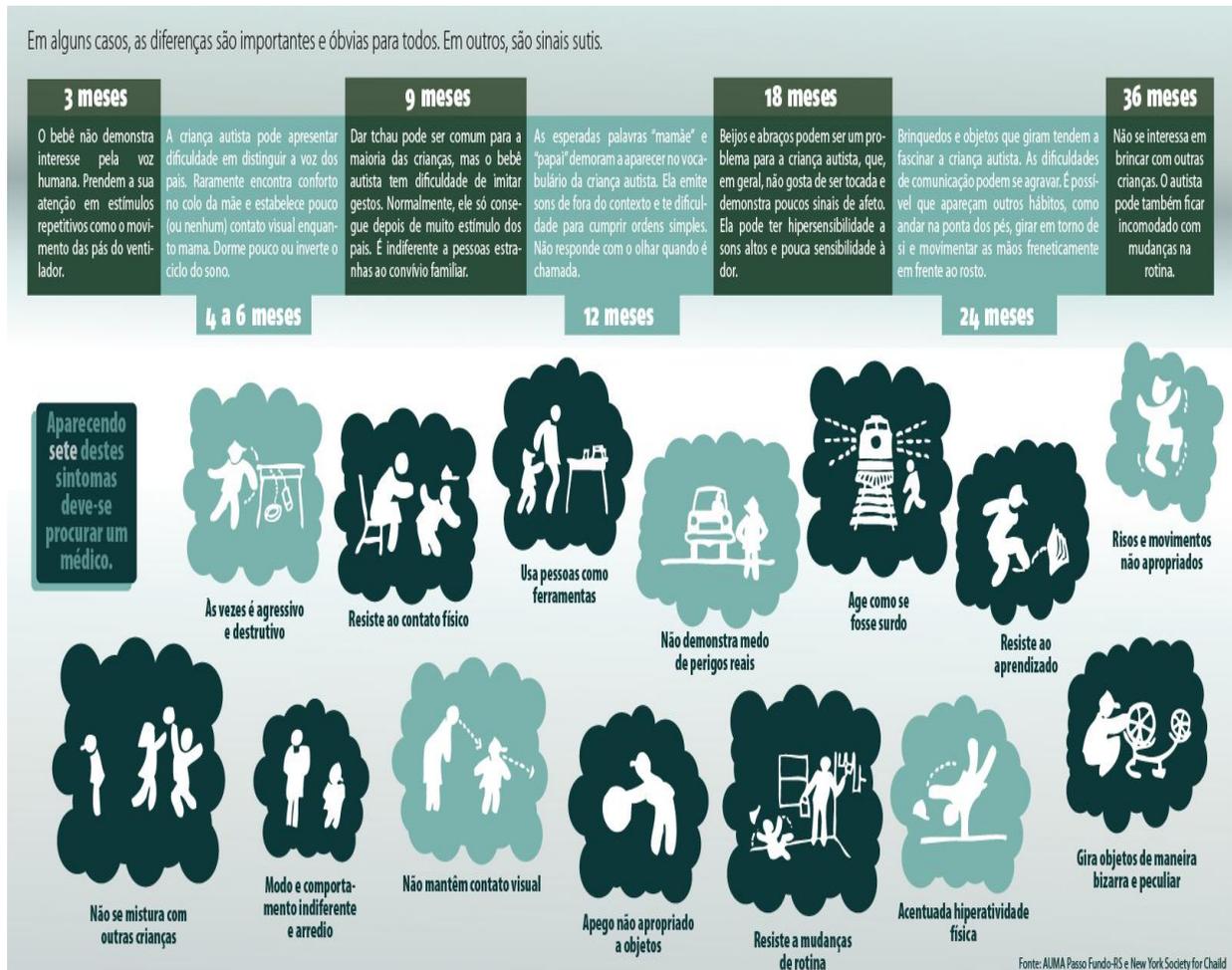
A expressão "autismo" foi utilizada pela primeira vez por Bleuler em 1911, para designar a perda do contato com a realidade, o que acarretava uma grande dificuldade ou impossibilidade de comunicação (AJURIAHUERRA *et al.*, 1977).

É um transtorno psiquiátrico de desenvolvimento importante, ocupando o terceiro lugar entre os transtornos do neurodesenvolvimento, estando à frente das malformações congênitas e da síndrome de Down (GADIA *et al.*, 2004). As incidências relatada de transtorno do espectro autista (TEA), nos Estados Unidos e em outros países, alcançaram 1% da população, sendo diagnosticado quatro vezes mais no sexo masculino que no feminino. Os sintomas costumam ser reconhecidos durante o segundo ano de vida (12 a 24 meses), embora possam ser vistos antes dos 12 meses de idade (DSM-V, 2014) (Figura 6). Apesar de décadas de pesquisa, muito pouco se sabe sobre a etiologia e/ou fisiopatologia do TEA. Este parece ser resultado de uma complexa combinação de fatores ambientais, culturais, neurológicos, imunológicos e genéticos. Seu diagnóstico é difícil principalmente pela ausência de sintomas exclusivos do transtorno e pela diferença na manifestação, quanto à severidade e variedade de sinais. O diagnóstico é eminentemente clínico, sendo que os diferentes achados neuroanatômico-funcionais e genéticos pouco contribuem para esse diagnóstico (PANG *et al.*, 2016; BARAHONA-CORRÊA; FILIPE, 2016; SCHWARZ *et al.*, 2011; LANDRIGAN *et al.*, 2010).

De acordo com a última atualização do Manual Diagnóstico e Estatístico da Associação Americana de Psiquiatria e transtornos mentais (DSM-V, 2014), as características essenciais do transtorno do TEA são prejuízo persistente na comunicação social recíproca e na interação social (Critério A) e padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades (Critério B). Esses sintomas estão presentes desde o início da infância e limitam ou prejudicam o funcionamento diário (Critérios C e D). O estágio em que o prejuízo funcional fica evidente irá variar de acordo com características do indivíduo e seu ambiente. Características diagnósticas nucleares estão evidentes no período do desenvolvimento, mas intervenções, compensações e apoio atual podem mascarar as dificuldades, pelo menos em alguns contextos. Manifestações do transtorno também variam muito dependendo da gravidade da condição autista, do nível de desenvolvimento e da idade cronológica (Figura 6) daí o uso do termo espectro. O transtorno do espectro autista engloba transtornos antes chamados de autismo infantil precoce, autismo infantil, autismo de Kanner, autismo de alto funcionamento, autismo atípico, transtorno global do desenvolvimento sem outra especificação, transtorno desintegrativo da infância e transtorno de Asperger e os classifica em: autismo grave, autismo moderado e autismo leve. Vale ressaltar que na edição anterior, DSM-IV (1994), o TEA era denominado “Transtornos Globais do Desenvolvimento” e

incluía somente Autismo, Asperger, o transtorno invasivo do desenvolvimento sem outra especificação, o transtorno desintegrativo da infância e o transtorno de Rett.

Figura 6 - Manifestações comportamentais do TEA concomitantes ao Neurodesenvolvimento



Diponível em <<http://blogs.piraidigital.com.br/esperanca/files/2015/04/Info-autismo>>

Além da proposta de base genética para o TEA, fatores ambientais como neuroinflamação, presença de estresse oxidativo, disfunção mitocondrial (poluição do ar, metais pesados, etc), desordens bioquímicas, fatores da dieta materna, contaminantes nos alimentos e infecções pré-natais virais foram apontados como capazes de prejudicar o cérebro em desenvolvimento, levando a transtornos neuropsiquiátricos (WING; POTTER, 2002; LARSSON *et al.*, 2005; BOKSA, 2010; HERBERT *et al.*, 2010; BAMBINI-JUNIOR *et al.*, 2011). Particularmente, a resposta inflamatória fetal a infecções intrauterinas parece contribuir para injúrias no cérebro de neonatos e na sua subsequente incapacidade neurológica (MEYER *et al.*, 2009). A esse respeito, existe um crescente número de publicações que relacionam alterações imunes, especialmente durante a gestação, ao TEA. A exposição pré-

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

Encarar processos infecciosos pré-natais/neonatais como indutores do autismo é importante, pois pode ajudar a entender o motivo da alta prevalência desse transtorno, já que qualquer indivíduo está constantemente exposto a infecções ao longo da vida, especialmente as gestantes, que são consideradas imunossuprimidas. Reforça ainda a importância do período pré-natal para o estabelecimento de terapias de prevenção para o TEA.

Para diagnosticar o Autismo, são utilizados critérios descritos no Manual de Diagnóstico e Estatístico da Associação Americana de Psiquiatria (DSM), mencionado anteriormente, que evoluiu com o passar dos anos, separando o Autismo da Esquizofrenia, obtendo nova forma de diagnóstico: Transtorno do Espectro Autista - TEA (DSM-V - F84.0 - 299.00).

2.6 Diferenças de gênero e possíveis mecanismos associados a transtornos neuropsiquiátricos

Sabe-se que transtornos neurodesenvolvimentais apresentam uma maior incidência em homens. Neste contexto, o autismo é mais prevalente em homens, com uma razão de prevalência homem:mulher de 4,2:1 (CDC, 2014; FOMBONNE, 2009). Na esquizofrenia a incidência também é maior em homens. Já em mulheres os sintomas se manifestam mais tardiamente (THOMAS *et al.*, 2010). Além disso, nos homens há uma maior severidade, alterações cerebrais mais pronunciadas e uma maior refratariedade ao tratamento (WONG; VAN TOL, 2003). Já os transtornos de depressão e ansiedade prevalecem mais em mulheres que em homens (OMS, 2016).

Diferenças de sexo na fisiologia e função do sistema imune periférico de vertebrados já foram documentadas por décadas. Estudos têm mostrado que as fêmeas de muitas espécies geralmente apresentam aumento da resposta imune e da resistência à infecção em comparação aos machos (SCHWARZ; BILBO, 2012). Estas diferenças entre os sexos têm sido atribuídas, em grande parte, às ações imunomoduladoras de hormônios esteróides sexuais. Em geral, o estradiol exógeno tem efeitos estimulantes na imunidade humoral, mas pode aumentar ou suprimir a imunidade mediada por célula, dependendo da dose. A testosterona exógena geralmente deprime a imunidade tanto humoral como mediada por células, aumentando a susceptibilidade a infecções bacterianas e virais. Baseado na diferença entre o número de células gliais e os níveis de moléculas do sistema imune entre machos e fêmeas, é provável que haja efeitos sexo-dependentes na função do sistema neuroimune em resposta a um desafio imunológico na fase inicial da vida, fazendo com que machos e as fêmeas possam apresentar respostas diferentes à ativação neonatal do sistema imunológico (BART *et al.*, 2016).

As diferenças sexuais nos efeitos da vida (processos neurais básicos, comportamentos e resposta á modelos animais) são bem conhecidos (BRUNTON *et al.*, 2015, DAVIS; EMORY, 1995; PAPAIOANNOU, 2002) e resultados anteriores também demonstraram resposta atenuada a citocinas em fêmeas tratadas com LPS no período neonatal (KENTNER *et al.*, 2010). Os hormônios femininos, especialmente o estrógeno, são conhecidos para exercer efeitos anti-inflamatórios, influenciando a função e produção de citocinas (BAKER, 2004; LIAO *et al.*, 2002; SCHWARZ *et al.*, 2012), embora haja também evidências que as fêmeas podem produzir mais reações imunes humorais, sendo mais resistentes e sofrem uma maior incidência de doenças auto-imunes em comparação com os machos (BOUMAN *et al.*, 2005). Outro estudo citou os efeitos de um desafio de LPS neonatal no teste de preferência à sacarose como uma medida de anedonia e expressão hipotalâmica de COX-2 alterada em machos, indicando uma diferença de sexo em que LPS neonatal (PN14) causa elevada expressão basal de COX-2 hipotalâmica em machos, mas não em fêmeas, sugerindo uma dissociação entre inflamação e comportamento anedônico e um efeito diferencial da inflamação neonatal em machos e fêmeas. É importante verificar como as fêmeas respondem ao LPS neonatal (KENTNER *et al.*, 2010).

Portanto, o entendimento das repercussões e mecanismos pelos quais desafios imunes no período neonatal podem gerar alterações duradouras ao longo da vida consiste em tema atual e de grande relevância. A alta prevalência de crianças que passam por situações

adversas no período neonatal, incluindo processos infecciosos e/ou inflamatórios, justificam a preocupação em conhecer os efeitos dessas intervenções sobre a resposta a situações adversas na vida adulta. Assim, este estudo pretende contribuir demonstrando - em animais machos e fêmeas – um possível conjunto de alterações em longo prazo desencadeadas pelo desafio imune neonatal por LPS. O conhecimento dessas alterações comportamentais e mecanismos associados pode possibilitar um avanço na busca de ações preventivas ou terapêuticas que visem a diminuição de morbidades muito prevalentes em nosso meio, como o TEA, a esquizofrenia, os transtornos de ansiedade e depressão. Vale salientar que a grande maioria dos estudos com LPS neonatal foram conduzidos em animais administrados entre os PNs 3 e 5, enquanto no presente trabalho os desafios ocorreram nos PNs 5-7.

3. HIPÓTESE

A exposição de camundongos machos e fêmeas ao desafio imune neonatal (PN5 e 7) pela administração sistêmica de LPS de *Escherichia coli* acarretaria alterações comportamentais e neuroquímicas dependentes do sexo e manifestadas de formas distintas durante a adolescência (PN35) e idade adulta (PN70) que se assemelhariam a transtornos neuropsiquiátricos de origem desenvolvimental como o TEA.

4. OBJETIVO GERAL

Determinar as principais alterações comportamentais e neuroquímicas em diferentes fases do desenvolvimento animal [PN35 (correspondente a adolescência humana) e PN70 (idade adulta)] induzidas pela administração neonatal (PN5 e 7) sistêmica de LPS de *E. coli* (50µg/kg) em camundongos machos e fêmeas.

4.1. Objetivos específicos

- ❖ Determinar em camundongos machos e fêmeas tratados com LPS sistêmico nos dias pós-natais (PN) 5 e 7 e testados na idade adolescente (PN35) e adulta (PN70), as alterações comportamentais avaliadas pelos seguintes testes:
 - ✓ Inibição Pré-pulso (IPP): Avalia a atenção e a resposta sensório-motora dos animais;
 - ✓ Nado forçado: Avalia sintomas negativos ou depressivos (imobilidade);
 - ✓ Preferência por sacarose: Avalia sintomas negativos ou depressivos (anedonia);
 - ✓ Interação social: Avalia interesse social;
 - ✓ Y maze: Avalia Memória espacial de trabalho;
 - ✓ Odor do gato: Avalia comportamento de risco (medo);
 - ✓ Campo aberto: Avalia parâmetros de ansiedade, comportamento estereotipado, repetitivos, atividade locomotora e exploratória.

- ❖ Avaliar as alterações imunológicas e neuroquímicas em áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipotálamo e hipocampo), relacionadas aos transtornos neuropsiquiátricos descritos anteriormente, de camundongos machos e fêmeas tratados com LPS sistêmico nos dias pós-natais (PN) 5 e 7 e testados na adolescência (PN35) e idade adulta (PN70):
 - ✓ Resposta inflamatória por atividade da mieloperoxidase (MPO), níveis de interleucinas IL4, IL-6, INF γ e neurotrofinas pelo Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF);
 - ✓ Níveis de triptofano, serotonina (5-HT) e ácido quinolínico pela via da quinureninas no hipocampo;
 - ✓ Níveis de estresse nitrosativo pela determinação dos níveis de nitrito;
 - ✓ Expressão proteica deIDO e parvalbumina.

5. METODOLOGIA

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas (pesando 20g) provenientes do Biotério Central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Os animais acasalados foram mantidos em caixas de polipropileno condicionando um casal por caixa, e, após o nascimento, os filhotes foram randomizados de diferentes ninhadas para aumentar a variabilidade genética, permanecendo com as mães até o desmame com 21 dias de nascidos. Nesta idade os animais foram separados por sexo e colocados em caixas com no máximo 08 animais, à temperatura média de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água à vontade. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) gerando o número de protocolo 15/16 e os experimentos foram realizados de acordo com as normas internacionais de uso de animais em experimentação.

5.2 Drogas e soluções

O LPS foi obtido por extração fenólica a partir da bactéria *Escherichia coli*, sorotipo 055: B5 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). A solução salina, empregada tanto para fazer a solução de LPS, como para o tratamento do grupo controle, foi constituída por solução aquosa de NaCl estéril a 0,9%. A dose de LPS administrada nos animais dos grupos experimentais foi de $50\mu\text{g}/\text{kg}$ animal (WALKER *et al.*, 2009; MACRAE *et al.*, 2015; THISHKINA *et al.*, 2016).

5.3 Protocolo experimental e tratamento

Nos dias pós-natais (PN) 05 e 07 (correspondentes ao último trimestre da gestação humana), os filhotes de camundongos foram tratados com 50 µg/kg de LPS de *E. coli* ou solução salina estéril (grupos controle) num volume de 20 µl / 5 g de peso corporal via intraperitoneal (ip). A separação materna para o tratamento durou no máximo 5 minutos. Imediatamente após a administração, os filhotes foram devolvidos para suas mães, onde permaneceram até os 21 dias de nascidos. Após o desmame, foram separados por sexo e distribuídos em 08 grupos e avaliados comportamental e neuroquimicamente na adolescência (PN35) e na idade adulta (PN70), conforme o quadro abaixo:

Quadro 2 - Distribuição dos grupos experimentais

GRUPO	DROGA	SEXO	DOSE(µg/kg)	VIA ADM.	IDADE p/ADM. (PN)	IDADE p/TESTES (PN)
1	Salina	Macho	-	Ip	05 e 07 dias	35 dias
2	Salina	Fêmea	-	Ip	05 e 07 dias	35 dias
3	LPS	Macho	50	Ip	05 e 07 dias	35 dias
4	LPS	Fêmea	50	Ip	05 e 07 dias	35 dias
5	Salina	Macho	-	Ip	05 e 07 dias	70 dias
6	Salina	Fêmea	-	Ip	05 e 07 dias	70 dias
7	LPS	Macho	50	Ip	05 e 07 dias	70 dias
8	LPS	Fêmea	50	Ip	05 e 07 dias	70 dias

5.4 Testes comportamentais

5.4.1 Inibição Pré-pulso (IPP)

O modelo da Inibição Pré-pulso (IPP) do sobressalto, que oferece uma medida operacional do filtro sensorio-motor refletido pela capacidade de inibição de um reflexo de sobressalto, quando um estímulo sensorial é precedido por outro de menor intensidade (HOFFMAN e ISON, 1980). A habilidade de discriminar estímulos externos de relevância fisiológica ou cognitiva, fornecida pelo filtro sensorio-motor, está comprometida em indivíduos com determinados transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia, o TEA e a depressão (SALUM *et al.*, 2008; CUSTÓDIO *et al.*, 2012).

A IPP é uma forma de plasticidade do reflexo do sobressalto, caracterizada por uma redução normal no sobressalto em resposta a um estímulo auditivo intenso (pulso), quando este é precedido imediatamente (30-500 ms) por um estímulo mais fraco (pré-pulso) (BRAFF *et al.*, 2001).

Inibição Pré-Pulso (IPP) é caracterizada pela redução do reflexo de sobressalto a um estímulo acústico intenso (pulso), quando imediatamente precedido por um estímulo de menor intensidade (pré-pulso) (HOFFMAN e ISON, 1980; SWERDLOW *et al.*, 2008). A reação corporal dos camundongos a um estímulo acústico, no presente trabalho, foi monitorada em uma câmara (INSIGHT equipamentos científicos – Brasil modelo EP-175) conectada a um tubo (diâmetro 8,2 cm, comprimento 20 cm) montada em uma caixa fechada ventilada.

Os camundongos foram colocados em um contensor (4,5 × 5,0 × 5,5 cm) consistido de barras de aço inoxidável de 3,0 mm de diâmetro com espaçamento de 0,8 centímetros de distância. O contensor foi mantido preso sobre uma balança, chamada de plataforma de resposta, através de quatro miniaturas parafusos. Um alto-falante localizado a 15 cm do contensor, foi usado para fornecer os estímulos de pulso, pré-pulso e ruído de fundo. O contensor, a plataforma e o alto-falante foram localizados dentro de uma câmara acústica ventilada (64 × 60 × 40 cm) (figura 7). Procedimentos de calibração foram realizados antes dos experimentos para garantir sensibilidades equivalentes das plataformas de resposta ao longo do período de teste.

A sessão de testes começou ao colocar um animal no contensor para a aclimatação, este procedimento consistiu em uma exposição de 5 minutos ao ruído de fundo (65 dB). Após o período de aclimatação os camundongos foram apresentados a uma série de 10 estímulos de treino (pulso sozinho - 120 dB, 50 ms de duração), com um ensaio de inter-intervalo de 20s. O objetivo desta fase foi permitir a habituação da resposta de sobressalto do animal. Posteriormente, a modulação IPP de sobressalto foi testada no seguinte protocolo: consistiu de 74 ensaios pseudorandomizados dividido em oito categorias diferentes, apresentados com um intervalo inter-estímulos de 20s: 20 apresentações de pulso sozinho (120 dB, 50 ms de duração), 8 apresentações de cada intensidade de pré-pulso sozinho (70,75 e 80 dB, frequência 3000 Hz, 20 ms de duração), 10 apresentações de cada intensidade de pré-pulso + intensidade de pulso (com intervalo de 50 ms entre pré-pulso e pulso) e ausência de estímulo, nesse bloco o animal só recebe o estímulo do ruído de fundo (LEVIN *et al.*, 2011). São utilizadas três intensidades de pré-pulso diferentes para que o teste tenha maior veracidade, como se fosse o mesmo feito em triplicata.

A média da amplitude de resposta de sobressalto aos ensaios de pulso sozinho (P) e pré-pulso + pulso (PP + P) foi calculada para cada animal. O nível de IPP em cada camundongo foi definido como a porcentagem da redução da amplitude do sobressalto nos ensaios de PP + P em comparação com a amplitude do sobressalto nos ensaios de P, de acordo com a seguinte fórmula: $\% \text{ PPI} = 100 - [100 \times (\text{PP} + \text{P} / \text{P})]$. Usando esta fórmula, um valor de IPP de 0% denota que não houve diferença entre a amplitude da resposta de sobressalto do pulso sozinho e do pré-pulso + pulso, conseqüentemente, não houve IPP (LEVIN *et al.*, 2011).

Figura 7 - Aparelho de Inibição pré-pulso

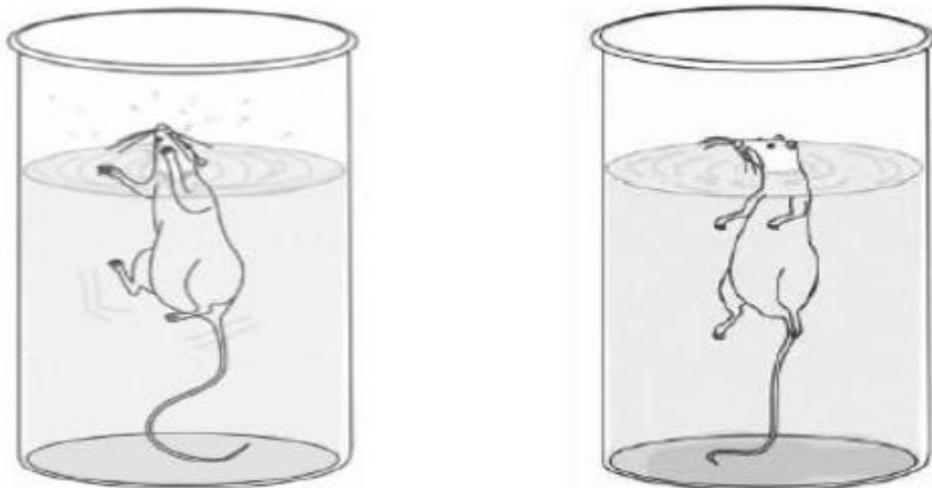


Fonte: MONTE, 2013

5.4.2 Teste do Nado Forçado

Nos dias pós-natais 35 e 70, os animais previamente (PN5 e 7) tratados com LPS ou salina foram colocados individualmente em um cilindro de acrílico (25 cm de altura, 10 cm de diâmetro) contendo 8 cm de água mantida a 22-24 ° C. Após 1 minuto de habituação, o tempo de imobilidade (em segundos) dos animais foi avaliado durante 5 minutos, em um tempo total de 6 minutos no interior do cilindro (figura 8). A imobilidade foi definida como a ausência de ação, fuga orientada e comportamentos tais como: natação, salto, cheiro, ou mergulho. Um aumento na duração da imobilidade é indicativo de um comportamento de tipo depressivo (PORSOLT *et al.*, 1978).

Figura 8 - Ilustração do Teste de nado forçado



Fonte: QUEVEDO *et al.*, 2013

5.4.3. Teste da preferência à sacarose

O teste de preferência à sacarose foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos do LPS sobre as medidas de anedonia nos animais com comportamentos do tipo-depressivo (MAO *et al.*, 2009). Os animais passaram por uma etapa de adaptação com a solução de sacarose 1% da seguinte forma: 72 horas antes do teste, foram colocadas, em cada gaiola, duas garrafas com solução de sacarose 1% p/v e 24 horas depois, uma das garrafas de sacarose 1% foi trocada por uma garrafa contendo água. Depois da adaptação, os animais foram privados de água e comida por 24 horas. O teste foi realizado após 24 horas de jejum, com os animais alocados em gaiolas individuais tendo livre acesso as duas garrafas contendo 100 ml de solução de sacarose 1% e 100 ml de água cada uma. Após 1 hora, os volumes de

solução de sacarose 1% e de água foram medidos e a preferência pela sacarose foi calculada em valores percentuais, através da razão entre o volume consumido de sacarose 1% e o volume consumido total somando-se os volumes de sacarose 1% e água e multiplicando o resultado dessa razão por 100, como mostra a equação a seguir:

$$\text{Preferência pela Sacarose (\%)} = \frac{\text{Consumo de Sacarose (ml)}}{\text{Consumo de Sacarose (ml)} + \text{Consumo de Água (ml)}} \times 100$$

5.4.4 Teste de Interação Social

Sintomas negativos foram avaliados pelo teste de interação social. Os animais foram colocados em uma caixa de acrílico 60 × 40 cm dividida em três compartimentos. Nas câmaras das extremidades foram colocadas gaiolas de ferro, uma com um camundongo desconhecido e do mesmo sexo (câmara social) e outra vazia (câmara oposta), o meio da caixa era deixado livre (figura 9). Os animais eram colocados cuidadosamente no compartimento central e durante 5 minutos exploravam livremente todos os compartimentos da caixa através de uma pequena abertura (6 × 6 cm) que permitia o acesso (RADYUSHKIN *et al.*, 2009). Nesse teste foi avaliado o tempo que o animal teste permaneceu explorando o compartimento com animal e sem animal, bem como o percentual de tempo que ele ficou explorando o compartimento com o animal em relação ao tempo total do teste. Foi tempo gastado em cada uma das três câmaras, e a preferência social definida como: (% o tempo gastado na câmara social) – (% o tempo gastado na câmara oposta).

Figura 9 - Teste de Interação Social



Disponível em: <<http://www.cebiolog.com.br/comportamento--labirinto--rastreamento.html>>

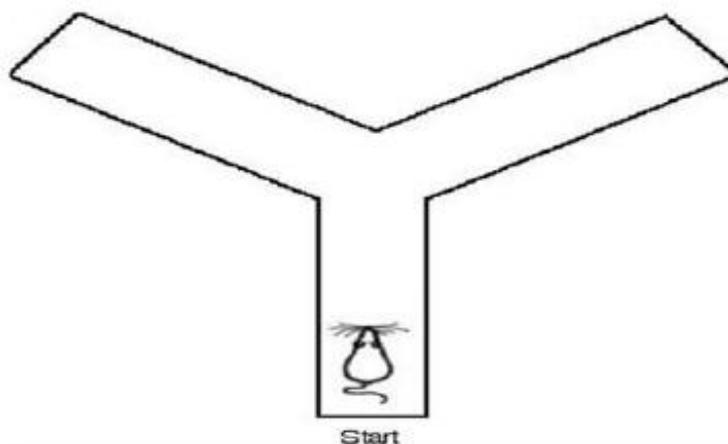
5.4.5. Teste labirinto em Y (Y-maze)

O teste de labirinto em Y foi realizado com o objetivo avaliar os efeitos da memória de trabalho espacial de curto prazo (LI *et al.*, 2010). Como o labirinto em Y é baseado na tendência dos roedores para explorar ambientes novos, para manter a novidade da tarefa, foi conduzido em animais diferentes na PN 35 e 70 dos grupos LPS e controle tratados no período neonatal (5 e 7).

O labirinto em Y é constituído de três braços idênticos (75,5 cm de comprimento, 34,5 cm de altura e 11,7 cm de largura), dispostos a 120° um do outro, formando um triângulo central (figura 10). Os animais foram colocados em um dos braços e a sequência das entradas nos braços foi registrada durante oito minutos. A alternância foi definida como a entrada nos três braços, em qualquer ordem, sem que houvesse repetição dos braços (por exemplo, 123, 321, 231) (SARTER *et al.*, 1988). O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço eles entraram por último (STONE *et al.*, 1991). Após o teste, os animais foram devolvidos às suas caixas-moradia e realizado a assepsia do labirinto em Y com álcool etílico a 15% entre um animal e outro. Assim, a percentagem das alterações foi calculada como a razão entre as alterações corretas (n) e o número de visitas realizadas durante o período de observação (n-2), multiplicado por 100.

$$\% \text{ Alterações espontâneas} = n / n-2 \times 100$$

Figura 10 - Ilustração representativa do teste de labirinto em Y



Fonte: STONE *et al.*, 1991

5.4.6 Teste de odor de gato

Sabe-se que Autistas podem não demonstrar medo de situações potencialmente perigosas (DSM-IV, 1994). Para verificar tal aspecto, foi utilizado o modelo de estímulo olfativo aversivo com o odor de gato. Camundongos adolescentes (PN35) e adultos (PND 70) expostos neonatalmente ao LPS ou a salina (um filhote macho e uma fêmea de cada ninhada, $n = 8$ para cada grupo) foram utilizados para este experimento. A metodologia empregada neste experimento foi adaptada de Andrews *et al.* (1993) e Zangrossi e File (1992).

Os camundongos foram expostos a duas condições de odor: de gato ou neutra. Todos os odores empregados neste experimento foram coletados em pedaços de tecidos (18 x 22 cm) retirados de uma mesma toalha de algodão de cor branca. O odor de gato foi obtido esfregando vigorosamente por cinco minutos um pedaço de tecido umedecido contra os pêlos de um gato doméstico (fêmea, sem raça definida, com seis anos de idade e 3,5 kg). Esse procedimento foi realizado uma hora antes da sessão experimental. O tecido impregnado com o odor de gato foi mantido em um saco plástico vedado até o início dos experimentos. Cada tecido com o odor de gato foi utilizado em apenas quatro sessões contínuas de exposição. Para o teste com o odor neutro, também foi utilizado um pedaço de tecido umedecido, só que sem contato com gatos. Os experimentos foram realizados em uma sala pequena com luz fraca e a exposição ao odor neutro procedeu à exposição ao odor de gato para evitar traços de odor de gato no grupo neutro. Antes da primeira exposição ao odor de gato, o pano impregnado foi deixado por dez minutos na sala teste. Os testes foram realizados sempre entre às 8h00 e 10h00.

Os camundongos foram expostos individualmente aos odores em gaiolas-moradia, iguais as anteriormente citadas, com uma tampa de acrílico transparente substituindo a tampa metálica, para facilitar a visualização do comportamento animal. Esta tampa possuía furos para permitir a respiração do animal, assim como um compartimento opaco (caixa rasa de polipropileno), no mesmo lado que a alimentação ficava na tampa metálica (figura 11). Esse compartimento servia de abrigo para o animal. A altura entre o assoalho e a tampa era de 16cm. Os animais foram expostos em suas gaiolas-moradia à tampa de acrílico nos dois dias anteriores ao teste, por um período de dez minutos cada, com o intuito de habituá-los ao aparato. Imediatamente antes da exposição ao odor de gato, dois camundongos, um do grupo controle e um do grupo experimental, foram retirados do biotério e carregados em gaiolas

moradia até a sala do teste. As duas gaiolas-moradia foram então colocadas lado a lado e um tecido com odor de gato foi colocado entre as duas gaiolas, na extremidade oposta aos compartimentos de abrigo. Cada sessão de exposição durou cinco minutos e foi registrada por uma câmera de vídeo localizada no teto da sala experimental. As gravações foram analisadas posteriormente. Para cada rato, foram avaliados o número de vezes que estes entraram em contato com o tecido (contato físico direto ou a partir de uma distância menor ou igual a cinco centímetros do tecido), o tempo gasto em contato com o tecido, o número de vezes que os animais entraram no compartimento de abrigo, e o tempo gasto sob o abrigo (KIRSTEN, 2012).

Figura 11 - Teste do odor do gato (t = tecido empregnado com odor do gato; a = abrigo lado oposto)



Fonte: KIRSTEN , 2012

5.4.7 Campo aberto

Com a finalidade de analisar os efeitos do tratamento neonatal a longo prazo com LPS sobre a atividade locomotora e padrões de ansiedade, os animais foram avaliados no teste do campo aberto (figura 12). A arena para o teste é feita de acrílico (30 cm × 30cm) rodeado por paredes de 15 cm de altura e com o chão dividido em nove quadrados iguais. Os animais foram cuidadosamente colocados no centro do campo e foi permitido que eles explorassem livremente o cenário por 1 min (período de habituação). A atividade exploratória do animal foi registrada durante 5 minutos (ARCHER, 1973). Os parâmetros avaliados foram: o número de quadrados atravessados com as 04 patas pelo animal [(*crossings*)] testa a atividade

locomotora do animal], tempo no quadrante do meio da arena (parâmetro de ansiedade), número de *groomings* (comportamento estereotipado de auto-limpeza, repetitivo, restrito) e *rearings* (atividade exploratória vertical). Os experimentos foram realizados em uma sala de som atenuada, sob baixa intensidade de luz vermelha.

Figura 12 - Teste de campo aberto



Fonte: próprio autor

5.5 Testes Neuroquímicos

Imediatamente após a última determinação comportamental, os animais foram decapitados e as áreas cerebrais do córtex pré-frontal (CPF), do hipocampo (HC) e do hipotálamo (HT) foram dissecadas sob gelo e armazenadas a -80°C para a determinação de IL-4 e IL-6. Foram utilizados homogenatos para atividade da mieloperoxidase (MPO) preparados a partir de tecidos frescos. Os níveis de BDNF, $\text{INF}\gamma$, nitrito, expressão proteica de parvalbumina e IDO e os metabólitos da via das quinureninas (triptofano, serotonina e ácido quinolínico) foram avaliados no HC.

5.5.1 Ensaio para Mieloperoxidase (MPO)

A atividade extracelular de MPO fornece uma estimativa do estresse oxidativo em doenças inflamatórias (PULLI *et al.*, 2013). A MPO é uma enzima presente nos grânulos de neutrófilos. Essa enzima é utilizada como indicador de processo inflamatório, mais especificamente, como marcador de migração de neutrófilos dos tecidos. Neste ensaio, a H_2O_2

é clivada por meio da MPO presente nas amostras de tecido. O radical oxigênio (O°) resultante se combina com diidrocloreto de θ -dianisidina que é convertido a um composto colorido. O aparecimento deste composto, ao longo do tempo, é medido por espectrofotômetro para determinar o conteúdo de MPO do ensaio (BRADLEY, 1982). Imediatamente após a decapitação, as áreas cerebrais foram homogeneizadas (50mg/ml) em uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB) em tampão fosfato 50mM, pH 6,0. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados (14000 rpm, 4°C) por 2 minutos. Foram retirados 30 μ L do sobrenadante da amostra e adicionados a placa de ELISA juntamente com 200 μ L da solução contendo 0,167 mg/ml de hidrocloreto de θ -dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi medida nos tempos 0 e 3 minutos com comprimento de onda de 450nm (BRADLEY, 1982).

5.5.2 Teste de ELISA para Dosagem das citocinas IL-6, IL-4 e IFN γ

As áreas cerebrais dissecadas foram homogeneizadas em 8 volumes de tampão PBS com protease (EMD Biosciences) e fosfatase (Sigma-Aldrich) e inibidores centrifugadas (10000 rpm, 5 min). A concentração das citocinas, em 50 μ L de amostras foi determinada por ELISA (R&D Systems DuoSet DY406 e DY404 para camundongos, Minneapolis, MN, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante e expressa em pg / g de tecido.

5.5.3 Determinação dos Níveis de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) por ELISA

Após homogeneização das áreas cerebrais a 20 volumes de tampão PBS pH 7,4 foi adicionado inibidores de protease (Sigma-Aldrich). O nível de BDNF de cada amostra foi quantificado por ensaio imunoenzimático (ELISA; R&D Systems, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em picograma de BDNF/ mg de proteína total.

5.5.4 Determinação dos níveis de Nitrito

Para avaliar os efeitos do LPS na produção de NO, foram determinados níveis de nitrito em homogenatos dos cérebros dos camundongos imediatamente após a decapitação em todos os grupos. Após centrifugação ($800 \times g/10$ min), o sobrenadante do homogeneizado foi coletado e a produção determinada com base na reação de Griess (RADENOVIC e SELAKOVIC, 2005). Para esse experimento 100 μ L do reativo de Griess (sulfanilamida a 1% / cloridrato de N-(1-naftil)- etilenediamina 0.1% / ácido fosfórico a 5% / água destilada, na proporção de 1:1:1:1) foi adicionado a 100 μ L do sobrenadante do homogenato tecidual e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO_2 (variando de 0,75 a 100 mM) sob as mesmas condições. Os brancos foram preparados pela adição de 100 μ L do reativo de Griess a 100 μ L do tampão usado para o homogenato e a absorbância foi medida em leitor de microplacas em 560 nm, expressa em pg/g de nitrito de tecido úmido (Green and Goldman 1981).

5.5.5 Expressão protéica de Parvalbumina e IDO

Para avaliar a expressão protéica de Parvalbumina e IDO hipocampais, realizou-se a técnica de Western Blotting. Seguiram-se sequencialmente as seguintes etapas: extração de proteínas, dosagem de proteínas e *Western Blotting*.

5.5.5.1. Extração de proteínas

O hipocampo foi macerado com auxílio de cadinho e pistilo em nitrogênio líquido. O produto desse processo foi inserido em microtubo contendo 100 μ l de tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (SigmaAldrich, EUA, 1 μ L de inibidor de protease: 100 μ L de RIPA). Em seguida, as amostras foram vortexadas por 30 segundos, a cada 10 min por 30 min, e centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo.

5.5.5.2 Método Bradford para dosagem de proteína

A concentração das proteínas totais nas amostras foram determinada pelo emprego de reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate - BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). A ligação à proteína ocorre quando absorção máxima da solução ácida Coomassie Brilliant Blue G-250 muda de 465 para 595 nm. Foram pipetados 160 μL de amostra e 40 μL de solução de Bradford nas placas e a leitura foi feita por espectrofotômetro (595 nm), utilizando-se uma curva de calibração de albumina bovina sérica (BSA) de 0,2 a 1,0 mg / mL.

5.5.5.3 Western Blotting

Inicialmente, preparou-se 50 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β-mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 s, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 V nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 V para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 V por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos primários anti-parvalbumina (1:1000; Abcam, USA) IgG ou anti-IDO IgG (1:50; Abcam, USA) ou anti-α- tubulin IgG primary antibody (1:4000; Sigma, USA) diluídos em 1% de BSA em TBS-T. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBS-T. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit IgG (1:1000; Invitrogen, USA) ou HRP-goat anti-mouse IgG (1:1000; Sigma, USA) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas 4 vezes, duração de 10 min cada, com TBS-T. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, Clarity western ECL blotting substrate) e as membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ImageQuant 300 Imager (GE Healthcare, EUA). A densidade das bandas foi mensurada por meio do software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA).

5.5.6 Quantificação do triptofano e seus metabólitos por HPLC

Os níveis cerebrais de triptofano e seus metabólitos (ácido quinolínico e serotonina) foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Waters Alliance, e2695). As áreas cerebrais (hipocampus) foram utilizadas para preparar homogenatos a 20%. Os tecidos cerebrais foram macerados em ácido perclórico (HClO₄) a 1% por 40 segundos e centrifugados por 15 minutos, 12.000rpm, 4°C. O sobrenadante foi separado e uma alíquota de 10µl foi injetado no HPLC.

Para determinar a concentração do triptofano e de seus metabólitos foi utilizada uma coluna C18, 150 x 4,6 mm, 4µ (PHENOMENEX®). A fase móvel foi composta de duas fases: A (acetato de sódio grau HPLC-SIGMA® - 0,1M, pH 6,2); B (acetonitrila grau HPLC (TEDIA®) 100%). Correu em gradiente de fluxo conforme o quadro abaixo:

Quadro 3 - Gradiente de fluxo para determinação simultânea de triptofano e seus metabólitos por HPLC

Tempo (min)	Fluxo (µl)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	0,5	94	6
4	0,5	80	20
10	0,5	80	20
11	1	80	20
18:30	1	80	20
19	0,5	94	6
24	0,5	94	6

Fonte: Adaptado de PRESITS *et al.*, 2003

As soluções padrão de triptofano (SIGMA®) e seus metabólitos (SIGMA®) foram preparados com fase móvel A (ácido quinolínico, serotonina e triptofano) nas concentrações de 0,2mM. Os cromatogramas foram registrados e quantificados pelo software (Empower 3 Chromatography Data Software: Waters). As concentrações de ácido quinolínico, serotonina, e triptofano nas áreas cerebrais foram determinadas por comparação com os padrões injetados no HPLC no dia do experimento (PRESITS & MOLNÁR-PERL, 2003).

5.5.7 Análise Estatística

Para a análise de IPP foi realizada a ANOVA de três vias por medidas repetidas seguida por Bonferroni como teste *post hoc*. Os fatores utilizados para esta análise foram "intensidades de PP" (70, 75 e 80) x "desafio por LPS" (controle e LPS) x "Idade" (PN35 e 70) e "Sexo" (macho e fêmea). As demais análises foram realizadas por análise de variância univariada de três vias (ANOVA) com o teste post hoc de Bonferroni considerando os fatores "desafio por LPS" (controle e LPS) x "Idade" (PN35 e 70) e "Sexo" (macho e fêmea). Os níveis de IFN γ , nitrito, metabolitos da via das quinureninas, expressão protéica relativa de parvalbumina eIDO e os níveis de BDNF foram analisados por ANOVA de duas vias considerando "Sexo" e "desafio por LPS" como fatores entre sujeitos com Bonferroni como teste *post hoc*. O nível de significância foi estabelecido em $P \leq 0,05$. As análises foram realizadas com o *software* SPSS (Versão 23 para Windows).

6. RESULTADOS

6.1 Resultados comportamentais

Conforme observado na figura 13, uma interação significativa entre "sexo" x "LPS" foi observada na análise IPP (ANOVA: $[F(1,58) = 5,344, P = 0,024]$). O teste de Bonferroni revelou que as fêmeas desafiadas por LPS em PN35 (Fig. 10A) apresentaram déficit significativo no % IPP no PP80 ($P = 0,044$), enquanto no PN70 (Figura 10B) esse déficit foi observado nas fêmeas desafiadas com LPS nos três PPs avaliados (PPs70 e 75: $P = 0,001$, PP80: $P = 0,006$). Em ambas as idades a significância foi observada em comparação com os animais controle (tratados com solução salina) em função do sexo e idade.

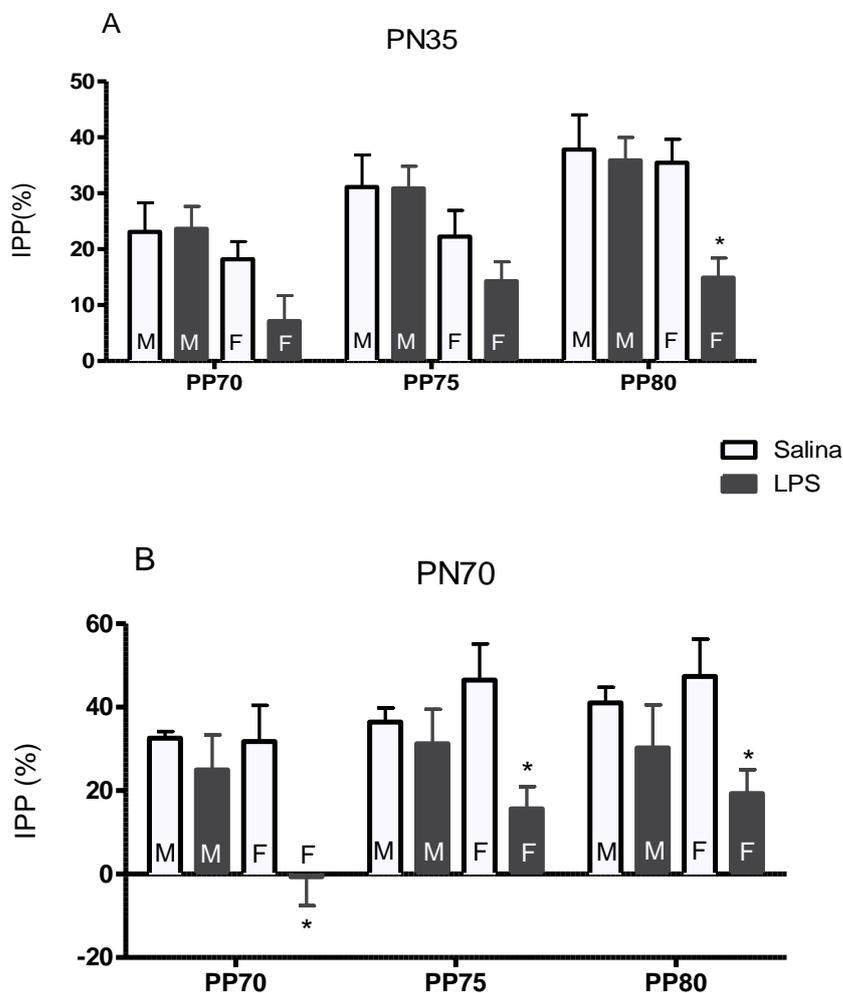


Figura 13 - Efeito do desafio neonatal por LPS sobre % de IPP nos dias pós-natais (PN) 35 (A) e PN70 (B). Os neonatos machos ou fêmeas receberam LPS ou salina via i.p. no PN5 e 7. As barras são médias \pm SEM ($n = 8-12$ animais / grupo). Os dados foram analisados utilizando ANOVA de três vias seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. * $P < 0,05$ vs camundongos salina pareados por sexo e idade. Abreviaturas: M = Masculino; F = Feminino.

Em seguida, avaliamos o comportamento depressivo (figura 14A) e a anedonia (figura 14B). Na avaliação do comportamento tipo-depressivo pelo tempo de imobilidade no teste de nado forçado (figura 14A) houve uma interação significativa entre os fatores "sexo" x "desafio por LPS" [ANOVA: $F(1, 54) = 16,375$, $P = 0,000167$]. O teste post hoc revelou que o desafio imune por LPS provocou um aumento significativo no tempo de imobilidade em camundongos machos no PN35 ($P < 0,0001$) e PN70 ($P < 0,01$) em comparação com controles pareados por idade e sexo. Adicionalmente, observou-se que camundongos machos tratados neonatalmente com salina, apresentaram maior tempo de imobilidade no PN35 quando comparados aos animais avaliados em PN70 ($P < 0,05$). O mesmo aumento no tempo de imobilidade foi observado no PN35 quando comparados com PN70 ($P < 0,01$) no grupo de camundongos machos desafiados com LPS neonatal. Não foram observadas alterações significativas no teste de preferência de sacarose (figura 14B).

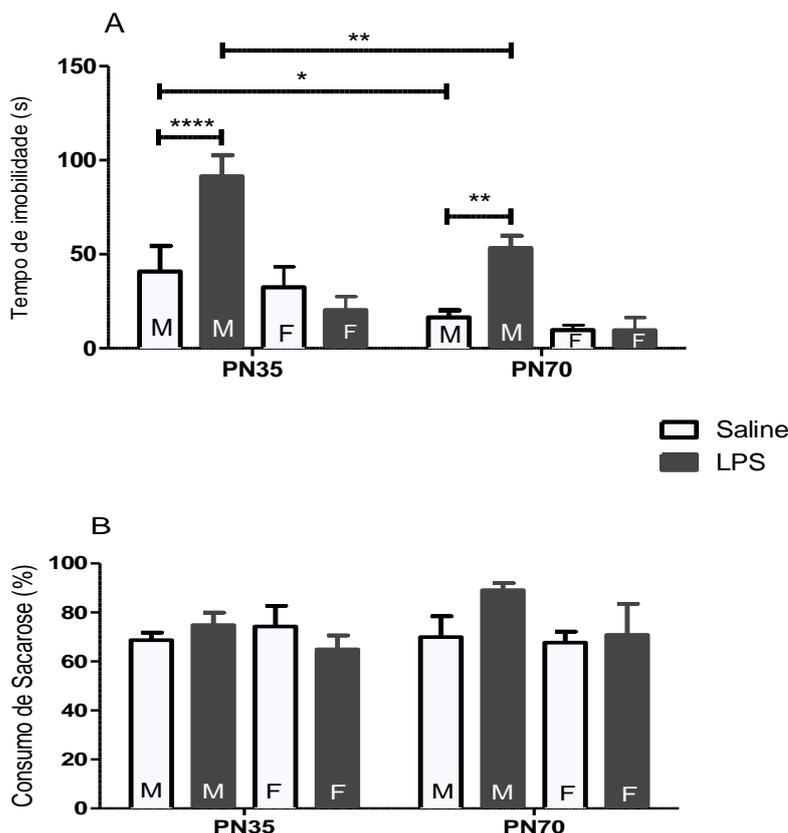


Figura 14 - Efeito do desafio neonatal de LPS em % de tempo de imobilidade (A) e o consumo de sacarose (B) no dia pós-natal PN35 e PN70. Os neonatos machos ou fêmeas receberam LPS ou salina via i.p no PN5 e 7. Barras representam médias \pm SEM (N = 10-12 animais / grupo). Os dados foram analisados utilizando ANOVA de três vias seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$. Abreviaturas: M = Masculino; F = Feminino.

Na análise da preferência social (figura 15A) não foram observadas alterações significativas de comportamento. Em relação à avaliação da memória de trabalho no labirinto em Y, apesar da ausência de interação significativa entre os fatores, o teste post hoc revelou déficits significativos na memória de trabalho em animais machos desafiados neonatalmente por LPS e avaliados no PN35 quando comparados com os respectivos controles de idade e sexo pareados ($P < 0,05$) (figura 15B). No Teste de odor do gato (figura 15C) houve uma interação significativa de três vias, "idade" x "sexo" x "Desafio por LPS" [$F(1,45) = 16,869$, $P = 0,000167$]. O teste post hoc mostrou que os o grupo de camundongos machos desafiado por LPS avaliados no PN35 apresentaram aumento significativo no tempo de contato com o pano impregnado com odor do gato quando comparado com o controle pareado por idade e sexo ($P = 0,0001$).

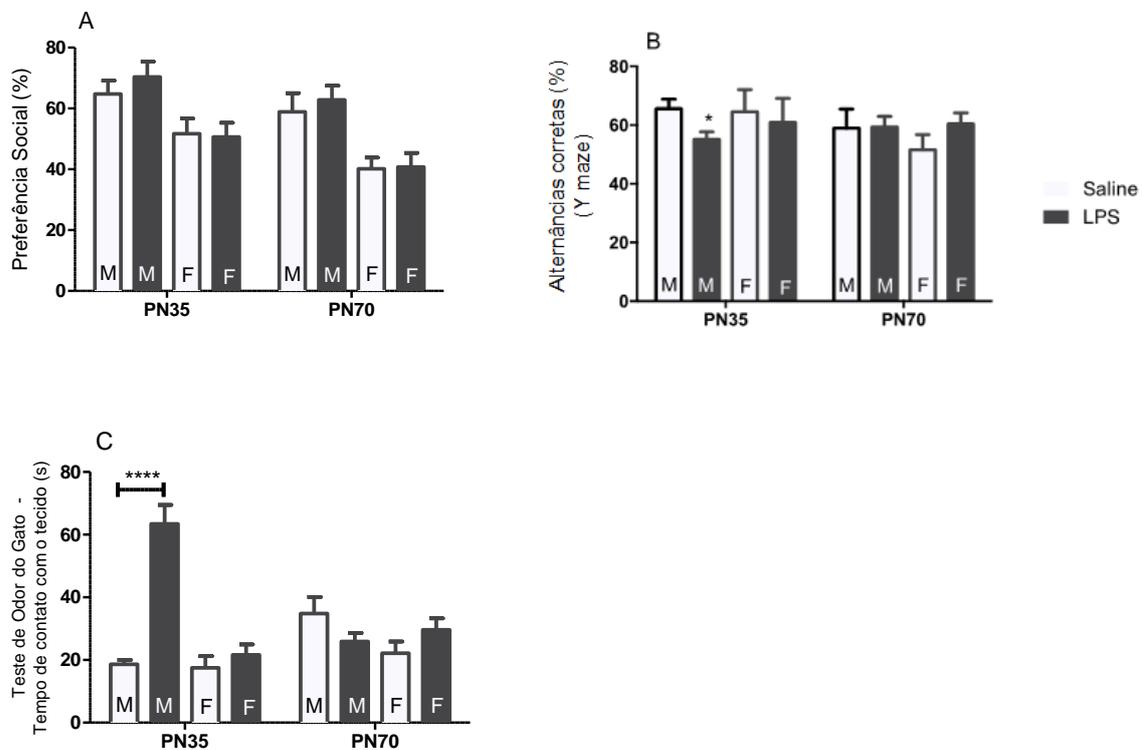


Figura 15 - Efeito do desafio neonatal com LPS em % de preferência social (A), % correto alternâncias (B) e tempo de contato do pano (C) observados no dia pós-natal PN35 e PN70. Os neonatos machos ou fêmeas receberam LPS ou salina via i.p nos PNs5 e 7. As barras são médias \pm SEM ($n = 10-12$ animais / grupo). Os dados foram analisados utilizando ANOVA seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. * $P < 0,05$ vs. tratamento com solução salina Camundongos compatíveis com idade e sexo, **** $P < 0,0001$. Abreviaturas: M = Masculino; F = Feminino.

Nenhuma alteração significativa na atividade locomotora de camundongos foi registrada (figura 16A). Por outro lado, uma interação significativa entre "sexo" x "desafio por LPS" foi observada na análise do comportamento de grooming [F (1,75) = 7,058, P = 0,010] (Fig. 13B). O teste de Bonferroni mostrou maior comportamento de *grooming* em camundongos machos avaliados em PN35 quando comparados com animais tratados com salina na mesma idade (P = 0,001) (figura 16B). Observou-se também que camundongos machos desafiados com LPS apresentaram uma diminuição significativa no tempo gasto no centro do campo aberto PN35 (P = 0,001) e 70 (P = 0,002) quando comparados com os respectivos controles salina na idade e sexo (figura 16C). Adicionalmente, observou-se aumento do tempo gasto no centro do campo no PN35 nos animais machos tratados com salina quando comparado com as fêmeas tratadas também com solução salina (P = 0,013) (ANOVA de tempo gasto no centro do campo: "sexo" x "Desafio por LPS" [F (1, 75) = 10,647, P = 0,002]).

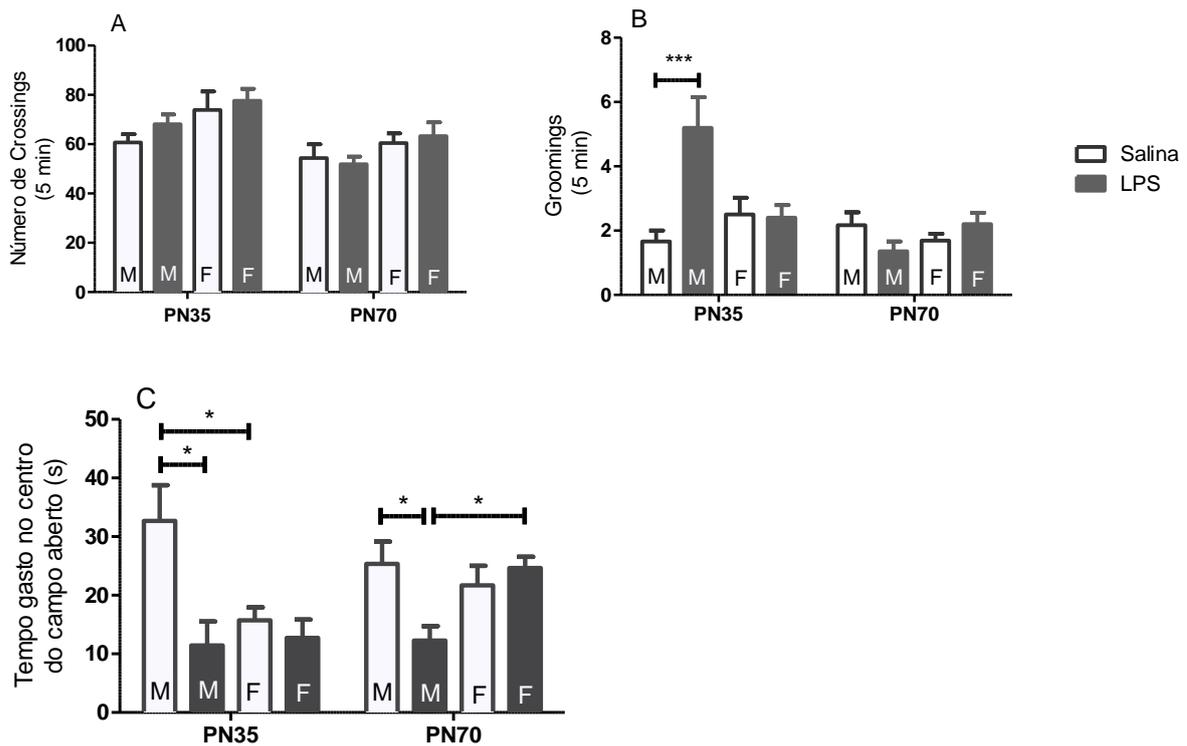


Figura 16 - Efeito do desafio neonatal do LPS no número de cruzamentos (A), *grooming* (B) e tempo gasto no centro do campo (C) no dia pós-natal (PN) 35 e PN70. Os neonatos machos ou fêmeas receberam LPS ou salina via i.p no PN5 e 7. As barras são médias \pm SEM (n = 10-12 animais/grupo). Os dados foram analisados utilizando ANOVA de três vias seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. *P < 0,05, ***P < 0,001. Abreviaturas: M = Masculino; F = Feminino.

6.2 Resultados das análises neuroquímicas

A atividade da MPO (Fig. 17A-C) foi significativamente aumentada no CPF ($P=0,04$), HC ($P = 0,005$) e HT ($P <0,0001$) em PN35 e no HC em PN 70 ($P <0,05$) de camundongos machos desafiados por LPS neonatal em comparação com o seus respectivos controles pareados por sexo e idade. As fêmeas não apresentaram alteração na atividade da MPO. No análise da atividade de MPO observamos interações significativas apenas no HT ("idade" x "desafio por LPS") [$F(1,42) = 6,7, P = 0,01$] e "sexo" x "desafio LPS" [$F(1, 42) = 12,415, P = 0,013$].

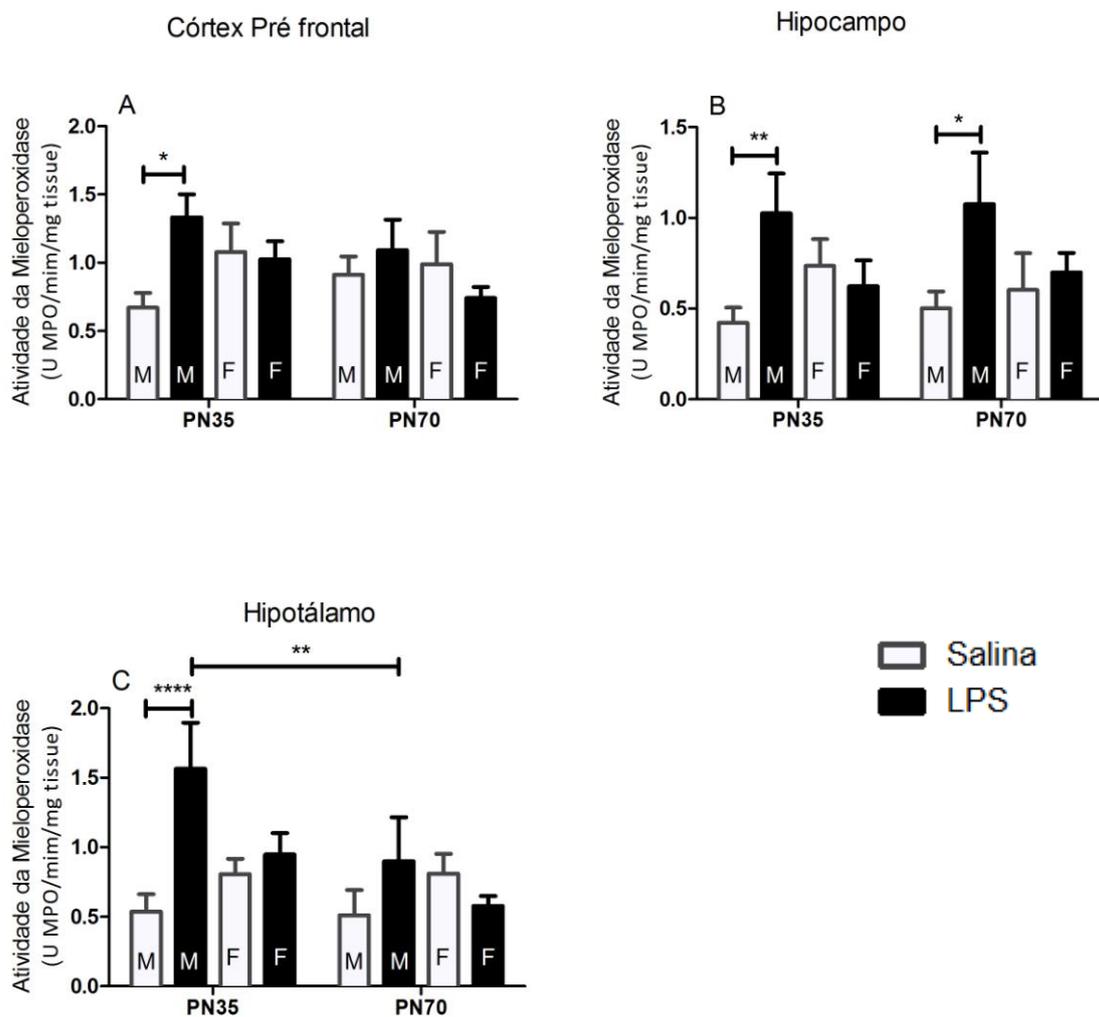


Figura 17 - Efeito do desafio neonatal com LPS na atividade de mieloperoxidase (MPO) [Córtex pré-frontal (A), hipocampo (B) e hipotálamo (C)] no dia pós-natal (PN) 35 e PN70. Os neonatos machos ou fêmeas receberam LPS ou salina via i.p no PN5 e 7. Barras são médias \pm SEM ($n = 10-12$ animais / grupo). Os dados foram analisados ANOVA seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$.

Em relação aos níveis de IL-4 (figura 18A-C), observou-se uma interação significativa no CPF (ANOVA: "idade" x "sexo" x "desafio LPS" [$F(1,48) = 8,278, P = 0,006$]). O teste post hoc de Bonferroni mostrou que no CPF, HC e HT de machos desafiados por LPS houve aumentos significativos nos níveis de IL-4 em ambas as idades estudadas em comparação com camundongos tratados com solução salina. Nas fêmeas, IL-4 aumentou significativamente no CPF e HC de animais adolescentes (PN35) e no HC e HT de camundongos adultos (PN70). Curiosamente, nos machos adultos os aumentos nos níveis de IL-4 induzidos por LPS foram significativos em todas as áreas do cérebro estudadas quando comparadas com as fêmeas.

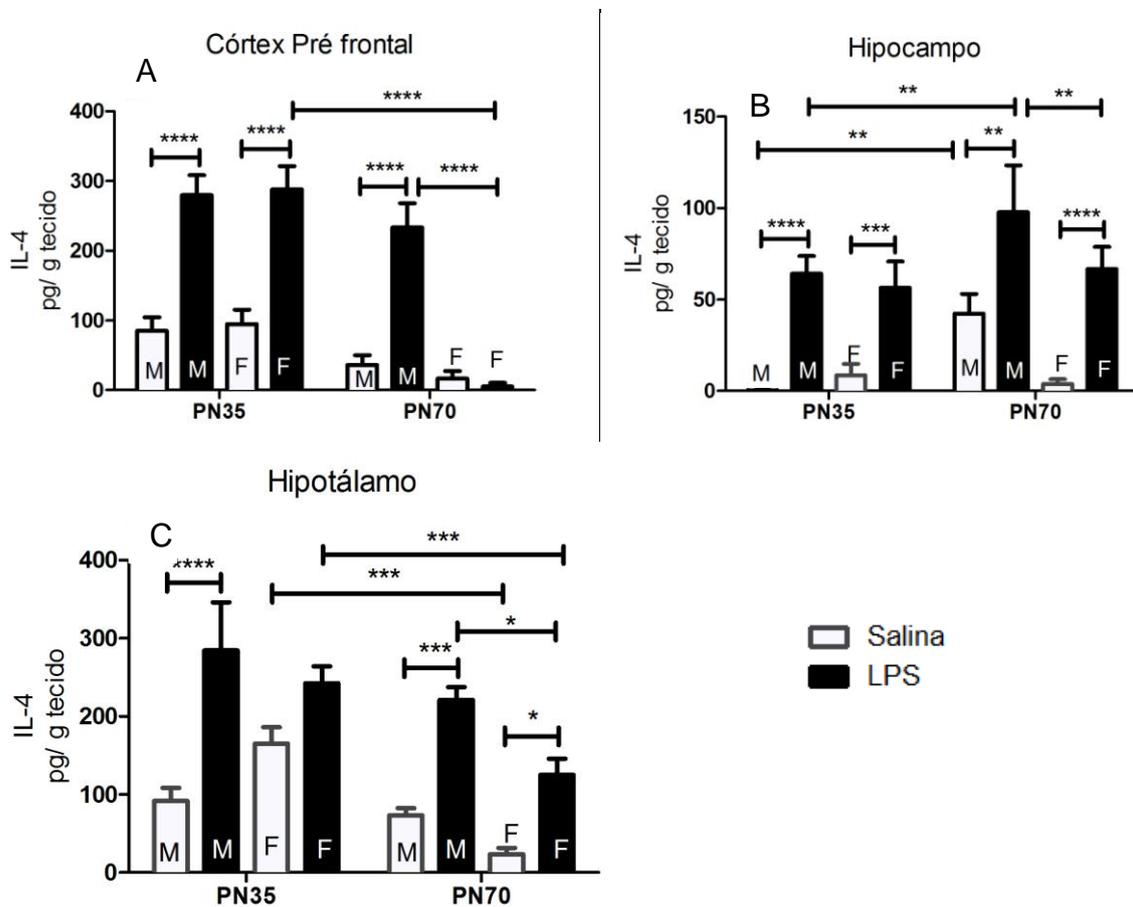


Figura 18 - Efeito do desafio neonatal com LPS na IL-4 [córtex pré frontal (A), hipocampo (B) e hipotálamo (C)] no dia pós-natal (PN) 35 e PN70. Os neonatos machos ou fêmeas receberam LPS ou salina via i.p no PN5 e 7. Barras são médias \pm SEM (n = 10-12 animais / grupo). Os dados foram analisados ANOVA seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$.

Na análise de IL-6 (Fig. 19A-C) tanto no CPF como no HC, foi observada a interação entre "sexo" x "desafio por LPS" (ANOVA: CPF - [F (1,45) = 7,876, P = 0,007]; HC - [F (1,43) = 6,977, P = 0,011]), enquanto que no HT houve uma interação significativa de "sexo" x "idade" x "desafio por LPS" (ANOVA: [F (1,42) = 5,69, P = 0,022]). O teste post hoc mostrou que os níveis de IL-6 diminuíram significativamente nos CPF, HC e HT de fêmeas quando comparados, em idade e sexo, com os animais tratados com salina. Especialmente na HT os níveis de IL-6 foram aumentados em fêmeas tratadas neonatalmente com solução salina e avaliadas em PN70 quando comparado ao mesmo grupo experimental avaliados em PN35.

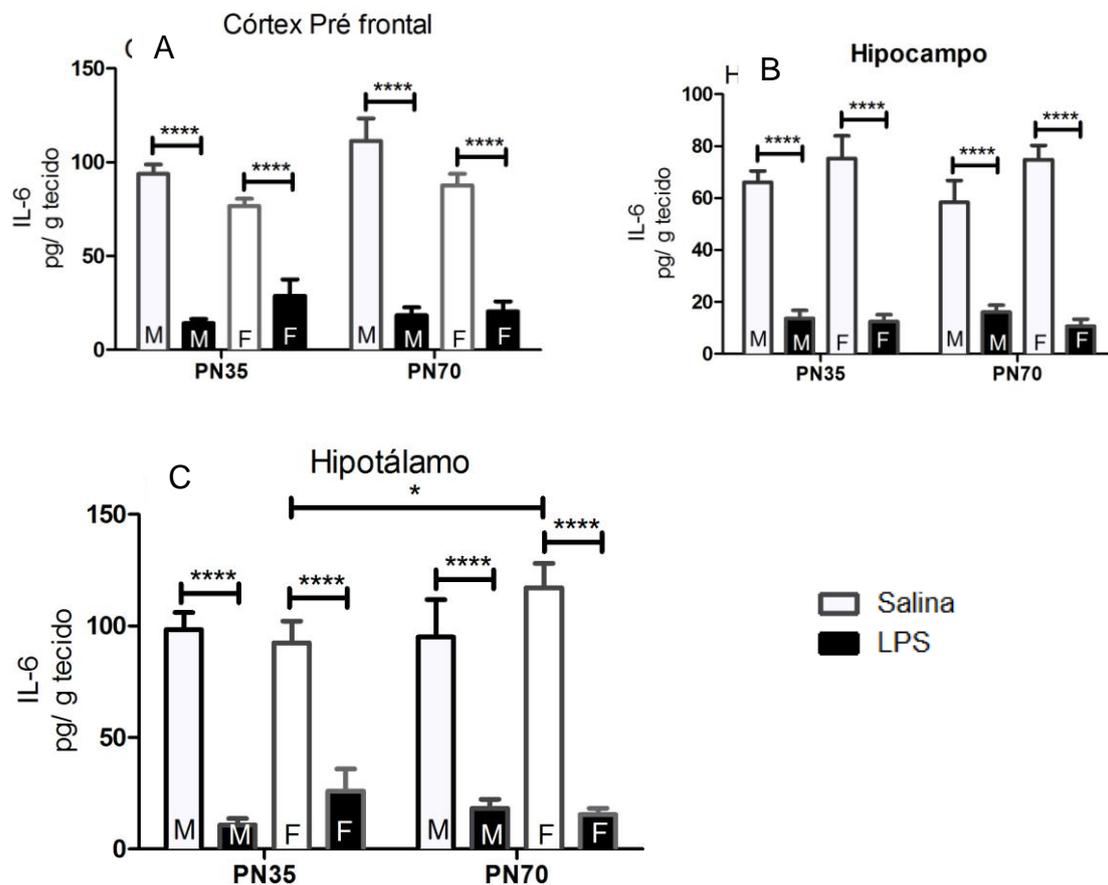


Figura 19 - Efeito do desafio neonatal com LPS na IL-6 [córtex pré-frontal (A) Hipocampo (B) e hipotálamo (C)] no dia pós-natal (PN) 35 e PN70. Os neonatos machos ou fêmeas receberam LPS ou salina via i.p no PN5 e 7. Barras são médias \pm SEM (n = 10-12 animais / grupo). Os dados foram analisados ANOVA seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 **** P < 0,0001.

Em relação aos níveis de BDNF, houve aumento significativo dos níveis desta neurotrofina no HC de camundongos adolescentes (PN35) e adultos (PN70), tanto em machos como fêmeas desafiados com LPS neonatal quando comparados com os respectivos controles salina ($P < 0,0001$), sem interação significativa entre fatores (figura 20).

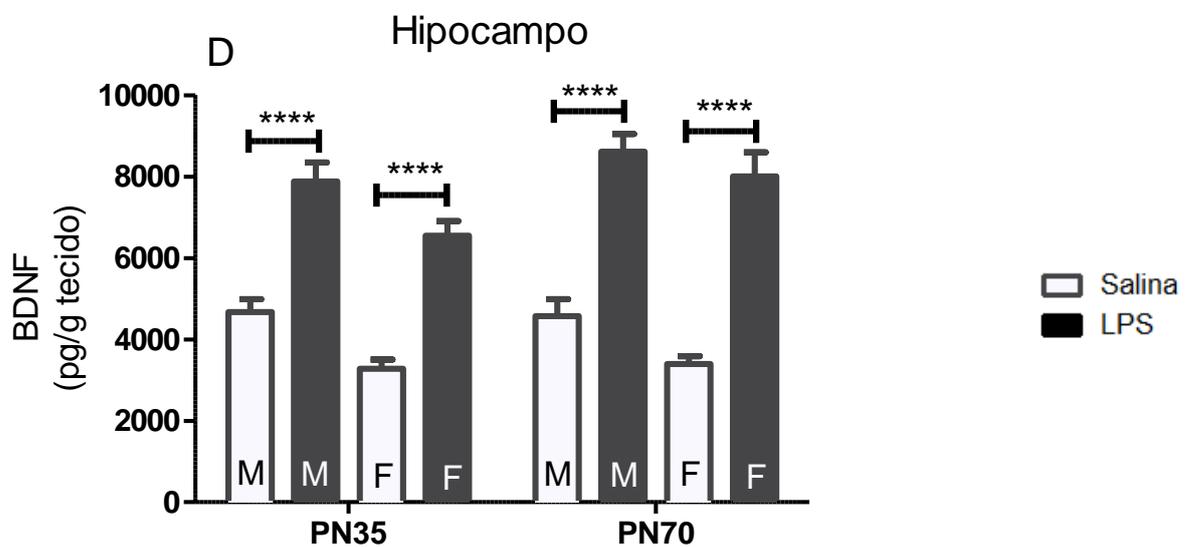


Figura 20 - Efeito do desafio neonatal com LPS nos níveis de BDNF no hipocampo de camundongos adolescentes (PN35) e adultos (PN70). Os neonatos machos ou fêmeas receberam LPS ou salina via i.p no PN5 e 7. As barras são significativas \pm SEM ($n = 10-12$ animais / grupo). Os dados foram analisados ANOVA seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ versus ratinhos com idade e sexo compatíveis com soro fisiológico.

A ANOVA de duas vias dos resultados de IFN γ revelou não haver interação entre os fatores, embora o teste post hoc mostre que os níveis de IFN γ no HC de ambos os grupos desafiados com LPS machos ($P < 0,0001$) e fêmeas ($P < 0,0001$) foram aumentados quando comparado com os respectivos camundongos dos grupos controle tratados com salina, com correspondência sexual (figura 21).

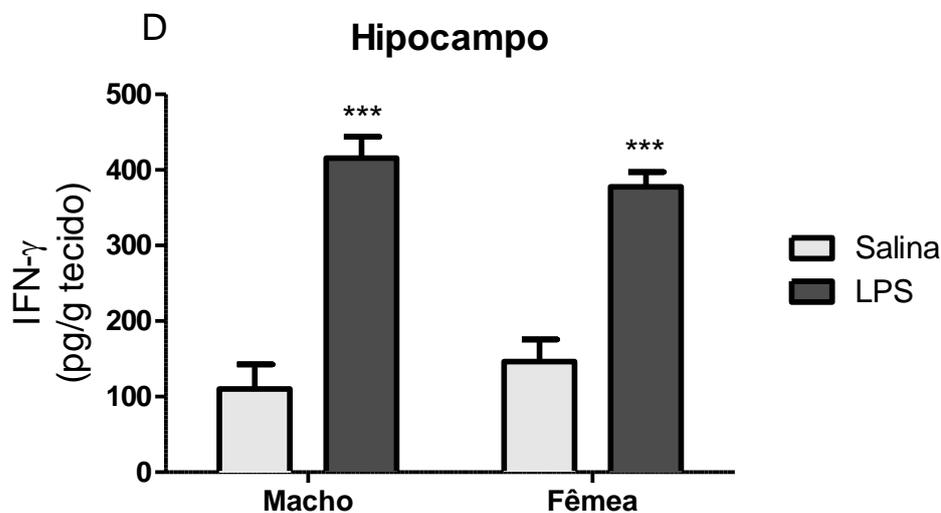


Figura 21 - Efeito do desafio neonatal com LPS nos níveis de IFN- γ no hipocampo de camundongos adultos (PN70). Os neonatos machos ou fêmeas receberam LPS ou salina via i.p no PN5 e 7. As barras são significativas \pm SEM ($n = 10-12$ animais / grupo). Os dados foram analisados ANOVA seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ versus ratinhos com idade e sexo compatíveis com soro fisiológico.

Houve aumento de 18 vezes nos níveis de nitrito no HC de camundongos machos adultos (PN70) desafiados neonatalmente com o LPS, quando comparados com o grupo controle salina ($P < 0,0001$) (ANOVA: "sexo" x "desafio por LPS: [F (1, 21) = 46,32, $P < 0,0001$]) (figura 22). Nos grupos de fêmeas desafiadas com LPS neonatal, os níveis de nitrito permaneceram inalterados.

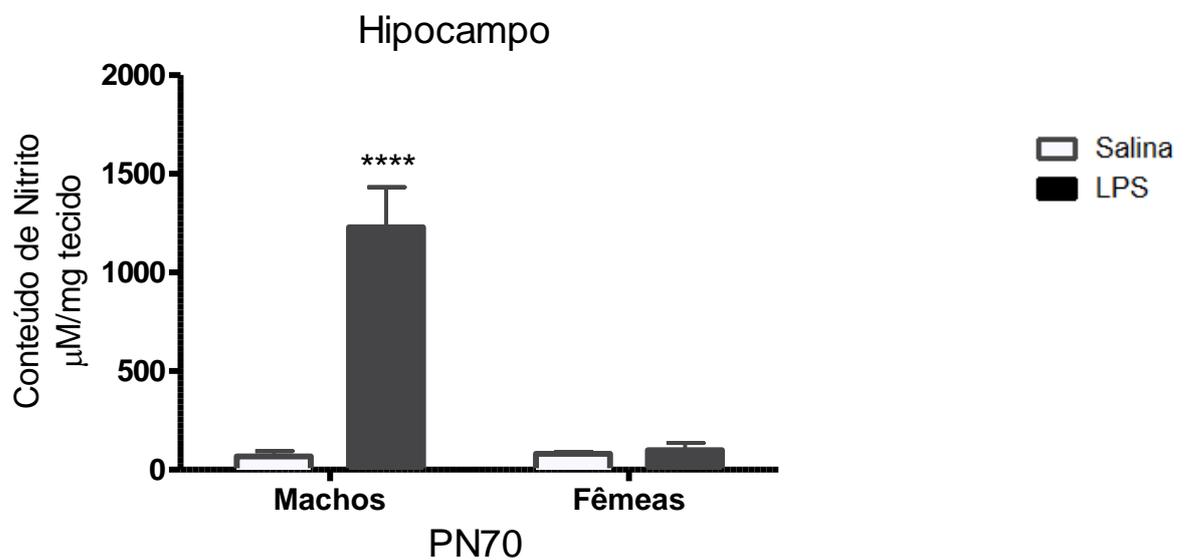


Figura 22 - Efeito do desafio neonatal com LPS nos níveis de nitrito no hipocampo de camundongos adultos (PN70). Os neonatos machos ou fêmeas receberam LPS ou salina via i.p no PN5 e 7. As barras são significativas \pm SEM ($n = 10-12$ animais / grupo). Os dados foram analisados ANOVA seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ versus ratinhos com idade e sexo compatíveis com soro fisiológico.

A expressão da IDO (enzima que degrada o triptofano e limita a velocidade da via das kinureninas) mostrou-se significativamente aumentada no HC do grupo de animais machos adultos desafiados com LPS no período neonatal em relação ao grupo controle tratados com solução salina (figura 23). [ANOVA: interação sexo x desafio por LPS: $[F(1,11)= 7.553, P= 0.0190]$. Não houve alteração na expressão da IDO nas fêmeas.

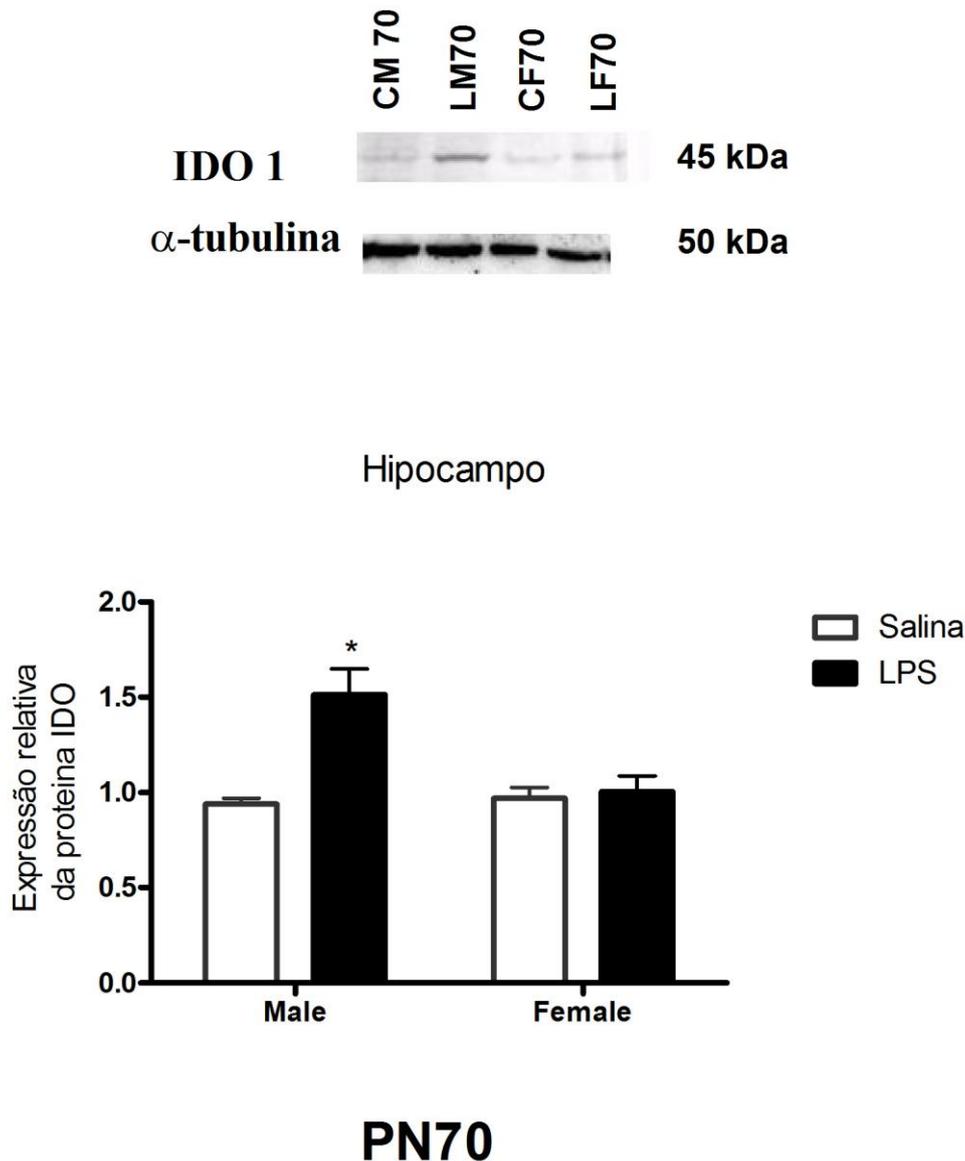


Figura 23 - Efeito do desafio neonatal com LPS na expressão da IDO no hipocampo de camundongos adultos (PN70). Os neonatos machos ou fêmeas receberam LPS ou salina via i.p no PN5 e 7. As barras são significativas \pm SEM (n = 10-12 animais / grupo). Os dados foram analisados ANOVA seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. ** P < 0,01, *** P < 0,001, **** P < 0,0001 versus ratinhos com idade e sexo compatíveis com soro fisiológico.

Observamos que o ácido quinolínico diminuiu significativamente tanto no grupo dos animais machos adultos desafiados com LPS no período neonatal quanto nas fêmeas quando comparados com os respectivos grupos controles salina (figura 24C), enquanto que a serotonina diminuiu significativamente somente no grupo de animais machos desafiados com LPS (figura 24B) e o triptofano não mostrou alterações significativas (figura 24A).

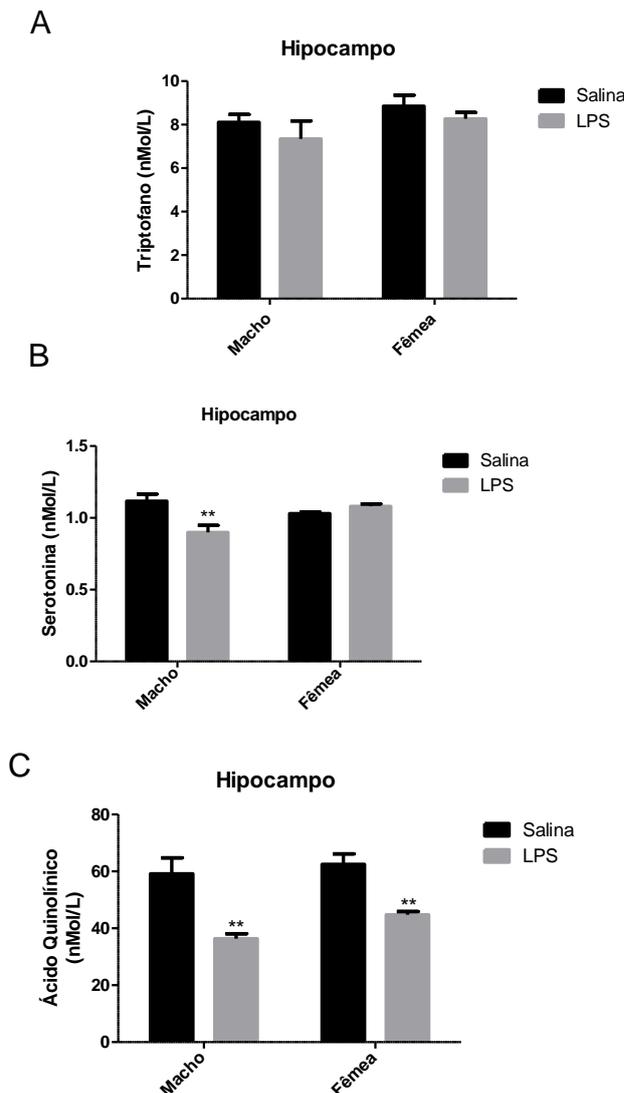


Figura 24 - Efeito do desafio neonatal com LPS nos metabólitos da via das kinureninas: triptofano (A), serotonina (B) e ácido quinolínico (C) no hipocampo de camundongos adultos (PN70). Os neonatos machos ou fêmeas receberam LPS ou salina via i.p no PN5 e 7. As barras são significativas \pm SEM (n = 102 animais / grupo). Os dados foram analisados ANOVA seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001 versus animais controle pareados por idade e sexo.

A expressão de parvalbumina diminuiu significativamente no HC de camundongos machos desafiados com LPS quando comparado com controle salina ($P < 0,01$), sem interação significativa entre os fatores (Fig. 25). Nos grupos de fêmeas desafiadas com LPS neonatal, os níveis de parvalbumina permaneceram inalteradas.

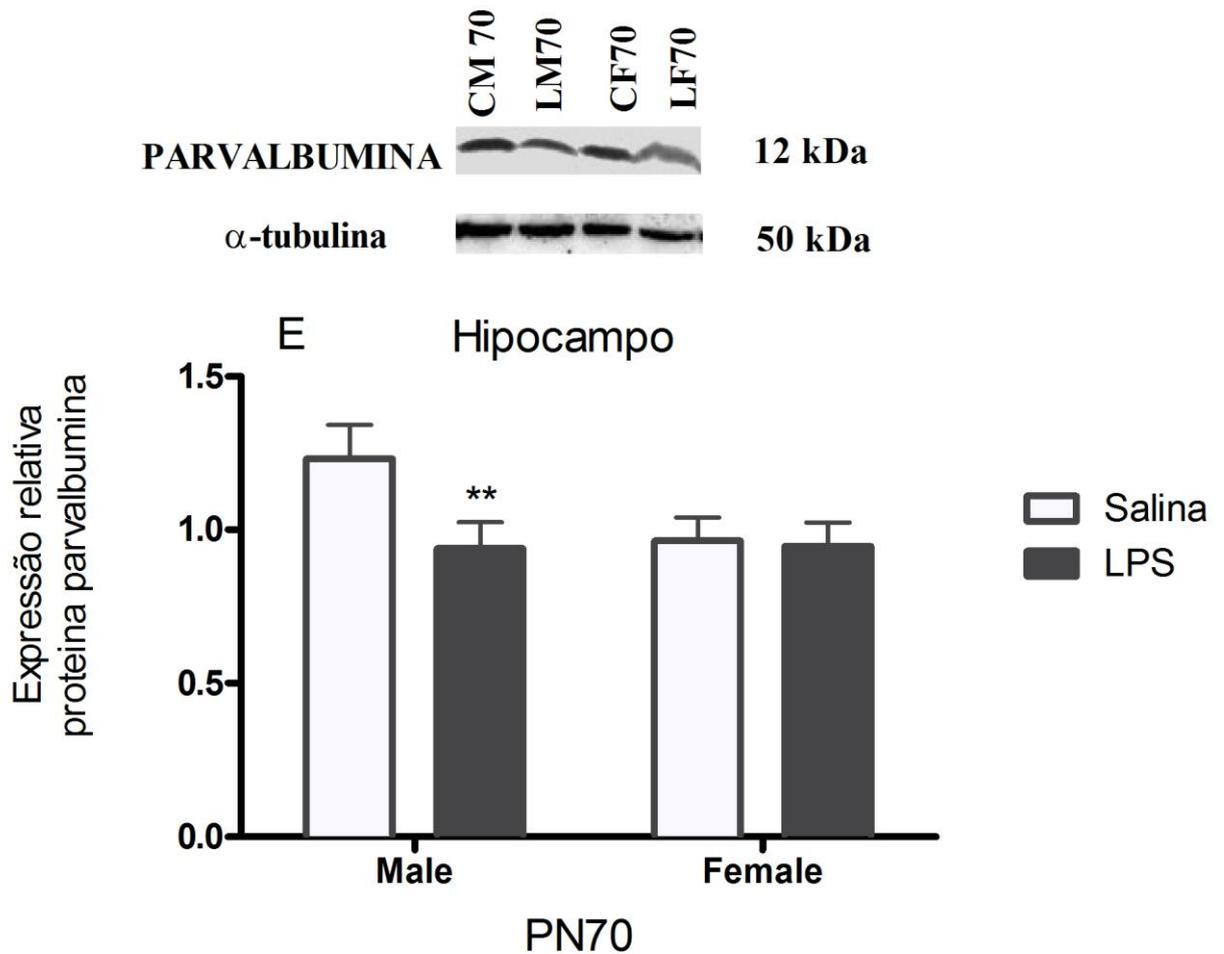


Figura 25 - Efeito do desafio neonatal com LPS na expressão de parvalbumina no hipocampo (HC) de camundongos adultos (PN70). Os neonatos machos ou fêmeas receberam LPS ou salina via i.p no PN5 e 7. As barras são significativas \pm SEM ($n = 10-12$ animais / grupo). Os dados foram analisados ANOVA seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ versus ratinhos com idade e sexo compatíveis com soro fisiológico.

O quadro 4 demonstra em resumo todos os resultados obtidos neste estudo através dos testes comportamentais realizados, segundo os parâmetros avaliados, a idade testada, a manifestação de acordo com o gênero e as possíveis interpretações.

Quadro 4 - Resumo dos resultados comportamentais obtidos pelo presente estudo:

Teste	Parâmetro	Idade	LPS ♂	LPS ♀	Interpretação
Inibição pré-pulso	Reflexo sensorio-motor	35	Não significativo	↓	Déficits sensoriais/cognitivos
		70	Não significativo	↓	
Nado Forçado	Tempo de Imobilidade	35	↑↑↑↑	Não significativo	Sintomas Negativos em ambas idades
		70	↑↑	Não significativo	
Preferência à Sacarose	Consumo de sacarose	35	Não significativo	Não significativo	Sem anedonia
		70	Não significativo	Não significativo	
Interação Social	Preferência social	35	Não significativo	Não significativo	Sem aversão social
		70	Não significativo	Não significativo	
Labirinto em Y	Alternâncias corretas	35	↓	Não significativo	Déficits de Memória no Adolescente
		70	Não significativo	Não significativo	
Odor do Gato	Tempo de contato c/o tecido aversivo	35	↑↑↑↑	Não significativo	Comportamento de Risco no Adolescente
		70	Não significativo	Não significativo	
Campo Aberto	<i>Groomings</i>	35	↑↑↑	Não significativo	Comportamento estereotipado na adolescência e ansiedade em ambas idades
		70	Não significativo	Não significativo	
	Tempo no centro do teste	35	↓	Não significativo	
		70	↓	Não significativo	

O quadro 5 demonstra em resumo todos os resultados obtidos neste estudo através dos testes comportamentais realizados, segundo os parâmetros avaliados, a idade testada, a manifestação de acordo com o gênero e as possíveis interpretações.

Quadro 5 - Resumo dos resultados neuroquímicos obtidos pelo presente estudo:

Teste	Área Cerebral	Idade	Grupo LPS ♂	Grupo LPS ♀	Interpretação
MPO	CPF/HC/HT	35	↑CPF/↑↑HC/HT↑↑↑↑	Não significativo	Neuroinflamação e oxidação em machos
	CPF/HC/HT	70	↑HC	Não significativo	
IL-4	CPF/HC/HT	35	↑↑↑CPF/↑↑↑HC/↑↑↑HT	↑↑↑CPF/↑↑↑HC	Fenótipo misto/imunidade inata
	CPF/HC/HT	70	↑↑↑CPF/↑↑HC/↑↑HT	↑↑↑HC/HT↑	
IL-6	CPF/HC/HT	35	↓↓↓CPF/↓↓↓HC/↓↓↓HT	↓↓↓CPF/↓↓↓HC/↓↓↓HT	Fenótipo misto/imunidade inata
	CPF/HC/HT	70	↓↓↓CPF/↓↓↓HC/↑↑HT	↓↓↓CPF/↓↓↓HC/↓↓↓HT	
BDNF	HC	35	↑↑↑↑	↑↑↑↑	Prejudicial para os neurônios não entrarem em poda sináptica
	HC	70	↑↑↑↑	↑↑↑↑	
INFγ	HC	70	↑↑↑	Não significativo	Exacerbação imune anormal Th1
Nitrito	HC	70	↑(18x)	Não significativo	Estresse nitrosativo
Parva	HC	70	↓↓	Não significativo	Susceptibilidade para o TEA
IDO	HC	70	↑	Não significativo	Neuroinflamação; sintomas negativos
TRP	HC	70	Não significativo	Não significativo	neuroinflamação
5-HT	HC	70	↓↓	Não significativo	Alvo genético do TEA; sintomas negativos
QUIN	HC	70	↓↓	↓↓	neurotoxicidade

7. DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo é a influência do sexo e da idade em alterações comportamentais de longo prazo induzidas pelo desafio imune com LPS neonatal (PN5 e 7). De fato, os camundongos machos, demonstraram comportamentos tipo-depressivo/afetivo-negativo, de risco, de ansiedade e de repetição, bem como déficits de memória de trabalho na periadolescência (PN35), porém na idade adulta (PN70) somente os comportamentos tipo-depressivo/afetivo-negativo e ansiedade foram evidenciados. Em relação as alterações neurobioquímicas avaliadas, os camundongos machos desafiados com LPS apresentaram aumento da atividade da enzima MPO [PN35 (CPF, HC e HT) e 70 (HC)], níveis aumentados de nitrito, INF γ eIDO e diminuição da parvalbumina e serotonina no PN70 (HC). Ambos os sexos, por sua vez, obtiveram níveis aumentados de BDNF (HC), IL4 (CPF, HC e HT) e níveis diminuídos de IL-6 (CPF, HC e HT) durante a adolescência e a idade adulta e diminuição de ácido quinolínico hipocampal na idade adulta.

Com base na relação entre os desafios de LPS pré-natal ou neonatal e a manifestação de transtornos neuropsiquiátricos como o autismo (KIRSTEN *et al.* 2013; PANG *et al.* 2016), esquizofrenia (ZHU *et al.*, 2014) ou ansiedade (WALKER *et al.*, 2009) em roedores, optou-se por mimetizar componentes causais, comportamentais e neurobioquímicos do TEA em camundongos *swiss* de ambos os sexos expostos ao desafio imune neonatal (PN5 e 7) com LPS, sendo avaliados na idade correspondente a periadolescência e idade adulta.

Os PNs5 e 7 foram escolhidos de modo a simular um desafio no final do terceiro trimestre da gravidez humana, uma vez que em roedores equivalem a última fase de uma gestação humana de 36-40 semanas (termo) (ANDERSEN; NAVALTA, ANDERSEN 2003, CLANCY *et al.*, 2007; SEMPLE *et al.* 2013). É importante ressaltar aqui que a maioria dos estudos investigando as conseqüências da exposição neonatal ao LPS foram conduzidos em animais desafiados nos PN 3 e 5 (PANG *et al.*,2003; WALKER *et al.*, 2009, THISHKINA *et al.*, 2016; PANG *et al.*, 2016). Na verdade, PNs 1-3 representam 23-32 semanas de gestação, caracterizado pelo desenvolvimento do sistema imunológico e estabelecimento da barreira hemato-encefálica. Por outro lado, durante os PNs 5-10 o sistema imunológico está se consolidando, enquanto a densidade axonal e dendrítica estão aumentando, assim como a gliogênese está em pico (SEMPLE *et al.*, 2013). Portanto, o dia neonatal de exposição ao LPS pode ser de relevante para as alterações comportamentais observadas no final da vida.

Considerando as avaliações comportamentais realizadas aqui, os déficits de IPP são considerados alterações neurofisiológicas endofenotípicas da esquizofrenia (BRAFF; LIGHT, 2005). Além da esquizofrenia, os déficits em IPP também são observados em pacientes que sofrem de uma variedade de distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo TEA, uma desordem caracterizada por déficits no acesso à informações motoras, sensoriais e / ou cognitivas (BRAFF *et al.*, 2001).

No presente estudo, as fêmeas desafiadas com LPS demonstraram déficits na função IPP tanto no PN35 como no PN70, o mesmo não ocorreu com os camundongos machos. Contrariamente a esses resultados, Perry *et al.* (2007) publicou que os adultos do sexo masculino com TEA apresentaram déficits de IPP associado à comportamentos restritos e repetitivos, bem como desempenho ruim no teste de fluência verbal. Feleder *et al.* (2010) mostrou, em estudo pré-clínico, que ratos machos desafiados no PN7 e 8 com infusão bilateral de LPS no hipocampo ventral apresentaram déficits de IPP quando avaliados durante a idade adulta. Porém, é importante mencionar o fato de que, atualmente, o valor de tradução de estudos baseados na infusão intracerebral (i.c) de LPS está sendo discutido, uma vez que não modelam a origem sistêmica ou materna de infecções perinatais (PANG *et al.*, 2016). Além disso, a injeção local de um estímulo inflamatório pode ativar somente as células imunes locais, o que gera diferenças significativas em comparação com a ativação sistêmica com a qual foi realizada neste estudo.

Em linha com as descobertas deste estudo sobre os déficits de IPP em camundongos fêmeas desafiados com LPS e a correlação prévia desses déficits com a fluência verbal em TEA (PERRY *et al.* 2007), um estudo do Reino Unido, que endereça a falha diagnóstica potencial do TEA entre homens e mulheres, mostrou que as meninas que ficaram aquém do limiar para diagnóstico do TEA apresentaram maiores dificuldades de comunicação, por vezes negligenciadas, quando comparadas com os meninos na mesma condição (DWORZYNSKI *et al.*, 2012).

Os animais machos, contrariamente as fêmeas, obtiveram o tempo de imobilidade aumentado no teste de nado forçado que condiz com sintomas depressivos/ afetivos-negativos; aumento de comportamento de risco no teste de aversão ao odor do gato; comportamento estereotipado observado através do *grooming* que está relacionado ao comportamento repetitivo e restritivo e diminuição do tempo gasto no centro do campo

aberto, compatível com sintomas ansiogênicos; déficits de memória de trabalho avaliado no labirinto em Y. Já na idade adulta (PN70), permaneceram somente os sintomas depressivos/afetivos-negativos e o comportamento de ansiedade, vislumbrando que alguns endofenótipos são atenuados na vida adulta e os comportamentos de tipo-ansiedade e depressão podem figurar como co-morbidades de transtornos neuropsiquiátricos de espectro maior, como o TEA, que compreende toda essa sintomatologia observada no PN35 e atenuada no PN70.

De acordo com a quinta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística da Associação de Psiquiatria Americana (DSM-V, 2014), o diagnóstico do TEA baseia-se em quatro critérios (A,B,C,D) de inclusão por categorias de sintomas, que podem ocorrer em três níveis (leve, moderado e grave). Ressaltando o critério B: Padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades e o critério C: especifica que esses sintomas devem estar presentes no período de desenvolvimento precoce, mas não podem se manifestar plenamente até que as demandas sociais excedam capacidades limitadas, ou podem ser mascaradas por estratégias aprendidas na vida adulta. Corroborando com os resultados comportamentais obtidos nesse estudo e acima mencionados, isso justifica a diferença de comportamento do PN35 para o PN70. Lembrando que a prevalência do TEA é de 4 homens para cada mulher diagnosticada e nesse estudo somente os camundongos machos demonstraram esse perfil.

Em consoante ainda com o TEA, o uso de um estímulo olfativo aversivo (teste do odor do gato) para avaliar a ausência de demonstração de medo em situações potencialmente perigosas que ocorre em autistas (DSM-IV, 1994), tendo em mente que o gato é o predador natural do rato, e, portanto, o gato deve causar aversão e medo ao rato, por instintos de sobrevivência, os camundongos machos do grupo LPS demonstraram comportamento de risco (tipo-autismo) no PN35.

Até o momento, os estudos que abordam as alterações comportamentais de longo prazo induzidas pelo desafio neonatal do LPS apresentam resultados conflitantes, possivelmente decorrentes de protocolos experimentais desenhados com base em: i) infusão i.c de LPS ou ii) desafio de LPS em diferentes períodos de vida neonatal. Nesse contexto, a infusão i.c. de LPS na PN5 foi relacionada ao comprometimento de aprendizagem de longa duração, menor resposta semelhante à ansiedade e lesão do hipocampo em ratos adultos

(WANG *et al.*, 2013). Em linha com nossos achados de alterações comportamentais semelhantes à ansiedade, Walker et al. (2004) descobriram que a administração neonatal (PN3 e 5) de LPS de *Salmonella enteritidis* causa alterações de ansiedade em animais avaliados durante a idade adulta. É importante ressaltar que Walker et al. (2004) avaliaram apenas as alterações de ansiedade usando o teste de labirinto positivo. O desafio da vida precoce com LPS também estava relacionado ao comportamento tipo-depressivo de longa duração em roedores no estudo de Dinel et al., (2014) que também demonstrou que os primeiros sintomas de comportamento tipo-depressivo na idade adulta de animais desafiados neonatalmente por LPS foi especificamente "desespero comportamental" no teste de nado forçado, concluindo que o LPS (PN3 e 5) induz "malprogramação perinatal" resultando no desenvolvimento de comportamentos tipo-depressivos, que começaram em adolescentes e se tornaram evidentes em ratos adultos.

Déficits neuropsicológicos associados à transtornos de ansiedade e depressão são muitas vezes considerados apenas como epifenômenos de idade, falta de motivação, desatenção ou viés de resposta. No entanto, estudos demonstram comprometimento cognitivo persistente na recuperação do transtorno do humor, indicando associação de alta ansiedade e depressão com comprometimento das funções cognitivas (AUSTIN *et al.*, 2001; ELLWART *et al.*, 2003).

A anedonia induzida por inflamação é freqüentemente usada como um teste comportamental para fenótipos de tipo-depressivo, mas Dunn e Swiergiel (DUNN; SWIERGEL, 2001) relataram que os déficits comportamentais induzidos por LPS em camundongos adultos não foram revertidos por uma série de diferentes antidepressivos, enquanto outros relatam que eles eram (YIRMIYA, 1996; YIRMIYA *et al.*, 2001), sendo este último um importante suporte à idéia de que a administração de LPS induz um comportamento de tipo-depressivo (GARZA, 2005). Outros relatos apontam diretamente para os efeitos diferenciais que o LPS tem sobre os aspectos consumativos e afetivos da alimentação (LARSON, 2006), sugerindo ainda que os efeitos "anedônicos" do LPS são mais reflexivos dos aspectos anoréxicos da endotoxina em oposição a uma mudança na resposta ao apetite. Em nosso estudo, nenhum dos grupos submetidos ao desafio imune neonatal com LPS demonstraram anedonia no teste de preferência à sacarose, evidenciando que os sintomas negativos observados no teste do nado forçado correspondem a sintomas afetivos-negativos que não compõem a depressão maior como um todo.

Os resultados obtidos nos estudos acima mencionados, em conjunto com os obtidos no presente estudo, sugerem que o desafio com LPS neonatal pode estar relacionado a um fenótipo comportamental mais complexo e mais tendencioso que apenas alterações sexuais e pontuais, tais como ansiedade ou depressão. Por conseguinte, a concepção de protocolos experimentais que avaliem as conseqüências a longo prazo do desafio do LPS numa ampla gama de determinações comportamentais e não apenas determinações isoladas podem ser de grande importância e valor translacional.

O desequilíbrio imunológico (incluindo a auto-imunidade) tem sido proposto como principal componente etiológico no TEA. Em consonância com os desequilíbrios imunológicos, indivíduos com TEA apresentam alterações em várias células imunológicas, incluindo células *natural killer* (NK) e macrófagos. A mieloperoxidase (MPO), marcador de inflamação e oxidação, é uma enzima heme envolvida na produção de espécies oxidantes em células fagocíticas, tais como macrófagos, promovendo estresse oxidativo durante a inflamação sendo regulada em várias condições inflamatórias agudas e crônicas, incluindo esquizofrenia (AL-ASMARI; KHAN 2014) e autismo (ROSE *et al.*, 2012). De fato, em áreas cerebrais de pacientes com TEA, a diminuição de glutathiona reduzida (GSH) e o aumento do estresse oxidativo estavam relacionados a uma resposta inflamatória crônica, bem como ao aumento da resposta mitocondrial, produção de superóxido, proteína oxidativa e dano ao DNA (ROSE *et al.*, 2012).

Neste estudo, observou-se que a atividade da MPO foi aumentada nas três áreas cerebrais (CPF, HC e HT) exclusivamente em camundongos machos desafiados neonatalmente com LPS, enquanto que na idade adulta somente no HC este aumento foi observado. As fêmeas não sofreram alterações de MPO nesse estudo. Um estudo recente usando o modelo autismo induzido pelo ácido valpróico pré-natal em ratos mostrou que no PN50 os animais apresentaram aumentos na permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE), atividade cerebral MPO e parâmetros de estresse oxidativo (diminuição do GSH e aumento da peroxidação lipídica) (KUMAR; SHARMA 2016).

As diferenças nas manifestações comportamentais e neurobioquímicas observadas aqui ressaltam a importância de estratificar as amostras de acordo com o gênero em estudos biológicos das condições do espectro do autismo. Os perfis específicos do gênero descritos aqui levam à sugestão de que: mecanismos compensatórios diferentes ocorrem em machos e

fêmeas com condições de espectro autista ou que estas condições podem desenvolver-se através de vias sexuais específicas do sexo.

A desregulação nos níveis de citocinas são achados importantes em pacientes com TEA (GOINES; ASHWOOD 2013), bem como podem estar relacionadas a alterações específicas do sexo observadas na síndrome de Asperger (SCHWARZ *et al.*, 2011). Aqui, observou-se que nas áreas cerebrais (CPF, HC e HT) de ambos os sexos e idades (PN35 e 70), expostos neonatalmente ao LPS, ocorreu aumento da citocina, IL-4. Os níveis séricos de IL-4 também estavam aumentados em indivíduos com TEA, sendo esse aumento associado, em estudo prévio, ao aumento da resposta Th2 com maior comprometimento da comunicação não-verbal (ASHWOOD *et al.*, 2011). Apesar do aumento dos níveis de IL-4 observado no TEA, o papel desta citocina neste transtorno, isto é, patogênico (indutor da apoptose na microglia/poda sináptica ineficiente) *versus* protetor (anti-inflamatória) ainda é elusivo (GADANI *et al.*, 2012). Outra importante observação, considerando nossos resultados, é que camundongos machos adultos (grupo LPS) apresentaram níveis aumentados de IL-4 quando comparados com as fêmeas (diferença de gênero). Mais uma vez, os níveis mais elevados de IL-4 observados no cérebro de animais machos desafiados com LPS neonatal estão parcialmente de acordo com os achados de Schwarz *et al.* (2011), em que uma diferença biológica central entre homens e mulheres com a Síndrome de Asperger foi o aumento dos níveis de IL-4 em indivíduos do sexo masculino.

A IL-6, por sua vez, é uma citocina neuropoiética, pró-inflamatória, envolvida no desenvolvimento neurológico e na função cerebral. Esta citocina pode atravessar os processos de influência da barreira hemato-encefálica no cérebro adulto (STOLP; 2013). Alterações no comportamento, na cognição, na neurotransmissão do ácido gama-amino butírico (GABA) e na função imune estão entre as funções comprometidas pela disfunção do hipocampo IL-6 durante o neurodesenvolvimento (SAMUELSSON *et al.*, 2006). De fato, níveis aumentados de IL-6 estão associados ao TEA (WEI *et al.*, 2011). Nesse estudo, observou-se que camundongos machos e fêmeas em ambas as idades avaliadas apresentaram níveis cerebrais diminuídos de IL-6. De notar que os déficits de IL-6 estão associados a maior agressividade e emocionalidade (ALLEVA *et al.*, 1998), haja vista que a IL-6 está relacionada com o amadurecimento necessário para circuitos hipotalâmicos relacionados ao estresse. Em outro estudo, ratos com baixos níveis de IL-6 apresentaram problemas de memória acompanhados

de maior susceptibilidade ao estresse e reduzido comportamento exploratório (BAIER et al. 2009).

A diminuição da IL-6 e do aumento da produção de IL-4 observada tanto em animais machos como em fêmeas pode também estar relacionada a uma modulação no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). A elevação dos glicocorticóides resulta na supressão de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6 e TNF- α e regulação positiva de citocinas anti-inflamatórias tais como IL-4 e IL-10, e receptores de citocinas (CHROUSOS, 1995). É de se notar que crianças com diagnóstico de espectro autista apresentam níveis de cortisol em pico significativamente mais altos e duração prolongada e recuperação de elevação de cortisol após estresse (SPRATT *et al.*, 2012). Assim, estudos adicionais são necessários para testar a hipótese de aumento da atividade do eixo HPA em animais neonatais desafiados com LPS no PN5 e 7.

O LPS está associado a prejuízos consideráveis das funções cerebrais superiores, incluindo o aprendizado e a memória. A regulação prejudicada do HPA envolve interrupção de conexões funcionais entre os neurônios do HC, CPF e HT. Em particular, isso pode estar relacionado a uma disfunção do feedback negativo devido à diminuição do funcionamento dos receptores de glicocorticóides nessas estruturas. Adicionalmente, uma diminuição seletiva em interneurônios GABAérgicos do HC induzida pela ativação imunológica neonatal pode atenuar o efeito inibidor do HC sobre os neurônios produtores de CRH do HT. Assim, mudanças na plasticidade sináptica do hipocampo são esperáveis como resultado do tratamento neonatal com LPS (KHANZADA *et al.*, 2017).

Como observamos alterações na MPO, IL-4 e IL-6 principalmente no HC e também com base na importância desta área cerebral para o desempenho das tarefas comportamentais realizadas neste estudo, decidimos continuar nossas determinações neuroquímicas apenas em HC.

Em relação ao IFN- γ , observou-se níveis aumentados desta citocina Th1 em camundongos adultos, tanto machos como fêmeas, desafiados por LPS neonatal. O IFN- γ foi relacionado à sobreprodução de NO em TEA (SWEETEN *et al.*, 2004). A este respeito, observou-se também aqui níveis elevados de nitrito (metabólito do NO) no HC apenas em camundongos machos adultos desafiados com LPS neonatal. Isto pode refletir uma superexpressão da óxido nítrico indutível (iNOS) em células microgliais. Juntamente com os

resultados da MPO podemos sugerir que os marcadores de imunidade inata e fenótipo misto foram alterações específicas do sexo observadas em nosso protocolo de desafio neonatal com LPS.

O aumento de NO observado em camundongos machos adultos (grupo LPS) pode estar associados a poucos comportamentos prejudicados. Por exemplo, tem sido demonstrado que o NO está envolvido na depressão e a inibição da produção deste mediador reduz o comportamento depressivo em um modelo de estresse leve inesperado crônico (PENG *et al.* 2012). Além disso, uma vez que o NO está envolvido no comportamento de ansiedade (WORKMAN *et al.*, 2008), o aumento desse mediador no HC pode contribuir para o efeito comportamento ansiogênico observado em animais machos. Finalmente, é possível que o aumento de MPO (VACCARINO *et al.*, 2008) também pode contribuir para o comportamento tipo-depressivo/afetivo negativo observado em camundongos machos desafiados com LPS.

O IFN γ é a citocina predominante implicada na indução deIDO (O'CONNOR *et al.*, 2009c), de fato, ocorreu aumento da expressão deIDO nos camundongos machos desafiados com LPS neonatal neste estudo. AIDO, por sua vez, cataboliza a via das quinureninas e está relacionada a inflamação, ao comportamento tipo-depressivo e a danos neuronais através do estresse oxidativo. Obtendo esses resultados, foi quantificado os metabólitos (ácido quinolínico, serotonina e triptofano) dessa via, evidenciando diminuição de serotonina no hipocampo dos machos adultos (grupo LPS) e ácido quinolínico em ambos os sexos desafiados com LPS neonatal. O transportador de serotonina é alvo genético no autismo (KHANZADA *et al.*, 2017), desse modo a sua diminuição está relacionada ao transportador. A Depleção de serotonina muito precocemente em fetos de ratos leva a uma redução permanente no número de neurônios em ratos adultos (WHITAKER-AZMITIA, 2001). Por outro lado, níveis persistentemente elevados de serotonina poderiam indicar um déficit na eliminação de sinapses em cérebros de autistas, contribuindo para um aumento no número de minicolumnas corticais (KELLER; PERSICO 2003). Um estudo mostrou síntese alterada de serotonina nos tratos dentato-tálamo-corticais em autistas do sexo masculino (CHUGANI *et al.*, 1999). Além disso, o período de síntese elevada de serotonina cerebral que ocorre em crianças com diagnóstico de autismo típico até os 5 anos de idade (capacidade de síntese 200% maior do que em adultos) não parece ocorrer em crianças com autismo atípico. Nestas, a capacidade de síntese de serotonina aumenta gradualmente dos 2 aos 11 anos de idade, alcançando valores 1,5 vezes maiores do que aqueles observados em adultos típicos (MULLER *et al.*, 1998; CHUGANI *et al.*, 1997; CHUGANI *et al.*, 2002; GADIA, 2004). A diminuição do ácido

quinolínico, nos grupos desafiados com LPS neonatal, pode estar relacionada ao desvio da via das quinureninas para a produção de outros 30 catabólitos intermediários do triptofano, haja vista que a ativação imune Th1 por LPS estimula seletivamente a via do NAD com produção dos catabólitos neurotóxicos do triptofano.

Uma vez que observamos que o HC de animais adultos desafiados por LPS apresentou perfil pró-inflamatório, decidimos determinar a expressão da parvalbumina (isto é, um marcador de interneurônios GABAérgicos). Nesse estudo, a expressão da proteína parvalbumina foi diminuída em animais machos expostos a LPS. Os interneurônios positivos para a parvalbumina são neurônios de adição rápida que podem converter um sinal de entrada excitatório em um sinal de saída inibitório dentro de um milissegundo envolvido criticamente em microcircuitos e redes neuronais (HU *et al.*, 2014). Importante, os neurônios de parvalbumina foram diminuídos no CPF mediano de indivíduos autistas (HASHEMI *et al.*, 2016), refletindo uma ruptura no equilíbrio de excitação / inibição sendo BDNF um regulador da atividade de rede sincronizada através dos interneurônios de parvalbumina (ZHENG *et al.*, 2011). Apesar dos estudos mostrando a regulação do BDNF nos neurônios de parvalbumina, a relação entre o BDNF e os neurônios de parvalbumina no autismo típico e atípico, tanto quanto sabemos, ainda não foi estudada. Além disso, a desregulação redox foi associada com comprometimento dos neurônios parvalbumina no ventral HC (STEULLET *et al.*, 2010).

Em relação ao BDNF, observou-se que tanto os animais machos como as fêmeas desafiados com LPS apresentaram um aumento médio de 2 vezes nesta neurotrofina quando comparados com seus respectivos controles em áreas cerebrais relacionadas com a neurogênese, HC e HT. Foi previamente determinado num estudo clínico que o BDNF pode ser um biomarcador importante para a diferenciação do autismo típico e atípico. De fato, os níveis séricos de BDNF foram significativamente maiores em indivíduos autistas atípicos (fenótipo clinicamente mais leve) em comparação aos controles saudáveis, mas não em casos típicos de TEA (fenótipo clinicamente grave) (KASARPALKAR *et al.*, 2014). Corroborando também com nossos resultados, os níveis séricos de BDNF também foram aumentados especificamente em mulheres com síndrome de Asperger (KNICKMEYER *et al.*, 2008). Isso é interessante, pois estudos anteriores mostraram níveis aumentados desse fator de crescimento em crianças com condições de espectro autista em associação com o desenvolvimento cerebral atípico (SCHWARZ *et al.*, 2011). Níveis mais baixos de BDNF podem indicar comprometimento no mecanismo neuroprotetor, enquanto níveis mais elevados

podem implicar uma resposta protetora manifestada. Apesar disso, o aumento desses níveis de neurotrofina observado aqui também pode ser um indicativo de comprometimento na poda sináptica, que tem sido previamente relacionado a alguns endofenótipos de TEA, como o comprometimento do comportamento social (ZHAN *et al.*, 2014). Nosso estudo apresenta algumas limitações, uma vez que não avaliamos o eixo HPA nos PN35 e 70 e a poda sináptica durante a vida neonatal. Outra limitação importante é que as citocinas e o BDNF não foram testados em amostras de plasma para realizar uma correlação entre os parâmetros plasmáticos e cerebrais, a fim de orientar futuros estudos de avaliação de biomarcadores de diferenças de sexo no TEA.

8. CONCLUSÃO

O desafio sistêmico com LPS neonatal no PN5 e 7 desencadeia alterações comportamentais e neurobioquímicas distintas na periadolescência e idade adulta manifestadas de acordo com o gênero em camundongos machos e fêmeas. Os resultados obtidos nesse estudo parecem refletir a importância de um conjunto de citocinas, e não apenas uma, para o desenvolvimento e curso das alterações comportamentais induzidas pelo LPS. Em conjunto, esses achados podem estar associados à manifestação de alterações do tipo TEA de longa duração em animais machos e fêmeas, acrescentando evidências ao estudo de diferenças de sexo em TEA pelo uso de modelos animais baseados no desafio neonatal com LPS. Finalmente, nossos resultados podem estimular e orientar o desenho de estudos que abordem novas metas para intervenções sexo-específicas (preventivas ou terapêuticas) no TEA.

REFERÊNCIAS

- ABAZYAN, B., NOMURA, J., KANNAN, G., ISHIZUKA, K., TAMASHIRO, K.L., NUCIFORA, F., POGORELOV, V., LADENHEIM, B., YANG, C., KRASNOVA, I.N., CADE, J.L., PARDO, C., MORI, S., KAMIYA, A., VOGEL, M.W., SAWA, A., ROSS, C.A., PLETNIKOV, M.V., 2010. Prenatal interaction of mutant DISC1 and immune activation produces adult psychopathology. **Biol. Psychiatry** 68, 1172–1121.
- 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.
- AGAUGUÉ S, PERRIN-COCON L, COUTANT F, ANDRÉ P, LOTTEAU V. 1-Methyl-tryptophan can interfere with TLR signaling in dendritic cells independently of IDO activity. **J. Immunol** 2006;177:2061–2071.
- AGUIAR, C. C. T. et al. Esquizofrenia: Uma doença inflamatória? **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 59, n. 1, p. 52–57, 2010.
- AJURIAHUERRA J. Las Psicosis Infantiles. In **Manual de Psiquiatria Infantil**. 4ªed. Barcelona: Toray-Masson; 1977. p. 673-731.
- ALEXANDER C, RIETSCHER ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **J Endotoxin Res**. 2001;7(3):167–202 and Behavior, 151, 516–524.
- ANDERSEN, S. L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 27, 3-18, 2003.
- ANDERSON, G.; MAES, M. Schizophrenia: Linking prenatal infection to cytokines, the tryptophan catabolite (TRYCAT) pathway, NMDA receptor hypofunction, neurodevelopment and neuroprogression. **Progress in Neuro Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 42, p. 5–19, 2013.
- ANDREWS, N.; BARNES, N. M.; STEWARD, L. J.; WEST, K. E.; CUNNINGHAM, J.; WU, P. Y.; ZANGROSSI, H., JR.; FILE, S. E. A comparison of rat brain amino acid and monoamine content in diazepam withdrawal and after exposure to a phobic stimulus. **British Journal of Pharmacology**, v. 109, n. 1, p. 171-174, 1993.
- ARAÚJO, T. da S. Papel de moduladores da via das quinureninas na reversão de sintomas e alterações neuroquímicas tipo esquizofrenia induzidas pela administração repetida de cetamina em camundongos. 2015. 73f. Dissertação de Mestrado em Farmacologia - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2015.
- ARCHER J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav**. 1973;21(2):205–35.

ASHWOOD P, KRAKOWIAK P, HERTZ-PICCIOTTO I, HANSEN R, PESSAH I, VAN DE WATER J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. **Brain Behav Immun.** 2011;25(1):40–5.

ASHWOOD, P., KRAKOWIAK, P., HERTZ-PICCIOTTO, I., HANSEN, R., PESSAH, I.N., VAN DE WATER, J., 2010. Altered T cell responses in children with autism. **Brain Behav. Immun.** 25, 840–849.

ASHWOOD, P., KRAKOWIAK, P., HERTZ-PICCIOTTO, I., HANSEN, R., PESSAH, I.N., VAN DE WATER, J., 2011. Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. **J. Neuroimmunol.** 232, 196-196.

AUSTIN, M.P.; MITCHELL, P.; GOODWIN, G.M; Cognitive deficits in depression: possible implications for functional neuropathology, *Br. J. Psychiatry* 178(2001) 200–206.

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

BAKER, A. E., BRAUTIGAM, V. M., & WATTERS, J. J. (2004). Estrogen modulates microglial inflammatory mediator production via interactions with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, 145(11), 5021–5032.

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

BARAHONA-CORRÊA, J.B.; FILIPE, C. A Concise History of Asperger Syndrome: The Short Reign of a Troublesome Diagnosis. minireview published: 25 January 2016 doi:10.3389/fpsyg.2015.02024 **frontiers in psychology**.

BARTH, C. R., LUFT, C., GISELLE, A., FUNCHAL., DE OLIVEIRA, J.R., PORTO, B.A.N., DONADIO, M.V.F. LPS-Induced Neonatal Stress in Mice Affects the Response Profile to an Inflammatory Stimulus in an Age and Sex-Dependent Manner. 2016 Wiley Periodicals, Inc. **Dev Psychobiol** 58:600–613, 2016.

BEGGIATO A, PEYRE H, MARUANI A, SCHEID I, RASTAM M, AMSELLEM F, ET AL. Gender differences in autism spectrum disorders: Divergence among specific core symptoms. *Autism Res.* 2016 Nov 3; behavior: a critical role for the immune system. **Front. Behav. Neurosci.** 3, 1–14.

BILBO SD, BIEDENKAPP JC, DER-AVAKIAN A, WATKINS LR, RUDY JW, MAIER SF. Neonatal infection-induced memory impairment after lipopolysaccharide in adulthood is prevented via caspase-1 inhibition. **Journal of Neuroscience** 2005;25:8000–9.

BILBO, J.W. RUDY, L.R. WATKINS, S.F. MAIER, A behavioural characterization of neonatal infection-facilitated memory impairment in adult rats, **Behav. Brain Res.** 169 (2006) 39–47.

BILBO, S. D., LEVKOFF, L. H., MAHONEY, J. H., WATKINS, L. R., RUDY, J. W., & MAIER, S. F. (2005). Neonatal infection induces memory impairments following an immune challenge in adulthood. **Behavioral Neuroscience**, 119(1), 293–301.

BILBO, S.D., SCHWARZ, J.M., 2009. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. **Front. Behav. Neurosci.** 3, 1–14.

BOISS_E, L., MOUIHATE, A., ELLIS, S., & PITTMAN, Q. J. (2004). Long-term alterations in neuroimmune responses after neonatal exposure to lipopolysaccharide. **The Journal of Neuroscience**, 24(21), 4928–4934.

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

BORELLA, V.C.M. Modelo Neurodesenvolvimental de Esquizofrenia Induzida pela Administração Neonatal de Cetamina em Ratos: Avaliação da Influência do Sexo e Efeito Antipsicótico. 2013. 75f. Dissertação de Mestrado em Farmacologia - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2013.

BRAFF, D.L.; GEYER M.A.; SWERDLOW, N.R. Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups and pharmacological studies. **Psychopharmacology** v.156, p.234–58, 2001.

BROWN AS, BEGG MD, GRAVENSTEIN S, SCHAEFER CA, WYATT RJ, BRESNAHAN M, BABULAS VP, SUSSER ES: Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. **Arch Gen Psychiatry** 2004; 61: 774–780.

BROWN, A.; DERKITS, E. prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. **Am J Psychiatry** v.167, p.261 – 80, 2010.

BRUNTON, P. J., DONADIO, M. V., YAO, S. T., GREENWOOD, M., SECKL, J. R., MURPHY, D., & RUSSELL, J. A. (2015). 5 α -reduced neurosteroids sex-dependently reverse central prenatal programming of neuroendocrine stress responses in rats. **The Journal of Neuroscience**, 35(2), 666–677.

BUTOVSKY O, ZIV Y, SCHWARTZ A, LANDA G, TALPALAR AE, PLUCHINO S, MARTINO G, SCHWARTZ M: Microglia activated by IL-4 or IFN- γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. **Mol Cell Neurosci** 2006; 31: 149–160.

CACCI E, AJMONE-CAT MA, ANELLI T, BIAGIONI S, MINGHETTI L: In vitro neuronal and glial differentiation from embryonic or adult neural precursor cells are differently affected by chronic or acute activation of microglia. **Glia** 2008; 56: 412–425.

CAPURON L, RAVAUD A, NEVEU PJ, MILLER AH, MAES M, DANTZER R. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergo cytokine therapy. **Mol. Psychiat** 2002;7:468–473.

CAREAGA, M., VAN DE WATER, J., ASHWOOD, P., 2010. Immune dysfunction in autism: a pathway to treatment. **Neurotherapeutics** 7, 283–292.

CARPENTER, W.T.; BUCHANAN, R.W. Schizophrenia. **N Engl J Med**, v.330, p. 681–690, 1994.

CHALFANT AM, RAPEE R, CARROLL L. Treating anxiety disorders in children with high functioning autism spectrum disorders: A controlled trial. **J Autism Dev Disord**. 2007;37(10):1842–57.

CHINTAMANENI, K., BRUDER, E. D., RAFF, H. (2014). Programming of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by neonatal intermittent hypoxia: Effects on adult male ACTH and corticosterone responses are stress specific. **Endocrinology**, 155(5), 1763–1770.

CLAYPOOLE, L.D., ZIMMERBERG, B., WILLIAMSON, L.L. Neonatal lipopolysaccharide treatment alters hippocampal neuroinflammation, microglia morphology and anxiety-like behavior in rats selectively bred for an infantile trait. L.D. Claypoole et al. / **Brain, Behavior, and Immunity** (2016).

COLTON CA: Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. **J Neuroimmune Pharmacol** 2009; 4: 399–418.

CONNOR TJ, STARR N, O’SULLIVAN JB, HARKIN A. Induction of indolamine 2,3-dioxygenase and kynurenine 3-monooxygenase in rat brain following a systemic inflammatory challenge: A role for IFN γ ? **Neuroscience Letters** 2008;441:29–34.

COYLE JT, TSAI G, GOFF D (2003) Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1003:318–327.

CURTIS MA, KAM M, NANNMARK U, ANDERSON MF, AXELL MZ, WIKKELSO C, HOLTAS S, VAN ROON-MOM WM, BJORK-ERIKSSON T, NORDBORG C, FRISEN J, DRAGUNOW M, FAULL RL, ERIKSSON PS: Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. **Science** 2007; 315: 1243–1249.

CUSTÓDIO, C.S. Estudo de alterações comportamentais e neuroinflamatórias induzidas pela administração sistêmica de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* em camundongos. 82f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Médica - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2012.

DAKHALE, G.N.; KHANZODE, S.D.; KHANZODE, S.S.; SAOJI A. Supplementation of vitamin C with atypical antipsychotics reduces oxidative stress and improves the outcome of schizophrenia. **Psychopharmacology (Berl)** v.182, p. 494–498, 2005.

DANTZER R, O’CONNOR JC, FREUND GG, JOHNSON RW, KELLEY KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nat. Rev. Neurosci** 2008a;9:46–56.

DANTZER, R.; CONNOR, J. C. O; FREUND, G. G.; JOHNSON, R. W.; KELLEY, K.W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature**, v. 9, p. 46-57, 2008.

DAVALOS D, GRUTZENDLER J, YANG G, KIM JV, ZUO Y, JUNG S, LITTMAN DR, DUSTIN ML, GAN WB: ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat Neurosci** 2005; 8: 752–758.

DAVIS, M.; EMORY, E. (1995). Sex differences in neonatal stress reactivity. **Child Development**, 66(1), 14–27.

DE LA FUENTE-SANDOVAL, C. et al. Higher levels of glutamate in the associative striatum of subjects with prodromal symptoms of schizophrenia and patients with first episode psychosis. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, v. 36, n. 9, p. 1781–1791, 2011.

DE LA GARZA R 2nd. Endotoxin- or pro-inflammatory cytokine-induced sickness behavior as an animal model of depression: focus on anhedonia. **Neurosci Biobehav Rev.** 2005; 29:761–770.

DINEL A-L, JOFFRE C, TRIFILIEFF P, AUBERT A, FOURY A, LE RUYET P, LAYE S (2014) Inflammation early in life is a vulnerable factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alterations at adulthood. **J Neuroinflammation** 11:155.

DOOSTI, M.H., A. BAKHTIARI, P. ZARE, M. AMANI, N. MAJIDI-ZOLBANIN, S. BABRI, A. A.SALARI, Impacts of early intervention with fluoxetine following early neonatal immune activation on depression-like behaviors and body weight in mice, *Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 43 (2013) 55–65.

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

DUNN A.J.; SWIERGIEL, A.H. The reductions in sweetened milk intake induced by interleukin-1 and endotoxin are not prevented by chronic antidepressant treatment. **Neuroimmunomodulation**. 2001; 9:163–169.

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

EISENBERGER, N. I.; BERKMAN, E. T.; INAGAKI, T. K.; RAMESON, L.T.; MASHAL, N. M.; IRWIN, M. R. Inflammation-induced anhedonia: endotoxin reduces ventral striatum responses to reward. **Biol Psychiatry**.

ELLIS, S., MOUIHATE, A., & PITTMAN, Q. J. (2005). Early life immune challenge alters innate immune responses to lipopolysaccharide: Implications for host defense as adults. **The FASEB Journal**, 19(11), 1519–1521.

ELLWART, T.; RINCK, M., BECKER, E.S., Selective memory and memory deficits in depressed patients, *Depress. Anxiety* 17 (2003) 197–206.

ENAYATI M, SOLATI J, HOSSEINI MH, SHAHI HR, SAKI G, SALARI AA. Maternal infection during late pregnancy increases anxiety- and depression-like behaviors with increasing age in male offspring. **Brain Research Bulletin** 2012;87:295–302.

ERIKSSON PS, PERFILIEVA E, BJORK-ERIKSSON T, ALBORN AM, NORDBORG C, PETERSON DA, GAGE FH: Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat Med** 1998; 4: 1313–1317.

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

FITZGERALD P, CASSIDY EM, CLARKE G, SCULLY P, BARRY S, QUIGLEY EAMONN MM, SHANAHAN F, CRYAN J, DINAN TIMOTHY G. Tryptophan catabolism in females with irritable bowel syndrome: relationship to interferon-gamma, severity of symptoms and psychiatric co-morbidity. **Neurogastroenterol Motil** 2008;20:1291–1297.

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

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

FUJIGAKI S, SAITO J, SEKIKAWA K, TONE S, TAKIKAWA O, FUJII H, WADA H, NOMA A, SEISHIMA M. Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN- γ -independent mechanism. **Eur. J. Immunol** 2001;31:2313–2318.

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

GAGE FH, KEMPERMANN G, PALMER TD, PETERSON DA, RAY J: Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. **J Neurobiol** 1998; 36: 249–266.

GÁL EM, SHERMAN AD. L-kynurenine: its synthesis and possible regulatory function in brain. **Neurochem Res** 1980;5:223–239.

GARAY, P.A., MCALLISTER, A.K., 2010. Novel roles for immune molecules in neural development: implications for neurodevelopmental disorders. **Front. Synaptic**.

GOINES PE, ASHWOOD P. Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): possible role of the environment. **Neurotoxicol Teratol**. NIH Public Access; 2013;36:67–81.

GRANGER, D.A., HOOD, K.E., IKEDA, S.C., REED, C.L., BLOCK, M.L., 1996. Neonatal endotoxin exposure alters the development of social behavior and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in selectively bred mice. **Brain Behav. Immun.** 10, 249–259.

GUILLEMIN, G.J.; KERR, S.J.; SMYTHE, G.A.; SMITH, D.G.; KAPOOR, V.; ARMATI, P.J.; CROITORU, J.; BREW, B.J. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: A paradox for neuronal protection. **J. Neurochem** 2001;78:842–853.

HANISCH, U. K. : Microglia as a source and target of cytokines. **Glia** 2002; 40: 140 155.

HARJU, K.; OJANIEMI, M.; ROUNIOJA, S.; GLUMOFF, V.; PAANANEN, R.; HARRÉ, M.A. GALIC, A. MOUIHATE, F. NOORBAKSH, Q.J. PITTMAN, Neonatalinflammation produces selective behavioural deficits and altersN methyl-d-aspartate receptor subunit mRNA in the adult rat brain, **Eur. J.Neurosci.** 27 (2008) 644–653.

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.

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

HODGSON, D.M., KNOTT, B., WALKER, F.R., 2001. Neonatal endotoxin exposure influences HPA responsivity and impairs tumor immunity in Fischer 344 rats in adulthood. **Pediatr. Res.** 50, 750–755.

HOFFMAN, H.S.; ISON, J.R. Reflex modification in the domain of startle. I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. **Psychol Ver.** v.87, p.175–89, 1980.

HORNIG M, WEISSENBOCK H, HORSCROFT N, LIPKIN WI: An infection-based model of neurodevelopmental damage. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96: 12102–12107.

INNAMORATO NG, LASTRES-BECKER I, CUADRADO A: Role of microglial redox balance in modulation of neuroinflammation. **Curr Opin Neurol** 2009; 22: 308–314.

JUNG ID, LEE CM, JEONG YH, LEE JS, PARK WS, HAN J, PARK YM. Different regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide and interferon gamma in murine bone marrow derived dendritic cells. **FEBS Letter** 2007;581:1449–1456.

KARROW NA. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system during inflammation and altered programming of the neuroendocrine-immune axis during fetal and neonatal development: lessons learned from the model inflammagen, lipopolysaccharide. **Brain Behav Immun** 2006;20(2):144-158.

KASARPALKAR NJ, KOTHARI ST, DAVE UP. Brain-Derived Neurotrophic Factor in children with Autism Spectrum Disorder. **Ann Neurosci.** 2014;21(4):129–33.

KENTNER, A. C., MCLEOD, S. A., FIELD, E. F., & PITTMAN, Q. J. (2010). Sex dependent effects of neonatal inflammation on adult inflammatory markers and behavior. **Endocrinology**, 151(6), 2689–2699.

KESSLER RC, DAVIS CG, KENDLER KS. Childhood adversity and adult psychiatric disorder in the US National Comorbidity Survey. **Psychol Med.** 1997;27(5):1101–19.

KHANZADA, N.S.; BUTLER, M.G.; MANZARDO, M. GeneAnalytics Pathway Analysis and Genetic Overlap among Autism Spectrum Disorder, Bipolar Disorder and Schizophrenia. **International Journal of Molecular Sciences.** 2017, 18, 527.

KIM, Y.K.; MYINT, A.M.; VERKERK, R.; SCHARPE, S.; STEINBUSCH, H.; LEONARD, B. Cytokine changes and tryptophan metabolites in medication-naïve and medication-free schizophrenic patients. **Neuropsychobiology** v.59(2), p.123–9, 2009.

KIRCH DG. Infection and autoimmunity as etiologic factors in schizophrenia: a review and reappraisal. **Schizophr Bull** v.19, p.355–70, 1992.

KIRSTEN TB, LIPPI LL, BEVILACQUA E, BERNARDI MM. LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1B levels in adult rat offspring: Relevance to autism. **PLoS One**. 2013;8(12).

KIRSTEN, T. B. Lipopolissacarídeo no início do período pré-natal como modelo experimental de autismo e prejuízos dopaminérgicos estriatais. 2012. 196f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2012.

KOHL, S.; HEEKEREN, K.; KLOSTERKÖTTER, J.; KUHN, J. Prepulse inhibition in psychiatric disorders e Apart from schizophrenia. **Journal of Psychiatric Research** v.47, p.445- 452, 2013.

KOHMAN, R.A., A.J. TARR, N.L. SPARKMAN, T.M.H. BOGALE, G.W. BOEHM, Neonatal endotoxin exposure impairs avoidance learning and attenuates endotoxin-induced sickness behavior and central IL-1 gene transcription in adulthood, **Behav. Brain Res.** 194 (2008) 25–31.

KREUTZBERG GW: Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci** 1996; 19: 312–318.

KWIDZINSKI E, BUNSE J, AKTAS O, RICHTER D, MUTLU L, ZIPP F, NITSCH R, BECHMANN I. Indolamine 2,3- dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. **FASEB J** 2005;19:1347–1349.

LAI M-C, LOMBARDO M V., AUYEUNG B, CHAKRABARTI B, BARON-COHEN S. Sex/Gender Differences and Autism: Setting the Scene for Future Research. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**. 2015;54(1):11–24.

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

LARSON, SJ. Lipopolysaccharide and interleukin-1 β decrease sucrose intake but do not affect expression of place preference in rats. 2006.

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

LEONARD, B.; MAES, M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 36, p. 764–785, 2012.

LEVIN, R.; CALZAVARA, M.B.; SANTOS, C.M.; *et al.* Spontaneously Hypertensive Rats (Shr) Present Deficits in Prepulse Inhibition of Startle Specifically Reverted by Clozapine. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** v.35, p.1748-1752, 2011.

LI B, ARIME Y, HALL FS, UHL GR, SORA I. Impaired spatial working memory and decreased frontal cortex BDNF protein level in dopamine transporter knockout mice. *Eur J Pharmacol.* 2010 Feb 25;628(1–3):104–7.

LI, H.C; CHEN, Q.Z; MA, Y; ZHOU. J.F. Imbalanced free radicals and antioxidant defense systems in schizophrenia: a comparative study. *J Zhejiang Univ Sci B*, v.7, p.981–986, 2006.

LIAO, S. L., CHEN, W. Y., & CHEN, C. J. (2002). Estrogen attenuates tumor necrosis factor-alpha expression to provide ischemic neuroprotection in female rats. *Neuroscience Letters*, 330(2), 159–162.

LIU, L.; JIA, F.; YUAN, G.; CHEN, Z.; YAO, J.; LI, H.; FANG, C. Tyrosine hydroxylase, interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are over expressed in peripheral blood mononuclear cells from schizophrenia patients as determined by semi-quantitative analysis. *Psychiatry Res* v.176(1), p.1–7, 2010.

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

LOUZÃ, M.R. Detecção precoce: é possível prevenir a esquizofrenia? *Rev. Psiq. Clín.* v.34(2), p.169-173, 2007.

LUNARDELLI, A. Efeitos da inflamação no período neonatal sobre o perfil inflamatório e oxidativo na sepse experimental na vida adulta. 2013. 71f. Tese (Medicina/Pediatria e Saúde da Criança) - Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2013.

LUNARDELLI, A., LUFT, C., PEDRAZZA, L., MARTHA, B. A., DE OLIVEIRA, J. R., & DONADIO, M. V. (2015). Effects of neonatal inflammation on the inflammatory and oxidative profile during experimental sepsis in adult life. *Physiology*.

MACRAE, M., MACRINA, T., KHOURY, A., MIGLIORE, M.M., KENTNER, A.C. TRACING THE TRAJECTORY OF BEHAVIORAL IMPAIRMENTS AND OXIDATIVE STRESS IN AN ANIMAL MODEL OF NEONATAL INFLAMMATION *Neuroscience* 298 (2015) 455–466

MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y. S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry special issue*, 2010.

Manual diagnóstico e estatístico de transtornos DSM-5 / [American Psychiatric Association, tradução: Maria Inês Corrêa Nascimento *et al.*]; revisão técnica: Aristides Volpato Cordioli [et al.]. - . e . Porto Alegre: Artmed, 2014. xlv, 948 p.; 25 cm. ISBN 978-85-8271-088-3.

MAJIDI-ZOLBANINA, J.; AZARFARINB, M.; SAMADIB, H.; ENAYATIC, M.; ALI-SALARI, A. Adolescent fluoxetine treatment decreases the effects of neonatal immune activation on anxiety-like behavior in mice *Behavioural Brain Research* 250 (2013) 123–132.

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

MCGOWAN, P.O., 2015. Epigenetics mechanisms of perinatal programming: translational approaches from rodent to human and back.

MELLO, B.S.F. Determinação dos efeitos da doxiciclina em um modelo de depressão induzido por lipopolissacarídeo em camundongos. 67f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Médica - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2012.

MEYER U, ENGLER A, WEBER L, SCHEDLOWSKI M, FELDON J (2008a) Preliminary evidence for a modulation of fetal dopaminergic development by maternal immune activation during pregnancy. *Neuroscience* 154:701–709.

MEYER, U.; FELDON, J. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Progress in Neurobiology*, v. 90, n. 3, p. 285–326, 2010.

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

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

MILLER, C. L. et al. Expression of the kynurenine pathway enzyme tryptophan 2,3-dioxygenase is increased in the frontal cortex of individuals with schizophrenia. *Neurobiology of Disease*, v. 15, n. 3, p. 618–629, 2004.

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.

MONTE, A.S. Minociclina na prevenção e reversão dos sintomas tipo esquizofrenia induzidos por cetamina em camundongos: possível envolvimento do estresse oxidativo e da via nitrérgica. 2013. 82f. Dissertação de Mestrado em Farmacologia - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2013.

MORERA-FUMERO, A. L.; ABREU-GONZALEZ, P. Role of melatonin in schizophrenia. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 5, p. 9037–9050, 2013.

MOUIHATE, A., GALIC, M.A., ELLIS, S.L., SPENCER, S.J., TSUTSUI, S., PITTMAN, Q.J., 2010. Early life activation of toll-like receptor 4 reprograms neural anti-inflammatory pathways. *J. Neurosci.* 30, 7975–7983.

MOUIHATE, A., GALIC, M.A., ELLIS, S.L., SPENCER, S.J., TSUTSUI, S., PITTMAN, Q.J., 2010. Early life activation of toll-like receptor 4 reprograms neural anti-inflammatory pathways. *J. Neurosci.* 30, 7975–7983.

MULLER, N., ACKENHEIL, M., 1998. Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 22, 1–33.

MULLER, N.; J. SCHWARZ, M. The Role of Immune System in Schizophrenia. *Current Immunology Reviews*, v. 6, n. 3, p. 213–220, 2010.

MÜLLER, N.; MYINT, A.-M.; SCHWARZ, M. J. Kynurenine pathway in schizophrenia: pathophysiological and therapeutic aspects. *Current pharmaceutical design*, v. 17, n. 2, p. 130–136, 2011.

MÜLLER, N.; SCHWARZ, M. Schizophrenia as an inflammation-mediated dysbalance of glutamatergic neurotransmission. *Neurotoxicity Research*, v. 10, n. 2, p. 131–148, 2006.

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

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

NAKANISHI, H.; HAYASHI, Y.; WU, Z.; The role of microglial mtDNA damage in age-dependent prolonged LPS-induced sickness behavior. *Neuron Glia Biology*, doi:10.1017/S1740925X1100010X, 2011.

NEUMEISTER A. Tryptophan depletion, serotonin, and depression: where do we stand? *Psychopharmacol. Bull* 2003;37:99–115. *Neurosci.* 2, 136.

NIMMERJAHN A, KIRCHHOFF F, HELMCHEN F: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005; 308: 1314–1318.

NISAPAKULTORN K, MAKRUDTHONG J, SA-ARD-IAM N, RERKYEN P, MAHANONDA R, TAKIKAWA O. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression and regulation in chronic periodontitis. *J. Periodontol* 2009;80:114–121.

O'BRIEN, S.M.; SCULLY, P.; DINAN, T.G. Increased tumor necrosis factor alpha concentrations with interleukin-4 concentrations in exacerbations of schizophrenia. ***Psychiatry Res*** v.160(3), p.256 – 62, 2008.

O'CONNOR JC, ANDRE C, WANG YX, LAWSON MA, SZEGEDI SS, LESTAGE J, CASTANON N, KELLEY KW, DANTZER R. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guérin. *J. Neuroscience* 2009c;29:4200–4209.

O'CONNOR JC, LAWSON MA, ANDRÉ C, BRILEY EM, SZEGEDI SS, LESTAGE J, CASTANON N, HERKENHAM M, DANTZER R, KELLEY KW. Induction ofIDO by bacille Calmette-Guérin is responsible for development of murine depressive-like behavior. *J. Immunol* 2009b;182:3202–3212.

O'CONNOR JC, LAWSON MA, ANDRÉ C, MOREAU M, LESTAGE J, CASTANON N, KELLEY KW, DANTZER R. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol. Psychiatry* 2009a;14:511–522.

Organização Mundial da Saúde (OMS) Depressão. Ficha informativa dezembro/2016 Disponível em <http://nacoesunidas.org/depressao-e-tema-de-campanha-da-oms-para-dia-mundial-da-saude-de-2017>.

PACE, T.W., HEIM, C.M., 2011. A short review on the psychoneuroimmunology of posttraumatic stress disorder: from risk factors to medical comorbidities. *Brain Behav. Immun.* 25, 6–13.

PANG Y, CAI Z, RHODES PG. Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003 Feb 16;140(2):205–14.

PANG Y, DAI X, ROLLER A, CARTER K, PAUL I, BHATT AJ, et al. Early Postnatal Lipopolysaccharide Exposure Leads to Enhanced Neurogenesis and Impaired Communicative Functions in Rats. Baud O, editor. *PLoS One*. Public Library of Science; 2016 Oct 10;11(10):e0164403.

PAPAIOANNOU, A., GEROZISSIS, K., PROKOPIOU, A., BOLARIS, S., & STYLIANOPOULOU, F. (2002). Sex differences in the effects of neonatal handling on the animal's response to stress and the vulnerability for depressive behaviour. *Behavioural Brain Research*, 129(1–2), 131–139.

PATTERSON, P. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behav Brain Res* v.204, p.313 – 21, 2009.

PÉREZ-DE LA CRUZ V, KÖNIGSBERG M, SANTAMARÍA A. Kynurenine pathway and disease: an overview. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2007;6:398–410.

PETER L.P. Smith a Henrik Hagberg a, c Andrew S. Naylor a, b Carina Mallard a. Neonatal Peripheral Immune Challenge Activates Microglia and Inhibits Neurogenesis in the Developing Murine Hippocampus. *Dev Neurosci* 2014;36:119–13.

PILAKKA- KANTHIKEEL S., et al. Immune Activation Is Associated With Increased Gut Microbial Translocation in Treatment-Naive, HIV-Infected Children in a Resource-Limited Setting. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2014;66(1):16–24.

PORSOLT RD, BERTIN A, JALFRE M. “Behavioural despair” in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol.* 1978;51:291–4.

PRESITS, P.; MOLNÁR-PERL, I. HPLC of tryptophan and its metabolites using simultaneously UV, native fluorescence and pre-column fluorescence derivatization. *Chromatographia.* v. 57; Suppl.; p. 87-92; 2003.

PULLI, B.; ALI, M.; FORGHANI, R.; SCHOB, S. HSIEH KLC, WOJTKIEWICZ G, et al. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. PLoS One. Public Library of Science; 2013 Jan 7;8(7):e67976.

QUEVEDO, J.; VSTECKERT, A.; ARENT, C. O.; COMIM, C. M.; RÉUS, G. Z.; CASSOL-JR, O. J.; VALVASSORI, S. S.; Pesquisa translacional em medicina, 2009.

RADENOVIC, L.; SELAKOVIC, V. Differential effects of NMDA and AMPA/kainite receptor antagonists on nitric oxide production in rat brain following intrahippocampal injection, **Brain Res. Bull.** v..67, p.133–141, 2005.

RADONJIĆ, N.V.; KNEZEVIĆ, I.D.; VILIMANOVICH, U.; KRAVIĆ-STEVOVIĆ, T.; MARINA, L.V.; NIKOLIĆ T. *et al.* Decreased glutathione levels and altered antioxidant defense in an animal model of schizophrenia: long-term effects of perinatal phencyclidine administration. **Neuropharmacology**, v.58, p. 739–745, 2010.

RADYUSHKIN K, HAMMERSCHMIDT K, BORETIUS S, VAROQUEAUX F, EL-KORDI A, RONNENBERG A, et al. Neuroligin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. *Genes Brain Behav.* 2009 Jun;8(4):416–25.

RAISON CL, CAPURON L, MILLER AH. CYTOKINES SING THE BLUES: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol* 2006;27:24–31.

RANTAKALLIO P, JONES P, MORING J, VON WENDTL: Association between central nervous system infections during childhood and adult onset schizophrenia and other psychoses: a 28-year follow-up. *Int J Epidemiol* 1997; 26:

RIBEIRO, B.M.M. Determinação de alterações comportamentais e mecanismos neuroinflamatórios no modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia induzida por desafio imune em ratos neonatos. 2013. 117f. Dissertação de Mestrado em Farmacologia - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2013.

RICO, J.L.R., D.B. FERRAZ, F.J. RAMALHO-PINTO, S. MORATO, Neonatal exposure to LPS leads to heightened exploratory activity in adolescent rats, *Behav. Brain Res.* 215 (2010) 102–109.

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

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

ROSS, C. et al. Neurobiology of Schizophrenia. *Neuron*, v. 52, n. 1, p. 139–153, 2006.

ROTH TL, LUBIN FD, FUNK AJ, SWEATT JD. Lasting Epigenetic Influence of Early Life Adversity on the BDNF Gene. *Biol Psychiatry.* 2009;65(9):760–9.

RUDDICK JP, EVANS AK, NUTT DJ, LIGHTMAN SL, ROOK GAW, LOWRY CA. Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev. Mol. Med* 2006;8:1–27.

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

SALUM, C.; RAISMAN-VOZARI, R.; MICHEL, P.P.; ZANARDO GOMES, M.; MITKOVSKI, M.; FERRARIO, J.E.; GINESTET, L.; DEL BEL, E.A. Modulation of dopamine uptake by nitric oxide in cultured mesencephalic neurons. *Brain Res* v.1198, p.27–33, 2008.

SANTOS, E.G.; SIQUEIRA, M.M. Prevalência dos transtornos mentais na população adulta brasileira: uma revisão sistemática de 1997 a 2009. *J. bras. psiquiatr. vol.59 no.3 Rio de Janeiro* 2010.

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

SARTER M, BODEWITZ G, STEPHENS DN. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. *Psychopharmacology (Berl)*. 1988 Jan;94(4):491–5.

SHI, L., FATEMI, S.H., SIDWELL, R.W., PATTERSON, P.H. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring, *J. Neurosci.* 23 (2003) 297–302.

SCHWARCZ, R. et al. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 13, n. 7, p. 465–477, 2012.

SCHWARZ E, GUEST PC, RAHMOUNE H, WANG L, LEVIN Y, INGUDOMNUKUL E, ET AL. Sex-specific serum biomarker patterns in adults with Asperger’s syndrome. *Mol Psychiatry*. Nature Publishing Group; 2011 Dec 28;16(12):1213–20.

SCHWARZ, J. M., & BILBO, S. D. (2012). Sex, glia, and development: Interactions in health and disease. *Hormones and Behavior*, 62(3), 243–253.

SCHWARZ, J. M., SHOLAR, P. W., & BILBO, S. D. (2012). Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 120(6), 948– 963.

SCHWARZ, J.M., BILBO, S.D., 2011. LPS elicits a much larger and broader inflammatory response than Escherichia coli infection within the hippocampus of neonatal rats. *Neurosci. Lett.* 497, 110–115.

SCHWARZ, J.M., BILBO, S.D., 2012. The Immune System and the Developing Brain Colloquium Series on the Developing Brain. Morgan Claypool Life Sciences.

SHANKS, N.; WINDLE, R.J.; PERKS, P.A.; HARBUZ, M.S.; JESSOP, D.S.; INGRAM, C.D.; LIGHTMAN, S.L. Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(10):5645-50.

SHANKS, N.; LAROCQUE, S.; MEANEY, M.J. 1995. Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis: early illness and later responsivity to stress. *J. Neurosci.* 15, 376–384.

SHI, L.; FATEMI, S.H.; SIDWELL, R.W.; PATTERSON, P.H.: Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J Neurosci* 2003; 23: 297–302.

SIERRA, A.; ENCINAS, J.M.; DEUDERO, J.J. CHANCEY JH, ENIKOLOPOV G, OVERSTREET-WADICHE LS, TSIRKA SE, MALETIC-SAVATIC M: Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 483–495.

SOMINSKY, L., A.K. WALKER, L.K. ONG, R.J. TYNAN, F.R. WALKER, D.M. HODGSON, Increased microglial activation in the rat brain following neonatal exposure to a bacterial mimetic, *Behav. Brain Res.* 226 (2012a) 351–356.

SOMINSKY, L., C.L. MEEHAN, A.K. WALKER, L. BOBROVSKAYA, E.A. MCLAUGHLIN, D.M.HODGSON, Neonatal immune challenge alters reproductive development in the female rat, *Horm. Behav.* 62 (2012b) 345–355.

SORIA, J.A.; ARROYO, D.S.; GAVIGLIO, E.A.; RODRIGUEZ-GALAN, M.C.; WANG, J.M.; *et al.* Interleukin 4 induces the apoptosis of mouse microglial cells by a caspase-dependent mechanism. *Neurobiol Dis* v.43(3), p.616–24, 2011.

SPENCER SJ, HEIDA JG, PITTMAN QJ. Early life immune challenge—effects on behavioural indices of adult rat fear and anxiety. *Behavioural Brain Research* 2005;164:231–8.

SPENCER SJ, MARTIN S, MOUIHATE A, PITTMAN QJ (2006) Early-life immune challenge: defining a critical window for effects on adult responses to immune challenge. *Neuropsychopharmacology* 31:1910–1918.

SPENCER, S.J., BOISSE, L., MOUIHATE, A., PITTMAN, Q.J., 2006. Long term alterations in neuroimmune responses of female rats after neonatal exposure to lipopolysaccharide. *Brain Behav. Immun.* 20, 325–330.

STOJKOVIC, T.; RADONJIC, N.V.; VELIMIROVIC, M. *et al.* Risperidone Reverses Phencyclidine Induced Decrease in Glutathione Levels and Alterations of Antioxidant Defense in Rat Brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* v.39, p.192-199, 2012.

STONE TW, CONNICK JH. Quinolinic acid and other kynurenines in the central nervous system. *Neuroscience* 1985;15:597–617.

STONE, W.S.; IGUCHI, L. Do Apparent Overlaps between Schizophrenia and Autistic perspective on hippocampal plasticity and vulnerability. *Brain Behav. Immun.* 30, 186–194.

STONE, W.S.; WALSER, B.; GOLD, S.D.; GOLD, P. E. Scopolamine- and morphine-induced impairments of spontaneous alternation performance in mice: reversal with glucose and with cholinergic and adrenergic agonists. *Behav. Neurosci.*, v. 105, p. 264–271, 1991.

STONE, W.S.; IGUCHI, L. Do Apparent Overlaps between Schizophrenia and Autistic Spectrum Disorders Reflect Superficial Similarities or Etiological Commonalities? *N Am J Med Sci (Boston)*. 2011;4(3):124–33.

STREIT, W.J.: Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 2002; 40: 133–139.

STROUS, R. D.; SHOENFELD, Y. Schizophrenia, autoimmunity and immune system dysregulation: A comprehensive model updated and revisited. *Journal of Autoimmunity*, v. 27, n. 2, p. 71–80, 2006.

SWEETEN, T.L.; POSEY, D.J.; SHANKAR, S.; MCDOUGLE, C.J. High nitric oxide production in autistic disorder: a possible role for interferon- γ . *Biol Psychiatry*. 2004;55(4):434–7.

SWERDLOW, N.R.; WEBER, M.; QU, Y.; LIGHT, G.A.; BRAFF, D.L. Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. ***Psychopharmacology (Berl)*** v.199, p.331–88, 2008.

TEMMINGH, H.; STEIN, D.J. Anxiety in Patients with Schizophrenia: Epidemiology and Management. *CNS Drugs*. 2015;29(10):819–32.

TENK, C.M.; KAVALIERS, M.; OSSENKOPP, K.P. Neonatal treatment with lipopolysaccharide differentially affects adult anxiety responses in the light–dark test and taste neophobia test in male and female rats. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2013;31:171–80.

THOMAS, P. et al. Differences among men and women with schizophrenia: A study of US and Indian samples. *Psychiatry Investigation*, v. 7, n. 1, p. 9–16, 2010.

TISHKINA, A.; STEPANICHEV, M.; KUDRYASHOVA, I.; FREIMAN, S.; ONUFRIEV, M.; LAZAREVA, N.; GULYAEVA, N. Neonatal proinflammatory challenge in male Wistar rats: Effects on behavior, synaptic plasticity, and adrenocortical stress response. *Behavioural Brain Research* 304 (2016) 1–10.

TREMBLAY, M.E.; LOWERY R.L.; MAJEWSKA, A.K.: Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 2010; 8:e1000527.

VASSALLO, M.; MERCIE, P.; COTTALORDA, J.; TICCHIONI, M.; DELLAMONICA, P. The role of lipopolysaccharide as a marker of immune activation in HIV-1 infected patients: a systematic literature review. *Virology* 2012;9:174.

VORHEES, C.V.; GRAHAM, D.L.; BRAUN, A.A.; SCHAEFER, T.L.; SKELTON, M.R.; RICHTAND, N.M.; WILLIAMS, M.T. (2015) Prenatal immune challenge in rats: effects of polyinosinic–polycytidylic acid on spatial learning, prepulse inhibition, conditioned fear, and responses to MK-801 and amphetamine. *Neurotoxicol Teratol* 47:54–65.

VUOLTEENAHO, R.; HALLMAN, M. Expression of toll-like receptor 4 and endotoxin responsiveness in mice during perinatal period. ***Pediatric Research***, v. 57, n. 5, pt. 1, p. 644–648, 2005.

WALKER AK, NAKAMURA T, BYRNE RJ, NAICKER S, TYNAN RJ, HUNTER M, et al. Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: Implications for the double-hit hypothesis. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(10):1515–25.

WALKER FR, MARCH J, HODGSON DM. Endotoxin exposure in early life alters the development of anxiety-like behaviour in the Fischer 344 rat. *Behavioural Brain Research* 2004;154:63–9.

WANG K, FAN L, KAIZAKI A, PANG Y, CAI Z, TIEN L. Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. *Neuroscience* 2013;234: 146–57.

WATANABE, Y.; SOMEYA, T.; NAWA, H. Cytokine hypothesis of schizophrenia pathogenesis: evidence from human studies and animal models. *Psychiatry Clin Neurosci*. v.64(3), p.217-30, jun 2010.

WIDNER B, LAICH A, SPERNER-UNTERWEGER B, LEDOCHOWSKI M, FUCHS D. Neopterin production tryptophan degradation and mental depression: what is the link? *Brain. Behav. Immun* 2002;16:590–595.

WILLIAMSON, L.L., BILBO, S.D., 2013. Chemokines and the hippocampus: a new perspective on hippocampal plasticity and vulnerability. *Brain Behav. Immun*. 30, 186–194.

WILLIAMSON, L.L., SHOLAR, P.W., MISTRY, R.S., SMITH, S.H., BILBO, S.D., 2011. Microglia and memory: modulation by early-life infection. *J. Neurosci*. 31, 15511–15521.

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

WONG, A. H. C.; VAN TOL, H. H. M. Schizophrenia: From phenomenology to neurobiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 27, n. 3, p. 269 306, 2003.

XIONG F, ZHANG L. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2013;34:27-46.

YANG, J.; QI, F.; YAO, Z. Neonatal Bacillus Calmette-Guérin vaccination alleviates lipopolysaccharide-induced neurobehavioral impairments and neuroinflammation in adult mice. *Mol Med Rep*. 2016 Aug;14(2):1574-86. doi: 10.3892/mmr.2016.5425. pub 2016 Jun 23.

YIRMIYA, R.; POLLAK, Y.; BARAK, O.; AVITSUR, R.; OVADIA, H.; BETTE, M.; WEIHE, E.; WEIDENFELD, J. Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents. *Neuropsychopharmacology*. 2001; 24:531–544.

YIRMIYA, R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. *Brain Res*. 1996; 711:163–174.

ZANGROSSI, H., JR.; FILE, S. E. Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. **Brain Research Bulletin**, v. 29, n. 3-4, p. 381-388, 1992.

ZHANG Z, VAN PRAAG H (2015) Maternal immune activation differentially impacts mature and adult-born hippocampal neurons in male mice. *Brain Behav Immun* 45:60–70.

ZHANG, X.Y.; ZHOU, D.F.; SHEN, Y.C.; et al. Effects of Risperidone and Haloperidol on Superoxide Dismutase and Nitric Oxide in Schizophrenia. *Neuropharmacology* v. 2, p.1928-1934, 2012.



Neonatal Immune Challenge with Lipopolysaccharide Triggers Long-lasting Sex- and Age-related Behavioral and Immune/Neurotrophic Alterations in Mice: Relevance to Autism Spectrum Disorders

Authors

Authors and affiliations

Charllyany Sabino Custódio, Bruna Stefânia Ferreira Mello, Adriano José Maia Chaves Filho, Camila Nayane de Carvalho Lima, Rafaela Carneiro Cordeiro, Fábio Miyajima, Gislaine Z. Réus, Silvânia Maria Mendes Vasconcelos, Tatiana Barichello, João Quevedo, Antônio Carlos de Oliveira, David Freitas de Lucena, Danielle S. Macedo 

Article

First Online: 23 May 2017

DOI: 10.1007/s12035-017-0616-1

Cite this article as:

Custódio, C.S., Mello, B.S.F., Filho, A.J.M.C. et al. Mol Neurobiol (2017). doi:10.1007/s12035-017-0616-1

95

Downloads

Abstract

Early-life challenges, particularly infections and stress, are related to neuropsychiatric disorders such as autism and schizophrenia. Here, we conducted a wide range of behavioral tests in periadolescent (postnatal day (PN) 35) and adult (PN70) Swiss mice neonatally challenged with LPS on PN5 and -7, to unveil behavioral alterations triggered by LPS exposure. Immune and neurotrophic (brain-derived neurotrophic factor—BDNF) alterations were determined in the prefrontal cortex (PFC), hippocampus (HC), and hypothalamus (HT). Since the incidence and clinical manifestations of neurodevelopmental disorders present significant sex-related differences, we sought to distinctly evaluate male and female mice. While on PN35, LPS-challenged male mice presented depressive, anxiety-like, repetitive behavior, and working memory deficits; on PN70, only depressive- and anxiety-like behaviors were observed. Conversely, females presented prepulse inhibition (PPI) deficits in both ages studied. Behavioral changes in periadolescence and adulthood were accompanied, in both sexes, by increased levels of interleukin (IL-4) (PFC, HC, and HT) and decreased levels of IL-6 (PFC, HC, and HT). BDNF levels increased in both sexes on PN70. LPS-challenged male mice presented, in both ages evaluated, increased HC myeloperoxidase activity (MPO); while when adult increased levels of interferon gamma (IFN γ), nitrite and decreased parvalbumin were observed. Alterations in innate immunity and parvalbumin were the main LPS-induced remarks between males and females in our study. We concluded that neonatal LPS challenge triggers sex-specific behavioral and neurochemical alterations that resemble autism spectrum disorder, constituting in a relevant model for the mechanistic investigation of sex bias associated with the development of this disorder.

Keywords

Immune activation Lipopolysaccharide Autism spectrum disorder Sex differences Age
Immune-inflammatory alterations