



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

**THAISA MARJORE MENEZES VIANA**

**ATIVACÃO IMUNE NEONATAL POR LIPOPOLISSACARÍDEO ASSOCIADA AO**  
**ESTRESSE NA ADOLESCÊNCIA: ESTUDO DE ALTERAÇÕES**  
**COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICAS E DA INFLUÊNCIA DO SEXO EM**  
**RATOS ADULTOS**

**FORTALEZA**

**2016**

**THAISA MARJORE MENEZES VIANA**

**ATIVACÃO IMUNE NEONATAL POR LIPOPOLISSACARÍDEO ASSOCIADA AO  
ESTRESSE NA ADOLESCÊNCIA: ESTUDO DE ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICAS E DA INFLUÊNCIA DO SEXO EM  
RATOS ADULTOS**

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

Orientador: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

**FORTALEZA**

**2016**

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)

---

- M513a Menezes Viana, Thaisa Marjore.  
Ativação imune neonatal por lipopolissacarídeo associada ao estresse na adolescência: estudo de alterações comportamentais, neuroquímicas e da influência do sexo em ratos adultos / Thaisa Marjore Menezes Viana. – 2016.  
53 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Profa. Dra. Danielle Macedo Gaspar.
1. LPS. 2. Estresse. 3. Neurodesenvolvimento. 4. Memória. 5. Autismo. I. Título.

CDD 616.9

---

**THAISA MARJORE MENEZES VIANA**

**ATIVACÃO IMUNE NEONATAL POR LIPOPOLISSACARÍDEO ASSOCIADA AO  
ESTRESSE NA ADOLESCÊNCIA: ESTUDO DE ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICAS E DA INFLUÊNCIA DO SEXO EM  
RATOS ADULTOS**

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

Aprovada em: 27/07/2016.

---

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

---

Profª. Dra. Geanne Matos de Andrade  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Márcia Valéria Brandão dos Santos Martins  
Unichristus



A Deus.

Aos meus pais, meu marido, aos meus padrinhos e amigos que sempre me incentivaram e me apoiaram em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTO**

À FUNCAP, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

A Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar, pela oportunidade concedida e pela excelente orientação.

Aos professores do programa, pelo ensino e a dedicação

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

A Carol Soares, secretária do programa de microbiologia médica pela paciência e dedicação.

Aos alunos de Iniciação Científica que trabalharam e se dedicaram neste projeto, em especial ao Adriano Chaves Filho.

A Vlória Borella, amiga de longa data e que me incentivou a concluir mais esta etapa.

Aos meus pais e ao meu marido pelo apoio incondicional e por me apoiar em todos os momentos e em todas as decisões tomadas.

“A educação é uma constante descoberta sobre  
a nossa própria ignorância.”

Will Durant, historiador americano

## RESUMO

O modelo *two-hits* propõe que desafios genéticos ou comportamentais em períodos considerados críticos no neurodesenvolvimento, como no início da vida e durante a transição da criança para o adulto, pode afetar o desenvolvimento normal do cérebro e predispor o indivíduo a psicopatologias. Estas manifestações podem ocorrer de forma distinta entre os sexos. O objetivo deste trabalho foi investigar as alterações comportamentais e neuroquímicas em ratos Wistar adultos, machos e fêmeas, após a exposição neonatal ao lipopolissacarídeo (LPS) e ao estresse na adolescência. No período neonatal, 5º dia pós natal (PN) e 7º, ratos Wistar receberam LPS intraperitoneal na dose de 50 µg/Kg ou salina (modelo de 1 desafio) e entre o PN35-PN43 (período peripuberal) os animais foram submetidos ou não ao estresse (modelo de 2 desafios). No PN60 (adulto jovem), foi realizada as análises comportamentais (campo aberto, nado forçado, teste da sacarose, interação social, labirinto em Y, inibição pré-pulso) e as análises neuroquímicas (atividade da mieloperoxidase e fator neurotrófico derivado do cérebro). No campo aberto foi observado um aumento no número de levantamentos (*rearing*) no grupo LPS + estresse dos machos ( $p < 0,005$ ). Na avaliação do tempo gasto na área central houve uma redução significativa nos grupos Salina + estresse ( $p < 0,01$ ) e LPS + estresse ( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao controle das fêmeas. No nado forçado foi observado em todos os grupos, tanto nos machos quanto nas fêmeas, uma diminuição no tempo de imobilidade quando comparado ao controle, mas não foi observado a anedonia no teste da sacarose. O IPP apresentou uma redução no reflexo de sobressalto na intensidade pré-pulso de 70 no grupo LPS + sem estresse ( $p < 0,05$ ) dos machos. Houve uma diminuição no déficit cognitivo pelo teste do labirinto em Y nos grupos LPS + estresse nos machos ( $p < 0,001$ ) e nas fêmeas ( $p < 0,05$ ), assim como no grupo LPS + sem estresse nos machos e fêmeas ( $p < 0,05$ ). Na interação social os machos apresentaram uma diminuição na porcentagem do tempo na câmara com o animal ( $p < 0,0001$ ), nas entradas da câmara com o animal ( $p < 0,05$ ) e no tempo interagindo com o animal ( $p < 0,001$ ). Não houve alterações significativas na atividade da mieloperoxidase e houve um aumento dos níveis de BDNF no hipocampo do grupo LPS + estresse tanto dos machos ( $p < 0,0001$ ) quanto das fêmeas ( $p < 0,01$ ). A exposição neonatal ao LPS mostrou alterações comportamentais e neuroquímicas nos animais adultos (machos e fêmeas) com características do Transtorno do Espectro Autista.

**Palavras-chave:** LPS, estresse, neurodesenvolvimento, memória, depressão, autismo

## ABSTRACT

The two-hit model proposes that genetic or behavioral challenges in periods considered critical in neurodevelopment, as early in life and during the transition from childhood to adolescence, can affect the normal development of the brain and predispose the individual to psychopathology. These events can occur differently between genders. The objective of this study was to investigate the behavioral and neurochemical changes in rats adults, male and female, after exposure to neonatal lipopolysaccharide (LPS) and stress in adolescence. In the neonatal period, 5th postnatal day (PN) and 7th Wistar rats received intraperitoneal LPS at a dose of 50 µg/kg or saline (1 challenge model) and between the PN35-PN43 (peripuberal period) the animals were submitted or not to stress (2 challenges model). On PN60 (young adult) was performed behavioral tests (open field, forced swimming, sucrose test, social interaction, Y maze, pre-pulse inhibition) and neurochemical analyzes (myeloperoxidase activity and brain-derived neurotrophic factor levels). In the open field there was an increase in the number of rearing in the group LPS + stress of males ( $p < 0.005$ ). Regarding the spent time in the central area there was a significant reduction in the group Salina + stress ( $p < 0.01$ ) and group LPS + stress ( $p < 0.0001$ ) when compared to control females. In the forced swimming test was observed in all groups, both in males and in females, a decrease in the immobility time when compared to the control, but was not observed anhedonia in sucrose test. IPP showed a reduction in the startle reflex in prepulse intensity at 70 in the group LPS + without stress ( $p < 0.05$ ) males. There was a decline in cognitive deficits by Y maze test in LPS + stress group in males ( $p < 0.001$ ) and females ( $p < 0.05$ ) and in the group LPS + without stress in males and females ( $p < 0.05$ ). In social interaction males showed a decrease in percentage of time in the chamber with the animal ( $p < 0.0001$ ), in the input chamber with the animal ( $p < 0.05$ ) and in the time interacting with the animal ( $p < 0.001$ ). There were no significant changes in myeloperoxidase activity and it has an increase in BDNF levels in the hippocampus of LPS + stress group both males ( $p < 0.0001$ ) and females ( $p < 0.01$ ). The exposure to neonatal of the LPS showed behavioral and neurochemical changes in rats adults (male and female) with characteristics of Autistic Spectrum Disorder.

**Keywords:** LPS, stress, neurodevelopment, memory, depression, autism

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática do período de crescimento cerebral em ratos e humanos.....	15
Figura 2 –	Papel central do cérebro na resposta comportamental e fisiológica em resposta ao estresse.....	16
Figura 3 –	Possíveis alterações neuropsiquiátricas decorrentes da alteração da permeabilidade intestinal.....	17
Figura 4 –	Estrutura do lipossacarídeo.....	19
Figura 5 –	Visão esquemática do desenho experimental.....	25
Figura 6 –	Visão esquemática dos testes comportamentais.....	29
Figura 7 –	Número de cruzamentos, <i>groomings</i> , <i>rearings</i> e tempo gasto na área central dos animais submetidos ao modelo de dois desafios.....	32
Figura 8 –	Tempo de imobilidade no teste do nado forçado e teste da sacarose dos animais submetidos ao modelo de dois desafios.....	34
Figura 9 –	Porcentagem de inibição pré-pulso (IPP) dos machos e fêmeas submetidos ao modelo de dois desafios.....	35
Figura 10 –	Porcentagem do tempo gasto na câmara animal, de entradas da câmara animal e do tempo cheirando a caixa com animal no teste da interação social dos animais submetidos ao modelo de dois desafios.....	36
Figura 11 –	Porcentagem das alternâncias corretas no teste do labirinto em Y dos animais submetidos ao modelo de dois desafios.....	37
Figura 12 –	Atividade da mieloperoxidase (MPO) dos animais submetidos ao modelo de dois desafios.....	38
Figura 13 –	Níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) do hipocampo dos animais submetidos ao modelo de dois desafios.....	39

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Protocolo do modelo de dois desafios aplicado aos animais.....	24
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CA	Campo aberto
CE	Corpo Estriado
CPF	Córtex Pré-Frontal
HC	Hipocampo
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária adrenal
HT	Hipotálamo
IL-1 $\beta$	Interleucina 1- $\beta$
IL-6	Interleucina 6
IPP	Inibição Pré-Pulso
LPS	Lipopolissacarídeo
MPO	Mieloperoxidase
NF	Nado Forçado
PAMPs	Receptores de reconhecimento de padrão molecular associado ao patógeno
PN	Pós-natal
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	14
2.1	Período de vulnerabilidade no neurodesenvolvimento .....	14
2.2	Depressão, Esquizofrenia e Transtorno do Espectro Autista.....	17
2.3	Lipopolissacarídeo .....	18
2.4	Modelo de dois desafios .....	19
2.5	Micróglia e mieloperoxidase .....	20
2.6	Fator neurotóxico derivado do cérebro .....	21
3	HIPÓTESES .....	22
4	OBJETIVO GERAL/ OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
4.1	Objetivo geral .....	22
4.2	Objetivos específicos .....	22
5	METODOLOGIA .....	23
5.1	Animais .....	23
5.2	Tratamento e Protocolo experimental .....	23
5.3	Avaliações comportamentais .....	25
5.3.1	<i>Campo aberto</i> .....	25
5.3.2	<i>Nado Forçado</i> .....	25
5.3.3	<i>Teste de Preferência pela Sacarose</i> .....	26
5.3.4	<i>Inibição Pré-Pulso</i> .....	26
5.3.5	<i>Interação Social</i> .....	27
5.3.6	<i>Labirinto em Y</i> .....	28
5.4	Avaliações neuroquímicas .....	28
5.4.1	<i>Determinação do BDNF</i> .....	29
5.4.2	<i>Determinação da atividade da mieloperoxidase</i> .....	30
5.5	Análise Estatística .....	30
6	RESULTADOS .....	31
6.1	Identificação das alterações na locomoção e no comportamento tipo ansiedade.....	31
6.2	A administração do LPS combinado ao estresse na adolescência (modelo de 2 desafios) apresentou efeitos tipo depressivo no nado forçado mas não	

	apresentou anedonia no teste da sacarose.....	33
<b>6.3</b>	<b>Sintomas positivos, negativos e comprometimento cognitivo em animais submetido ao modelo de dois desafios.....</b>	<b>34</b>
<b>6.4</b>	<b>Alterações neuroquímicas – MPO e BDNF.....</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em mamíferos, há dois grandes períodos de intensa produção sináptica e poda: antes e imediatamente após o nascimento (período pré e neonatal) e durante a transição da infância para a adolescência (ANDERSEN, 2003). Eventos negativos neste período da vida pode impactar em respostas do sistema imune e neuroendócrinas e alterar a trajetória normal de desenvolvimento do cérebro aumentando o risco de desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos no adulto. Em roedores, esses eventos são movidos por diferentes fatores, tais como privação maternal, estresse ambiental e agentes imunoestimulantes (GANGULY; BREHOUSE, 2014).

A ativação do sistema imune, seja por fatores ambientais ou imunoestimulantes, tem sido associada a psicopatologias tais como depressão, esquizofrenia e transtorno obsessivo-compulsivo (JONES; THOMSEM, 2013; VALKANOVA et al., 2013) e uma ativação imune precoce no início da vida provavelmente sensibiliza o indivíduo, permitindo assim uma ampliação de um estímulo subsequente, tornando-o mais vulnerável a depressão e a ansiedade na vida adulta (FRANK et al 2013; HENNESSY et al. 2010).

Evidências apontam que o processo inflamatório pode ter um papel importante na fisiopatologia de algumas desordens psiquiátricas, como a depressão, no qual a ativação de células imunes pode contribuir para os sintomas depressivos, incluindo anedonia, comportamento tipo ansiedade, fadiga e comprometimento cognitivo leve (MAES 2011; MAES et al 2009). A alteração na função imune provoca a liberação de citocinas produzindo o comportamento tipo doença e que partilham semelhanças com a depressão (KOO; DUMAN, 2008; DINAN 2009; DUNN et al 2005).

Assim, infecções e/ou desafios em pontos críticos no neurodesenvolvimento e no início da vida podem levar ao surgimento de doenças na vida adulta.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Período de vulnerabilidade no neurodesenvolvimento

O desenvolvimento do cérebro é um processo notável. Células progenitoras nascem se diferenciam e migram para suas posições definitivas. Axônios e dendritos são formados de importantes conexões sinápticas 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 e durante as transições da infância, adolescência, até a idade adulta. Este processo resulta em diferentes períodos críticos e sensíveis do desenvolvimento do cérebro. Hebb et al., 1949 postularam que o primeiro reforço de elementos sinápticos ocorre através da validação funcional, desde então, pesquisadores aplicaram esta abordagem para a compreensão da escultura do cérebro imaturo. Dessa forma, o cérebro tornou-se um 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), estas exposições em diferentes fases da vida podem ter consequências diversas ainda pobremente conhecidas.

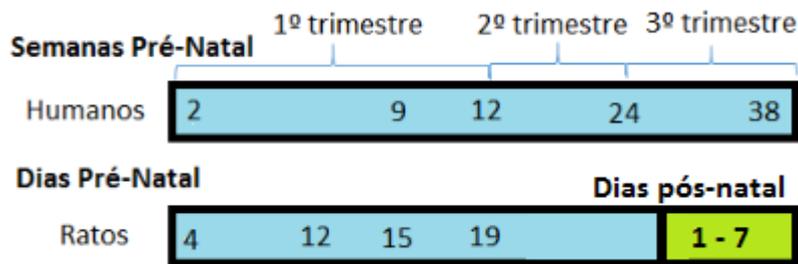
Estima-se que os dias pós-natal (PN) de 1 a 10, em roedores, equivale ao terceiro trimestre de gestação em humanos, ou que o PN 10 é equivalente ao cérebro humano ao nascer. Dessa forma, este período PN, é um período crucial para o rápido crescimento cerebral dos roedores pois ocorre na primeira semana de vida devido ao seu precoce desenvolvimento comparado aos humanos, e desafios nesta fase de desenvolvimento pode afetar a formação final do cérebro. (ROSS et al, 2015; ANDREWS; FITZGERALD, 1997; DOBBING; SANDS, 1979) (Figura 1).

Infecções durante o primeiro trimestre de gestação pelo vírus da influenza (H1N1) e rubéola tem sido associado ao aumento do risco de desenvolvimento de esquizofrenia e psicoses não afetivas, respectivamente, (BROWN et al., 2004; BROWN et al., 2000) e mais recentemente, o vírus Zika associado aos crescentes casos de microcefalia em que o afeta as células progenitoras neurais humanas aumentando a morte celular e desregulando o

crescimento celular (TANG et al., 2016). E, no final da gestação, acredita-se que não há mais tanto risco para o feto frente a infecções ocorridas neste período.

A adolescência é um período de formação neurocomportamental, no qual o hipocampo (HC), amígdala e córtex pré-frontal (CPF) sofrem maturação (ANDERSEN, 2003). Durante este período de desenvolvimento, a poda sináptica assim como a mielinização aumentam com a finalidade de aperfeiçoar a conectividade funcional. Portanto, o cérebro adolescente é um cérebro em fluxo, passando por inúmeras mudanças regressivas e progressivas nas regiões mesocorticolímbicas, e estas alterações nas regiões cerebrais não ocorre somente em humanos na fase da adolescência mas também em espécies de roedores e primatas não humanos adolescentes (SPEAR, 2000).

**Figura 1:** Representação esquemática do período de crescimento cerebral em ratos e humanos (ROSS et al 2015).



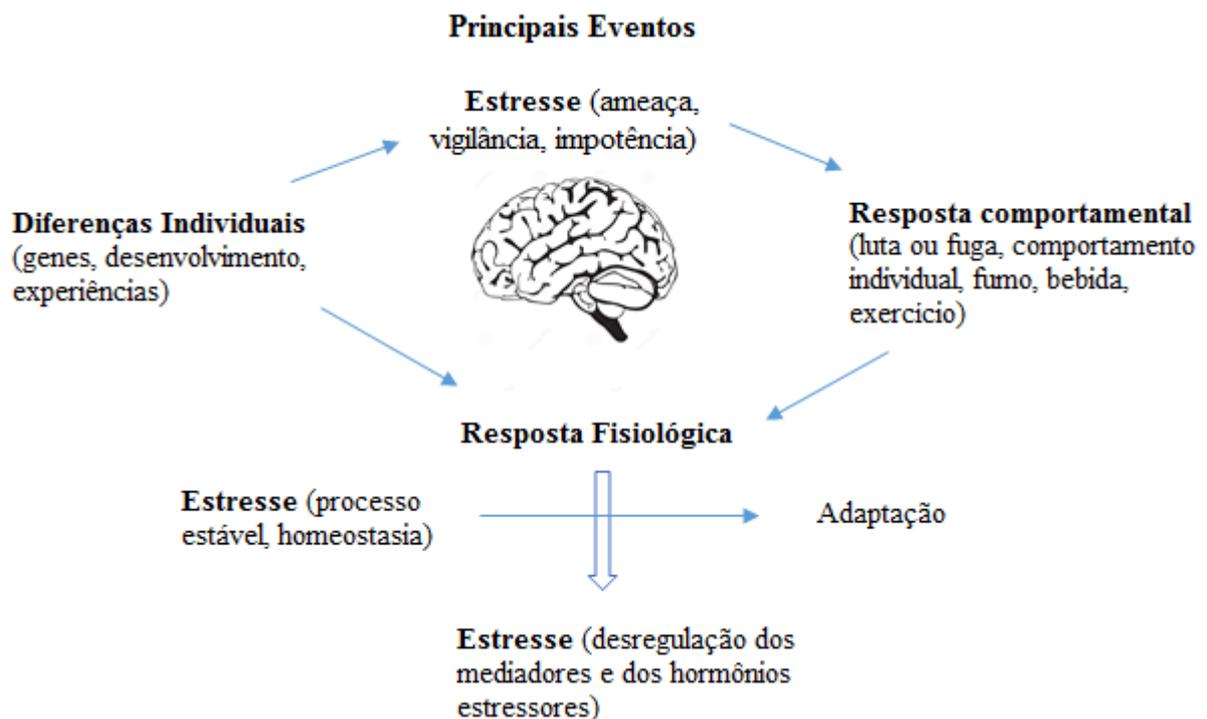
Fonte: Adaptado de Ross et al. 2015

O termo “estresse” se refere a experiências que possuem um desafio emocional e psicológico, no qual ativa o sistema nervoso autônomo e eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) permitindo assim, frente a uma situação perigosa ou ameaça, a clássica resposta de luta ou fuga para que o indivíduo/animal sobreviva. Esta resposta é essencial para sobrevivência do indivíduo/animal, no entanto, uma resposta inadequada ou excessiva pode ser prejudicial tanto para a saúde quanto para a sobrevivência do mesmo (McEWEN, 2007).

O estresse pode influenciar ao desenvolvimento e exacerbação de sintomas com desordem psiquiátricas, incluindo depressão, ansiedade, estresse pós-traumático e esquizofrenia (CASTRO et al, 2012; de KLOET et. al 2005; McEWEN, 2004). O cérebro interpreta situações como ameaçadoras ou não e determina as respostas comportamentais e fisiológicas para cada situação. Dentre as áreas alvos do estresse e seus hormônios está o hipotálamo (HT) e tronco cerebral, assim como, áreas cognitivas que desempenham um papel fundamental na memória, ansiedade e tomada de decisão. E os efeitos agudos e crônicos

frente a experiências estressantes influenciam a forma de resposta. Isto se torna evidente ao longo da vida, juntamente com fatores genéticos, que exercem uma importante influência na resposta ao estresse no adulto (McEWEN, 2007) (Figura 2). Além disso, o estresse presente na adolescência tem sido caracterizado como uma ameaça ao estado de homeostase pois requer processos adaptativos para restaurar e manter esse equilíbrio, muitas vezes decorrentes pelo rápido crescimento psicossocial, assim como, das demandas e mudanças ambientais no período da adolescência. Assim, a adolescência pode ser considerada por si só como uma fase estressante (SPEAR, 2000).

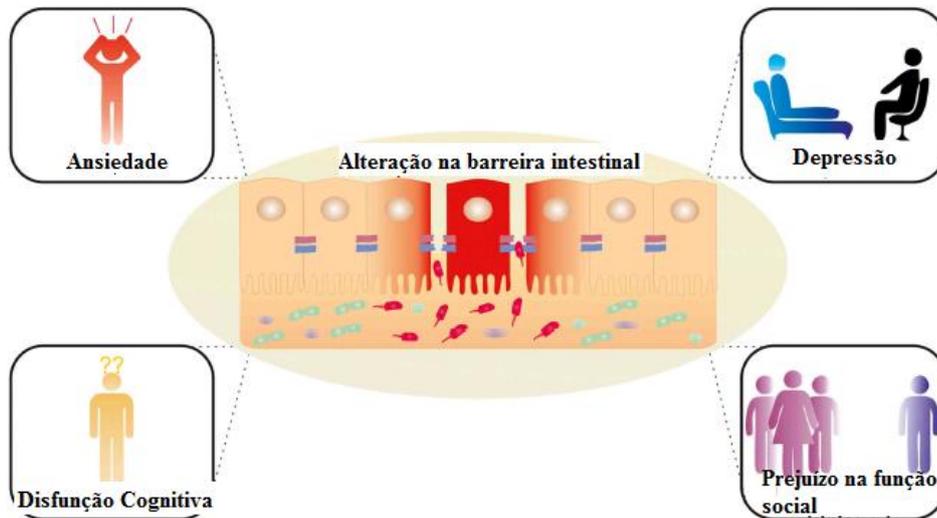
**Figura 2:** Papel central do cérebro na resposta comportamental e fisiológica em resposta ao estresse (McEWEN, 2007)



Fonte: Adaptado de McEwen 2007

Diversos estudos tem verificado que o estresse pode remodelar a composição da microbiota intestinal (WANG e WU 2005, O'MAHONY et al 2009, GALLEY et al 2014a, GALLEY et al 2014b, DE PALMA et al 2015) e impactar no desenvolvimento da barreira intestinal, e isto, está associado ao aumento da permeabilidade intestinal (SMITH et al 2010, LENNON et al 2013, SODERHOLM et al 2002). Esta disfunção na barreira intestinal pode permitir que a microbiota inicie um processo inflamatório implicando em alterações cerebrais (KELLY et al 2015).

**Figura 3:** Possíveis alterações neuropsiquiátricas decorrentes da alteração da permeabilidade intestinal (KELLY et al 2015)



Fonte: Adaptado de Kelly et al 2015

## 2.2 Depressão, Esquizofrenia e Transtorno do Espectro Autista

O transtorno depressivo maior (TDM) é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns (VILLANUEVA 2013). O transtorno tem uma prevalência na faixa de 1,5 – 1,9%, com uma estimativa média de 9,4% (KESSLER 2012) e está projetada para se tornar a segunda maior causa de incapacidade no mundo em 2020 (MURRAY 1997).

O excesso de ativação do sistema imune inato e a secreção anormal de mediadores inflamatórios, por exemplo, citocinas, tem sido demonstrado na fisiopatologia da depressão (DELLAGIOIA et al. 2013; DUNJIC-KOSTIC et al. 2012; MACEDO et al. 2013a; MACEDO et al. 2013b; MACEDO et al. 2014). O estresse regula citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , cicloxigenase 2 e peroxidação lipídica. Pacientes com TDM apresentam níveis de citocinas pró-inflamatórias no sangue elevadas (IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), e no fluido cérebro espinhal (MAES 1999; LEVINE et al. 1999). O motivo desta ativação não está claro, mas algumas evidências sugerem que a via entre o humor negativo (*negative mood*) e a inflamação são bidirecionais, pois o humor negativo ativa mecanismos fisiológicos periféricos que resultam em uma ativação dos níveis sistêmicos de inflamação e, inversamente, os mediadores inflamatórios periféricos sinalizam o cérebro para alterações

comportamentais, afetivas e cognitivas que são consistentes com os sintomas do TDM (MESSAY et al 2012).

A esquizofrenia é uma desordem neurodesenvolvimental severa que se caracteriza por um estado psicótico no qual inclui três deficiências centrais: a presença de sintomas positivos tais como alucinações e delírios, a presença de sintomas negativos que inclui a apatia social e as alterações cognitivas, isto é, deficiência na memória de trabalho e atenção (WISCHHOF, 2015; HAFNER, 1998). O início dos sintomas ocorre de forma geral na adolescência ou nos primeiros anos da vida adulta (FUSAR-POLI et al 2013).

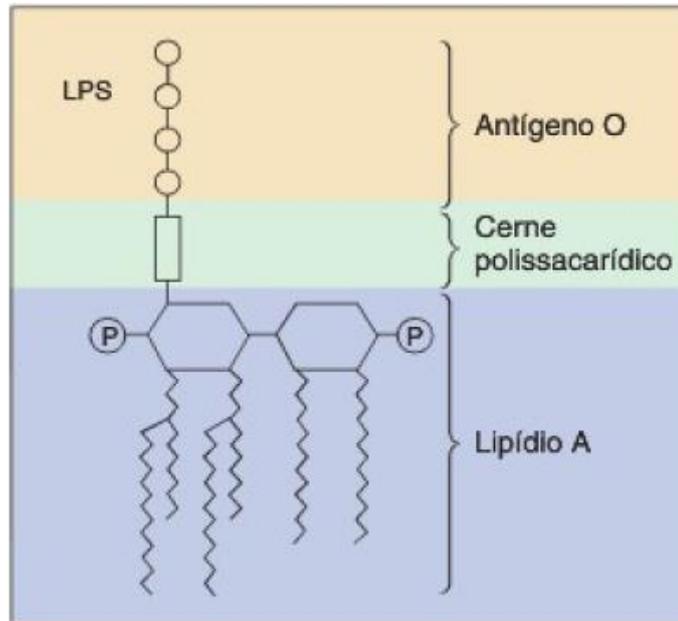
O Transtorno do Espectro Autista é uma síndrome considerada como uma forma mais branda do autismo e é definido, conforme o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V), pela presença de déficits persistentes na comunicação e na interação social em múltiplos contextos, atualmente ou por história prévia.

### 2.3 Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo (LPS) é um dos componentes característico das bactérias Gram negativas e está presente na parede externa das mesmas. É considerada uma endotoxina, liberada após a morte da bactéria e o rompimento da parede celular, no qual é reconhecido pelos PAMPs (receptores de reconhecimento de padrão molecular associado ao patógeno), incluindo os receptores *Toll-like* (TLRs) (MURRAY, 2010). O LPS se liga e ativa o TLR4, ativando o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e desencadeia a produção de citocinas pró-inflamatórias (AKIRA; TAKEDA, 2004; HOSHINO et al., 1999). Assim, o LPS é o principal imunogênico, no qual induz uma resposta inflamatória pela liberação de citocinas: interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e outros fatores, podendo levar a febre e ao choque séptico (DINEL et al., 2014; BERNARDI et al., 2014; MURRAY et al, 2010).

Possui três partes estruturais: lipídio A, cerne polissacarídico (cerne rugoso) e antígeno O. O lipídeo A é o principal componente do LPS, responsável pela viabilidade bacteriana e pela atividade da endotoxina do LPS. O cerne é um polissacarídeo ramificado de 9 a 12 açúcares e a região é a mesma para uma espécie bacteriana. O antígeno O está ligado ao cerne, se encontra na porção exterior ao LPS e é responsável pela diferenciação dos sorotipos (cepas) de uma espécie bacteriana (MURRAY et al, 2010) (Figura 4).

**Figura 4:** Estrutura do lipossacarídeo



Fonte: Murray et al 2010

A administração sistêmica do LPS mimetiza assim, um estímulo imunológico por bactérias Gram negativas. Diversos estudos demonstram que a exposição neonatal ao LPS pode causar alterações comportamentais e neuroendócrinas em animais adultos por comprometer a formação final do cérebro que está em desenvolvimento (BARTH et al, 2016; TISHKINA et al, 2016; DINEL et al, 2014; BERNARDI et al, 2014).

As gestantes, seja na presença de uma situação de estresse ou por um outro motivo que possa alterar a permeabilidade intestinal, pode levar a uma ativação inflamatória sistêmica devido a presença do LPS das bactérias Gram negativas da microbiota normal, e estas citocinas podem desencadear um papel importante no neurodesenvolvimento da sua prole.

#### 2.4 Modelo de dois desafios

O modelo de dois desafios tem a hipótese de que desafios genéticos ou ambientais no início da vida configura uma predisposição a psicopatologias, no qual, pode emergir tardiamente na vida adulta e na presença de um desafio subsequente, isto é, segundo desafio. Portanto, o modelo de dois desafios investiga uma inter-relação dinâmica entre múltiplos mecanismos postulando que o primeiro desafio durante um período crítico do desenvolvimento rompe o curso normal de desenvolvimento e estabelece uma

susceptibilidade a um segundo desafio em um momento posterior e tardio da vida (WALKER et al, 2009; MAYNARD et al, 2001).

Estudos recentes com animais usando o modelo conhecido de dois desafios têm demonstrado que a ativação imune pré-natal e o estresse pré-puberal têm efeitos sinérgicos no desenvolvimento de anomalias comportamentais, que nem ativação imune sozinha nem o estresse por si só afetam essas funções comportamentais na idade adulta, de modo que estas alterações tornaram-se evidentes com a exposição combinada desses dois fatores ambientais (GIOVANOLI et al, 2013).

## 2.5 Micróglia e mieloperoxidase

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra uma infecção, no qual envolve uma rápida resposta dos macrófagos e da micróglia.

Microglias são as células imunes primárias do cérebro de longa duração, e têm sido ligada a doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (BILBO et al, 2011). Em condições fisiológicas, a microglia tem inúmeras funções, incluindo a manutenção sináptica e a fagocitose de células apoptóticas recém-formadas no adulto no nicho de células-tronco do hipocampo. Em resposta a alterações patológicas no microambiente do sistema nervoso central (SNC), seja um microorganismo ou um sinal de perigo, a microglia assume rapidamente um fenótipo “regulado” ou “ativado”: fenótipo M1; submetendo a alterações na morfologia e na expressão de antígeno de superfície e sintetizando inúmeras citocinas pró (fenótipo M1) e anti-inflamatórias (fenótipo M2), quimiocinas, óxido nítrico, prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio, causando assim uma resposta que induz a neuroinflamação (SMITH et al, 2014; FRANK et al, 2013; COLTON, 2009).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, mas também está presente em monócitos e em micróglias ativadas em pacientes com doenças neurodegenerativas (LORIA; DATO, 2008; LEFKOWITZ, 2008). Ela é liberada no microambiente em processos inflamatórios e apresenta propriedades pró-oxidativa, pró-inflamatória e antimicrobiana (SAHEIB, 2016; LEFKOWITZ, 2008; LORIA; DATO, 2008; YAP et al, 2007; BRADLEY, 1982). A MPO tem a função de potencializar a ação das espécies reativas de oxigênio, no qual cataliza a reação entre o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o íon cloreto ( $Cl^-$ ) resultando na formação do ácido hipocloroso (HOCl), e acredita-se que o HOCl seja o responsável pela morte celular (LEFKOWITZ, 2008).

Porém, se a microglia e seus produtos inflamatórios são a causa ou a consequência da disfunção neural, ainda é necessário um intenso debate e novos estudos (BILBO et al, 2011).

## 2.6 Fator neurotrófico derivado do cérebro

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) faz parte da família de neurotrofinas e estas têm um importante papel na regulação do desenvolvimento e manutenção da função do sistema nervoso periférico (SNP) e central (SNC) (VILLANUEVA 2013, MATHE et al, 2005). A síntese aumentada e/ou liberação de neurotrofinas durante o período de desenvolvimento definido podem afetar como as redes neuronais são formadas ou mantidas, e, assim, poderia ser uma causa subjacente para o desenvolvimento de doenças (MATHE et al, 2005), além disso, as neurotrofinas se ligam a receptores de membrana nos neurônios alvo e ativam uma cascata intracelular no qual promovem a sobrevivência e efeitos tróficos (VILLANUEVA, 2013).

A resposta ao estresse imunológico durante o período neonatal é conhecida por ter uma influência de longa duração na resposta fisiológica e equivalente ao estresse na idade adulta. Vários estudos relatam os efeitos sobre o desenvolvimento físico, neuroquímico e comportamental em animais que sofreram algum tipo de estresse neste período.

Sendo assim, o presente estudo foi delineado com o intuito de buscar e determinar as principais alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela administração sistêmica de LPS no período neonatal, combinado com o estresse na adolescência. A elaboração de um quadro de como a exposição ao estresse na adolescência (modelo de dois desafios) pode gerar mudanças mais ou menos prejudiciais, permite a determinação dos chamados períodos críticos, 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 a saúde pública.

### **3. HIPÓTESES**

- A administração sistêmica de LPS na fase neonatal combinado ao estresse na adolescência produz alterações comportamentais e neuroquímicas que podem ser observados na idade adulta.
- Estas alterações ocorrem de forma distintas em machos e fêmeas.

### **4. OBJETIVO GERAL/ OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### 4.1. Objetivos Gerais

Determinar alterações comportamentais e neuroquímicas, na idade adulta em ratos, machos e fêmeas, desencadeadas pela administração sistêmica de lipopolissacarídeo na vida neonatal (modelo de 1 desafio) combinado ao estresse na adolescência (modelo de dois desafios).

#### 4.2. Objetivos Específicos

- Determinar em animais (machos e fêmeas) tratados com LPS na fase neonatal, submetidos ao estresse na adolescência e avaliados na idade adulta, as alterações comportamentais avaliados pelos seguintes testes: campo aberto, nado forçado, sacarose, interação social, inibição pré-pulso (IPP) e labirinto em Y.
- Avaliar em animais tratados com LPS na fase neonatal, submetidos ao estresse na adolescência e avaliados na idade adulta, as seguintes alterações: determinação dos níveis de BDNF e da mieloperoxidase.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar*, machos e fêmeas, com diferentes idades provenientes do Biotério Central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em caixas de prolipileno com no máximo 3 animais (1 macho e 2 fêmeas) para a procriação, a temperatura média de  $24 \pm 2^\circ \text{C}$ , umidade  $60 \pm 5\%$ , em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração e água a vontade. A prole foi utilizada para o estudo, mantidas em caixas de prolipileno com no máximo 6 animais, sob as mesmas condições ambientais informadas anteriormente.

O protocolo experimental foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) sob o número 83/2015 e os experimentos foram realizados de acordo com as normas internacionais de uso de animais em experimentação.

### 5.2 Tratamento e protocolo experimental

O dia do nascimento foi considerado como o dia pós-natal zero (PN 0). Nos dias PN 5 e PN 7, os animais foram pesados e administrado LPS de *E. coli* ou salina intraperitoneal na dose de  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$  (modelo de 1 desafio) (WALKER et al 2009).

No PN 21 os ratos foram desmamados e realizado a divisão dos grupos: (1) animais tratados com LPS neonatal e exposto ao estresse na adolescência (LPS + estresse), (2) animais tratados com LPS neonatal e não exposto ao estresse na adolescência (LPS + sem estresse), (3) animais tratados com salina e expostos ao estresse (Sal + estresse) e (4) animais tratados com salina e não expostos ao estresse (Sal + sem estresse).

Os animais foram expostos ao estresse, modelo de dois desafios, entre 35 – 43 dias após o nascimento (PNs 35 – 43) com o intervalo de 1 dia de acordo com a tabela 1. A avaliação comportamental ocorreu no PN 60 (adaptado de GIOVANOLI et al 2013).

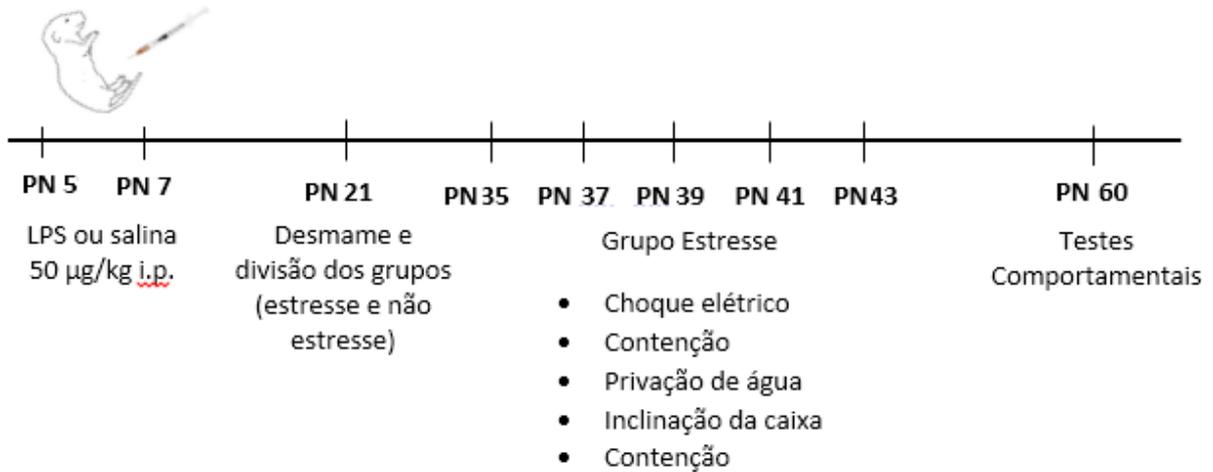
Uma visão geral do experimento pode ser observado na figura 5.

As áreas cerebrais córtex pré-frontal (CPF), hipotálamo (HT), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE) foram dissecados e armazenados a  $-80^\circ \text{C}$  até a realização dos ensaios neuroquímicos.

Tabela 1: Protocolo do modelo de dois desafios aplicado aos animais

<b>Modelo de dois desafios</b>	
<b>1º desafio – período neonatal (PN 5 e PN 7)</b>	Administração do desafio imune – LPS
<b>2º Desafio – Período pós-natal - adolescência (PNs 35-43)</b>	<p style="text-align: center;"><u>Exposição a diferentes estressores:</u></p> <p>PN 35 – <b>choque elétrico:</b> Habituação de 3 minutos, 3 choques nos pés de 1,0 mA cada com duração de 01 segundo. Intervalo de 1 minuto entre cada choque.</p> <p>PN 37 – <b>Estresse de contenção:</b> o animal foi mantido em um tubo plastic (diâmetro: 6cm, comprimento 14 cm) por 45 minutos.</p> <p>PN 39 – <b>Privação de água:</b> os animais foram privados de água por 16 horas (das 16:00 horas até as 08:00 horas do dia seguinte). Os animais tiveram livre acesso a comida durante o período de privação de água.</p> <p>PN 41 – <b>Inclinação de caixa</b> por 6 horas. A caixa foi inclinada em um ângulo de aproximadamente 45 graus.</p> <p>PN 43 – <b>Estresse de contenção:</b> o animal foi mantido em um tubo plastic (diâmetro: 6cm, comprimento 14 cm) por 45 minutos.</p>

**Figura 5:** Visão esquemática do desenho experimental



### 5.3. Avaliações comportamentais

#### 5.3.1 Campo Aberto

Com a finalidade de analisar os efeitos do tratamento com o LPS, associado ou não ao estresse, sobre a atividade locomotora, os animais foram avaliados pelo teste do campo aberto. A arena para o teste é feita de acrílico transparente (50 cm de diâmetro e 50 cm de comprimento) com o chão dividido em 4 quadrados iguais. A atividade exploratória do animal foi registrada durante cinco minutos, sendo acrescentado 1 minuto para a habituação (ARCHER, 1973). Os parâmetros avaliados foram: número de cruzamentos, número de *groomings* (comportamento estereotipado), o número de *rearings* (atividade exploratória vertical) e o tempo gasto na área central do aparato. Os experimentos foram realizados em uma sala com som atenuado e sob baixa intensidade de luz vermelha.

#### 5.3.2 Nado Forçado

Os animais foram colocados individualmente em um cilindro acrílico transparente (40 cm de altura e 18 cm de diâmetro) contendo 16 cm de água mantida a 22 – 24° C. Após um minuto de habituação, o tempo de imobilidade (em segundos) dos animais foi avaliado durante cinco minutos, em um tempo total de seis minutos no interior do cilindro. A

imobilidade foi definida como a ausência de ação, fuga orientada e comportamentos tais como: natação, salto, cheiro ou mergulho (PORSOLT et al, 1978).

### 5.3.3 Teste de Preferência pela Sacarose

Para a avaliação da preferência pela sacarose, 72 horas antes do teste, os animais foram treinados para se adaptarem a uma solução de sacarose a 1%, no qual, foram oferecidos aos animais duas garrafas contendo uma solução de sacarose a 1% em cada caixa. Vinte e quatro horas depois, uma das garrafas contendo a solução de sacarose a 1% foi substituída por uma de água durante um período de 24 horas. Após esta adaptação, os animais foram privados de água e comida por 24 horas (MAO et al 2014).

O teste ocorreu entre 09:00 e 10:00 da manhã. Os animais foram colocados individualmente em caixas com livre acesso a duas garrafas contendo 100 ml de solução de sacarose a 1% e 100 ml de água. Após uma hora, os volumes consumidos da solução de sacarose e água foram mensurados e a preferência (vista na fórmula abaixo) foi calculado em valores percentuais, pela razão entre o consumo de sacarose e o consumo total de água mais o consumo de sacarose e multiplicando-o por 100.

$$\text{Preferência Sacarose} = \frac{\text{Consumo de Sacarose}}{\text{Consumo de Sacarose} + \text{Consumo de Água}} \times 100$$

### 5.3.4 Inibição pré-pulso

Inibição Pré-Pulso (IPP) é caracterizada pela redução de um reflexo de sobressalto a um estímulo acústico intenso (pulso), quando imediatamente precedido por um estímulo de menor intensidade (pré-pulso) (HOFFMAN; ISON, 1980; SWERDLOW et al., 2004). A reação corporal dos animais a um estímulo acústico foi monitorada em uma câmara de IPP (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 ratos foram colocados em um contensor 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 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 estão localizados dentro de uma câmara acústica ventilada (64 × 60 × 40 cm). 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 começa ao colocar um animal no contensor para a aclimação, que constitui em uma exposição de 5 minutos ao ruído de fundo (65 dB). Após o período de aclimação os ratos foram apresentados a uma série de 10 estímulos de treino (pulso sozinho - 120 dB, 40 ms de duração), com um ensaio de inter-intervalo de 20s. O objetivo desta fase é permitir a habituação da resposta de sobressalto do animal. Posteriormente, a modulação IPP de sobressalto foi testada no seguinte protocolo: 50 ensaios pseudorandomizados dividido em três categorias diferentes, apresentados com um intervalo inter-estímulos de 20 s: 10 apresentações de pulso sozinho (120 dB, 40 ms de duração), 10 apresentações de cada intensidade de pré-pulso (70, 75 e 80 dB, frequência 3000 Hz, 20 ms de duração), + intensidade de pulso (com intervalo de 80ms entre pré-pulso e pulso) e 10 apresentações de ausência de estímulo, nesse bloco o animal só receberá o estímulo de ruído de fundo (adaptado de KINKEAD et al 2006).

A média da amplitude de resposta de sobressalto aos ensaios de pulso sozinho (P) e pré-pulso + pulso (PP + P) foram calculadas para cada animal. O nível de IPP em cada animal 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).

### 5.3.5 Interação social

Os animais foram avaliados quanto as interações sociais no adulto. Os animais foram inseridos em uma aparato de acrílico (60 × 40 cm) dividido em três compartimentos. Em um dos compartimentos da lateral haverá uma gaiola de ferro contendo um animal do mesmo sexo e idade (câmara social), na outra lateral haverá uma gaiola de ferro sem animal em seu interior (câmara oposta) e no meio a caixa ficará livre. Os animais foram inseridos na câmara do meio e seus comportamentos registrados durante cinco minutos (RADYUSHKIN et al., 2009). Foi avaliado: o tempo (em segundos) que o animal permanece explorando o compartimento com animal e sem animal, assim como, o tempo gasto (em segundos) cheirando a gaiola com e sem animal e o número total de entradas na câmara com animal e sem animal. Posteriormente, estes valores foram convertidos em percentual do tempo gasto na

câmara com animal, percentual do tempo cheirando a caixa com animal e o percentual de entradas na câmara animal.

#### 5.3.6 Labirinto em Y

A memória operacional ou de trabalho foi avaliada pela taxa de alternâncias espontâneas em um labirinto em Y. O labirinto consiste em três braços (40 x 5 x 16 cm) posicionados em ângulos iguais (SARTER; BODEWITZ; STEPHENS, 1988). Antes do teste, os braços são numerados, sendo o animal colocado em um deles e deixado para explorar o ambiente por 8 minutos.

A sequência dos braços os quais os animais entraram foi anotada e as informações analisadas de forma a determinar o número de entradas no braço sem repetição. Uma alternância foi considerada correta se o animal visitou um novo braço e não retornou ao braço anteriormente visitado (exemplo de alternância correta: braços 1,2,3 ou 3,1,2). Assim, a percentagem das alternâncias foi calculada como a razão entre as alternâncias corretas (n) e o número de visitas realizadas durante o período de observação (n-2), multiplicado por 100.

$$\% \text{ Alternâncias espontâneas} = \frac{n}{n - 2} \times 100$$

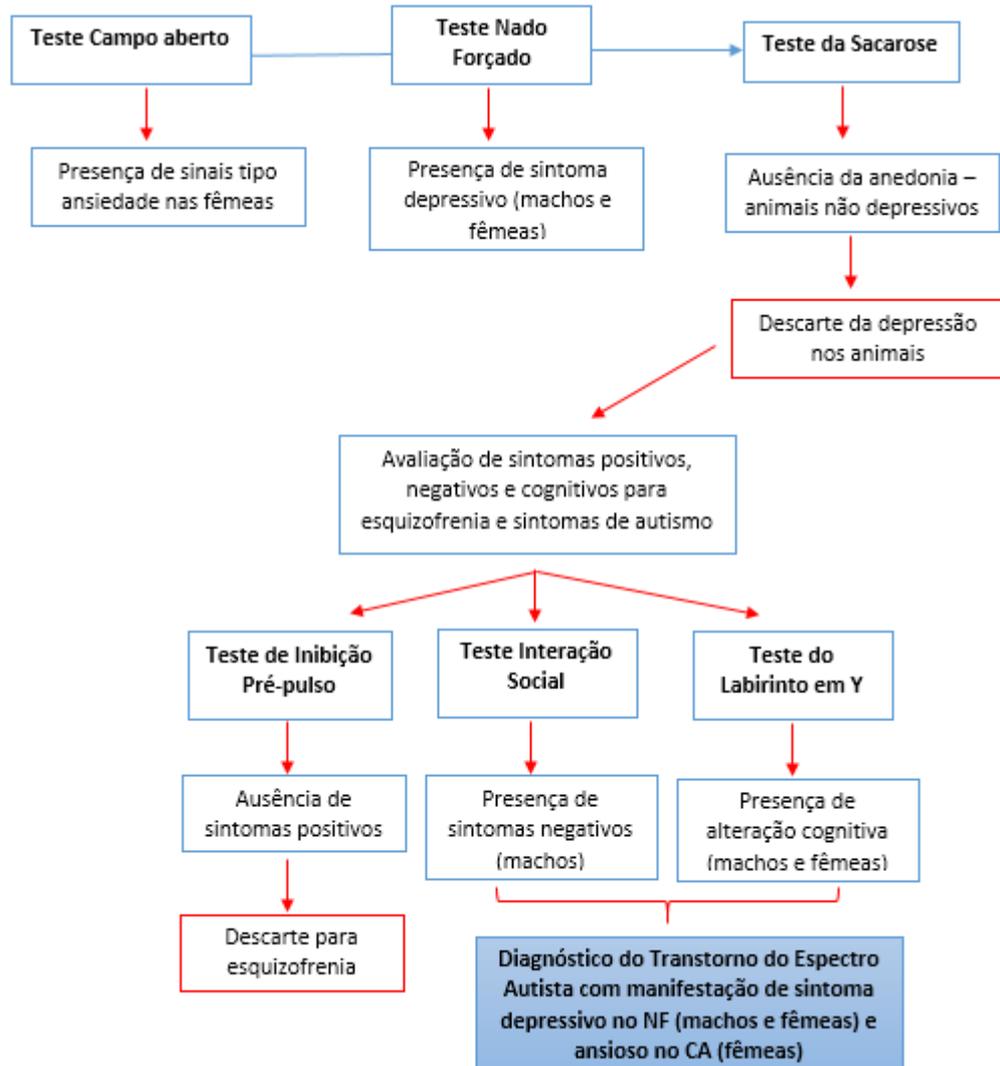
O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço eles entraram por último.

Uma visão geral dos testes comportamentais pode ser visto na figura 6.

#### 5.4 Avaliações neuroquímicas

Na idade adulta (PN 60) os animais, imediatamente após as determinações comportamentais, foram sacrificados por decapitação em guilhotina e as áreas cerebrais (CPF, HT, HC e CE) foram retiradas e imediatamente acondicionadas em temperaturas a -80° C até a realização das análises neuroquímicas.

**Figura 6:** Visão esquemática dos testes comportamentais



#### 5.4.1 Determinação do BDNF

O hipocampo foi pesado e homogeneizado em 20 volumes de tampão PBS com inibidores de protease (EMD Biosciences) e fosfatase (Sigma-Aldrich). O homogenato foi centrifugado a 14000g por 30 minutos a 4° C e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio do BDNF. Os níveis de proteína foram mensurados por um kit comercial de imunensaio de ELISA (R&D Duoset-Humano) de acordo com as instruções do fabricante.

A placa NUNC de 96 poços foi fixada com o anticorpo de captura e incubada *overnight* a temperatura ambiente. Depois de 3 lavagens foi realizado o bloqueio com o

diluído de reagente durante 1 hora a temperatura ambiente. Após mais 3 lavagens, foram inseridas as amostras (100µL em cada poço) e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente e, em seguida, realizado 3 lavagens. Posteriormente, a Estreptavidina-HRP foi adicionada e incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. Após a lavagem (3 vezes) foi adicionado a solução substrato para revelação em cada poço e a placa incubada por 20 minutos em temperatura ambiente coberta com papel alumínio. Em seguida, foi adicionada a solução de parada em cada poço. A leitura foi realizada utilizando uma leitora de Elisa a 450nm e os resultados expressos em pg/ml.

#### 5.4.2 Determinação da atividade da mieloperoxidase

As amostras foram mantidas em gelo durante todo o procedimento. Foram utilizadas todas as áreas cerebrais neste teste (CPF, HT, HC e CE).

A determinação da atividade da MPO é realizada pela ação da enzima presente no tecido na presença do peróxido de hidrogênio, no qual o diidrocloreto de  $\theta$ -dianisidina reage com o radical oxigênio resultante da reação formando um composto colorido. Este composto é medido ao longo do tempo por um espectrofotômetro para determinar a atividade da MPO no teste (BRADLEY, 1982).

Para o homogenato, foi adicionado uma solução (1 ml do tampão para cada 50 mg de tecido) consistindo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) em tampão fosfato 50mM, pH 6,0. Os homogenatos foram centrifugados (14000 rpm, 2 min a 4° C). Um total de 30 µl do sobrenadante da amostra foi adicionada em cada poço e, em seguida, 200 µl da solução contendo 0,167 mg/ml de hidrocloreto de  $\theta$ -dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi mensurada em 0, 1 e 3 minutos usando um leitor de ELISA a 460 nm (BRADLEY, 1982).

#### 5.5 Análise Estatística

Os resultados comportamentais e neuroquímicos foram analisados por *two-way* ANOVA seguido pelo teste Turkey como teste *post hoc* para comparações múltiplas. A análise foi realizada através do software GraphPad Prism versão 6.0 para Windows e os valores significativos para a análise dos dados foram considerados quando  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Identificação das alterações na locomoção e no comportamento tipo ansiedade

Na avaliação da atividade locomotora na horizontal (número de cruzamentos) no teste do campo aberto (parâmetro preditor da atividade locomotora espontânea) não foi possível observar diferença significativa entre os grupos analisados. A análise *two-way* ANOVA revelou o efeito significativo do parâmetro sexo ( $F(1,97) = 8,212$ ,  $P = 0,0051$ ), sem um efeito significativo para o parâmetro desafios no início da vida ou a interação entre eles. (Figura 7A).

Na atividade locomotora na vertical (*groomings*) foi possível observar um efeito significativo da interação entre os fatores analisados nesse estudo: desafios no início da vida *versus* sexo ( $F(3, 102) = 3,668$ ;  $P = 0,0148$ ), sem um efeito significativo desses fatores isoladamente. Além disso, embora tenha sido possível notar uma redução gradativa desse parâmetro nos grupos LPS + sem estresse, Sal + estresse, LPS + estresse quando comparados ao grupo tratado com salina sem estresse, nos animais machos, esse resultado não foi estatisticamente significativo (Figura 7B).

Em relação ao número de levantamentos (*rearings*) a análise estatística revelou um efeito significativo para a interação entre os fatores desafios no início da vida *versus* sexo ( $F(3, 100) = 5,922$ ;  $P = 0,0009$ ) mas não para cada um desses fatores isoladamente. Pelo teste Turkey, foi possível verificar, nos animais machos, um aumento significativo do número de levantamentos no grupo LPS + estresse quando comparados ao grupo Sal + sem estresse ( $P < 0,05$ ) (Figura 7C).

Na avaliação do tempo gasto na área central, pela análise *two-way* ANOVA, evidenciou-se um efeito significativo dos parâmetros desafios no início da vida ( $F(3, 109) = 10,68$ ;  $P < 0,0001$ ) e sexo ( $F(1, 109) = 14,15$ ;  $P = 0,0003$ ) isoladamente e da interação entre eles ( $F(3,109) = 6,817$ ;  $P = 0,0003$ ). O teste *post-hoc* revelou uma redução significativa do tempo gasto no centro do aparato no grupo Sal + estresse das fêmeas em comparação aos grupos Sal + sem estresse ( $p < 0,01$ ). Além disso, nas fêmeas, o grupo LPS + estresse também apresentou uma redução nesse parâmetro em relação aos grupos Sal + sem estresse ( $p < 0,0001$ ) (Figura 7D).

**Figura 7:** Número de cruzamentos (A), *groomings* (B), *rearings* (C) e tempo gasto na área central (D) dos animais submetidos ao modelo de dois desafios.

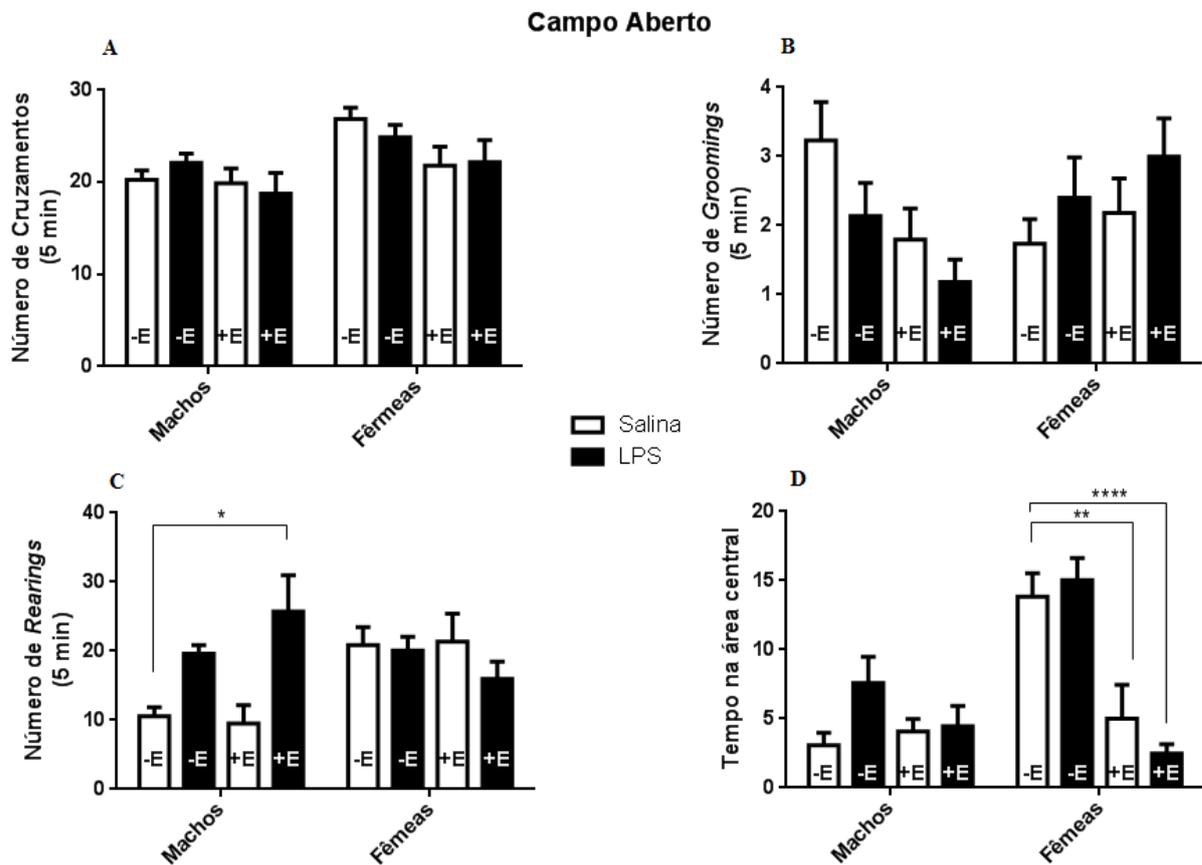


Gráfico representando a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), n de 10 animais por grupo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo controle de acordo com *two way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de Turkey. -E = sem estresse; +E = com estresse.

6.2 A administração do LPS combinado ao estresse na adolescência (modelo de 2 desafios) apresentou efeitos tipo depressivo no nado forçado mas não apresentou anedonia no teste da sacarose

Em relação ao nado forçado, houve um aumento no tempo de imobilidade em todos os grupos quando comparado ao grupo controle tanto nos machos quanto nas fêmeas. A análise two-way ANOVA revelou um efeito significativo da interação entre os fatores analisados, desafios no início da vida *versus* sexo ( $F(3, 85) = 1,134$ ;  $P = 0,3401$ ), e com efeito significativo entre os fatores analisados isoladamente, sexo ( $F(1,85) = 5,944$ ;  $P = 0,0169$ ) e desafios no início da vida ( $F(3,85) = 21,97$ ;  $P < 0,0001$ ). Pelo teste Turkey, nos animais machos, observa-se um aumento na imobilidade no grupo LPS + sem estresse, no grupo Sal + estresse, e esta imobilidade foi potencializada na presença dos dois desafios, LPS + estresse ( $p < 0,0001$ ). As fêmeas também apresentaram este aumento na imobilidade nos grupos LPS + sem estresse, Sal + estresse, mas o efeito não foi potencializado no grupo LPS + estresse ( $p < 0,001$ ) (Figura 8A).

Não foi observado a presença da anedonia em ambos os grupos (machos e fêmeas) pelo teste da sacarose, pois não houve significância entre os fatores analisados, desafios no início da vida *versus* sexo, assim como, sem efeito significativo desses fatores isoladamente (Figura 8B).

Dessa forma, pela dificuldade de identificar a depressão somente pela imobilidade do nado forçado e a ausência da anedonia na sacarose, foi realizado os teste de IPP, labirinto em Y e interação social com a finalidade de verificar possíveis alterações positivas, cognitivas e negativas, respectivamente, presentes na esquizofrenia.

**Figura 8:** Tempo de imobilidade no teste do nado forçado (A) e teste da sacarose (B) dos animais submetidos ao modelo de dois desafios.

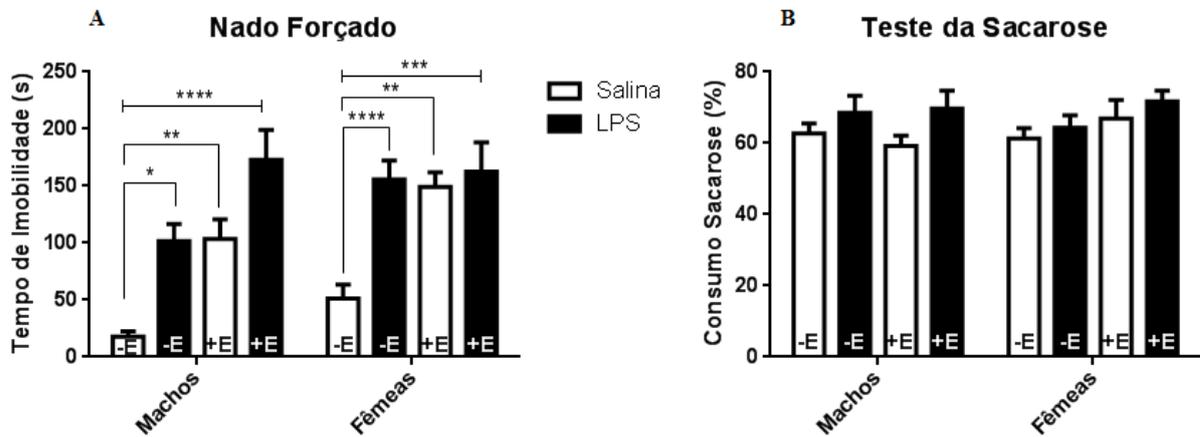


Gráfico representando a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), n de 10 animais por grupo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo controle de acordo com *two way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de Turkey. -E = sem estresse; +E = com estresse.

### 6.3 Sintomas positivos, negativos e comprometimento cognitivo em animais submetido ao modelo de dois desafios

Análise do IPP pelo teste de Turkey *post hoc* mostrou uma diminuição significativa nos níveis de reflexo de sobressalto no grupo dos machos LPS + sem estresse utilizando a intensidade de pré-pulso de 70 ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (Figura 7). No entanto, não foi observado alterações significativas nos demais grupos dos machos assim como nas fêmeas (Figura 9A e 9B).

**Figura 9:** Porcentagem de inibição pré-pulso (IPP) dos machos (A) e fêmeas (B) submetidos ao modelo de dois desafios.

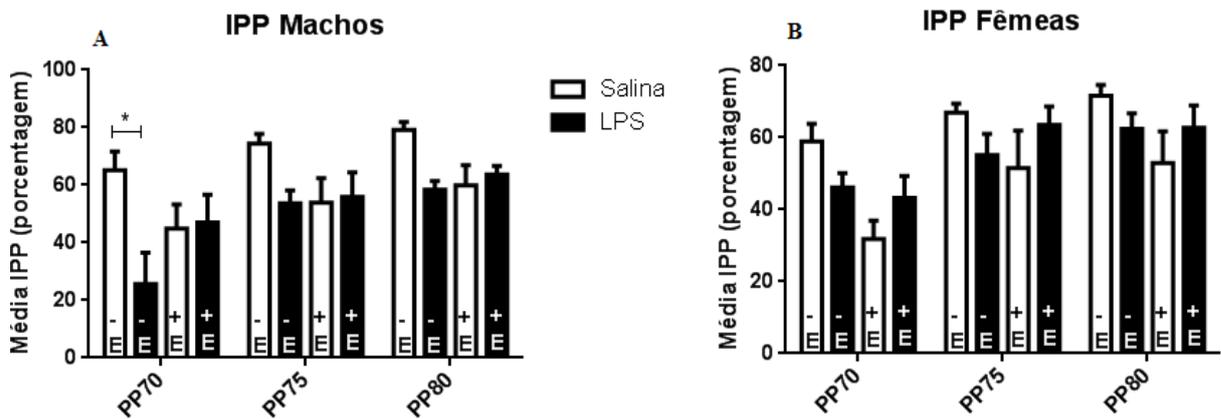


Gráfico representando a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), n de 6-10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle de acordo com *two way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de Turkey. -E = sem estresse; +E = com estresse.

No teste de interação social, utilizado para avaliar os sintomas negativos na esquizofrenia, a análise ANOVA evidenciou um efeito significativo no parâmetro desafios no início da vida em relação a porcentagem do tempo gasto na câmara com o animal ( $F(3, 83) = 10,81$ ;  $P = 0,0001$ ), assim como, na porcentagem de entradas na câmara animal ( $F(3, 78) = 6,156$ ;  $P = 0,0008$ ) e no tempo gasto interagindo/cheirando a caixa com o animal ( $F(3, 79) = 9,353$ ;  $P < 0,0001$ ), no entanto, sem efeito significativo para o parâmetro sexo ou a interação entre eles. O teste post-hoc revelou uma redução significativa no grupo LPS + estresse comparado ao controle, nos animais machos, em relação a porcentagem do tempo gasto na câmara com o animal ( $p < 0,0001$ ) (Figura 10A), na porcentagem de entradas na câmara animal ( $p < 0,05$ ) (Figura 10B) e no tempo gasto interagindo/cheirando a caixa com o animal ( $p < 0,001$ ) (Figura 10C).

**Figura 10:** Porcentagem do tempo gasto na câmara animal (A), de entradas da câmara animal (B) e do tempo cheirando a caixa com animal (C) no teste da interação social dos animais submetidos ao modelo de dois desafios.

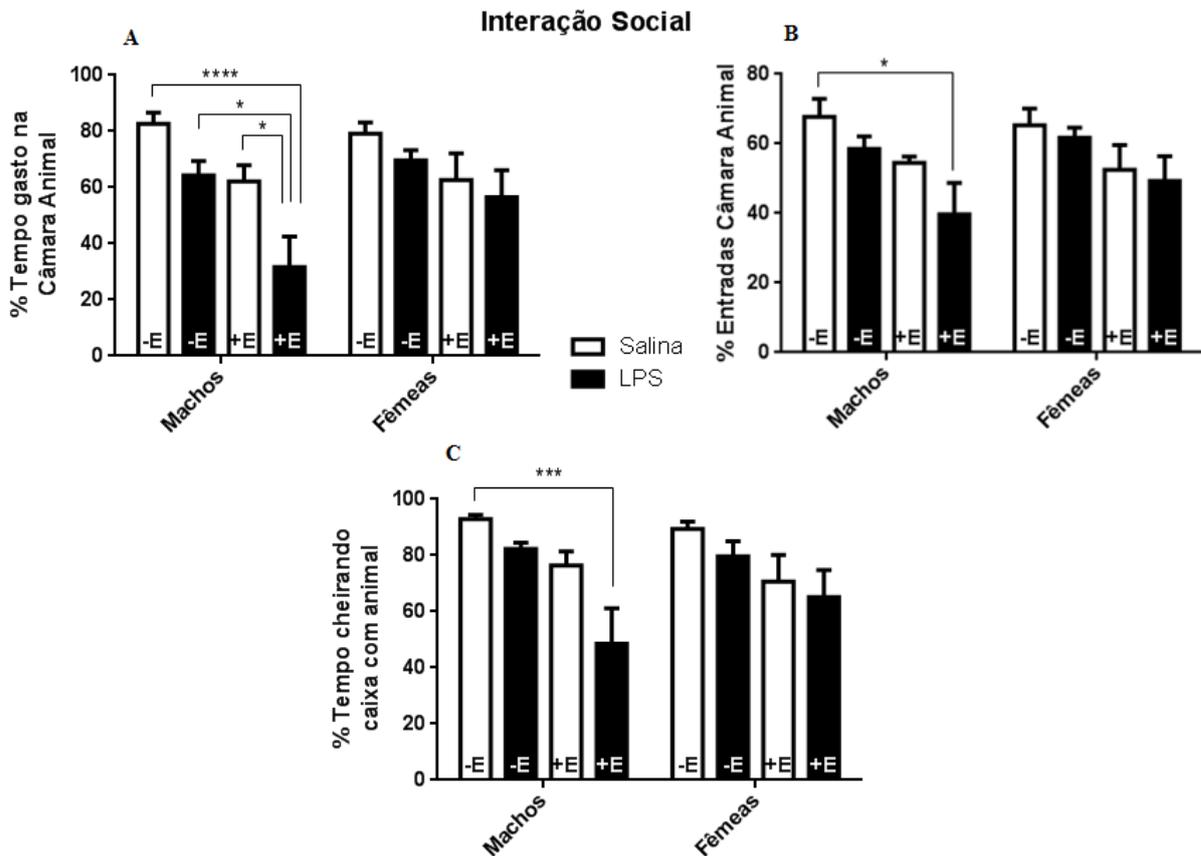


Gráfico representando a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), n de 10 animais por grupo. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo controle de acordo com *two way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de Turkey. -E = sem estresse; +E = com estresse.

O comprometimento cognitivo foi avaliado pela memória de trabalho através da taxa de alternâncias espontâneas no labirinto em Y. A análise *two way* ANOVA revelou efeitos significativos para o parâmetro desafios no início da vida ( $F(3, 66) = 13,77$ ;  $P < 0,0001$ ) mas sem efeito significativo para o parâmetro sexo ou a interação entre eles. O grupo dos animais machos, no teste Turkey, LPS + estresse apresentou uma significativa diminuição do percentual de alternâncias corretas (\*\*\* $p < 0,001$ ) assim como as fêmeas LPS + estresse ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo tratado com salina (Figura 11).

**Figura 11:** Porcentagem das alternâncias corretas no teste do labirinto em Y dos animais submetidos ao modelo de dois desafios.

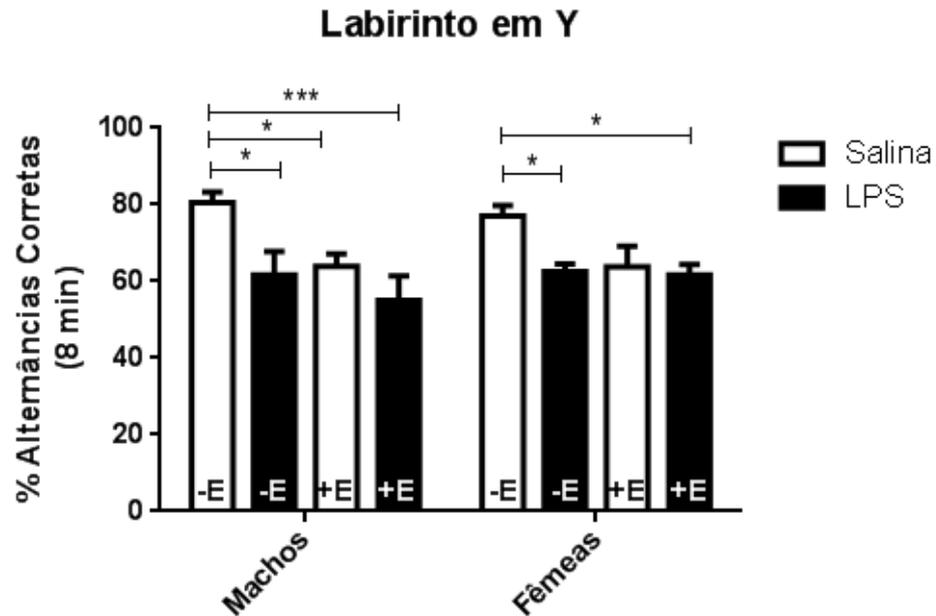


Gráfico representando a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), n de 10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle de acordo com *two way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de Turkey. -E = sem estresse; +E = com estresse.

#### 6.4 Alterações neuroquímicas – MPO e BDNF

Não foi observado alterações significativas quanto a atividade da enzima mieloperoxidase nas áreas cerebrais (CPF, HT, HC e CE) tanto nos machos quanto nas fêmeas (Figura 12 – A, B, C e D).

**Figura 12:** Atividade da mieloperoxidase (MPO) dos animais submetidos ao modelo de dois desafios.

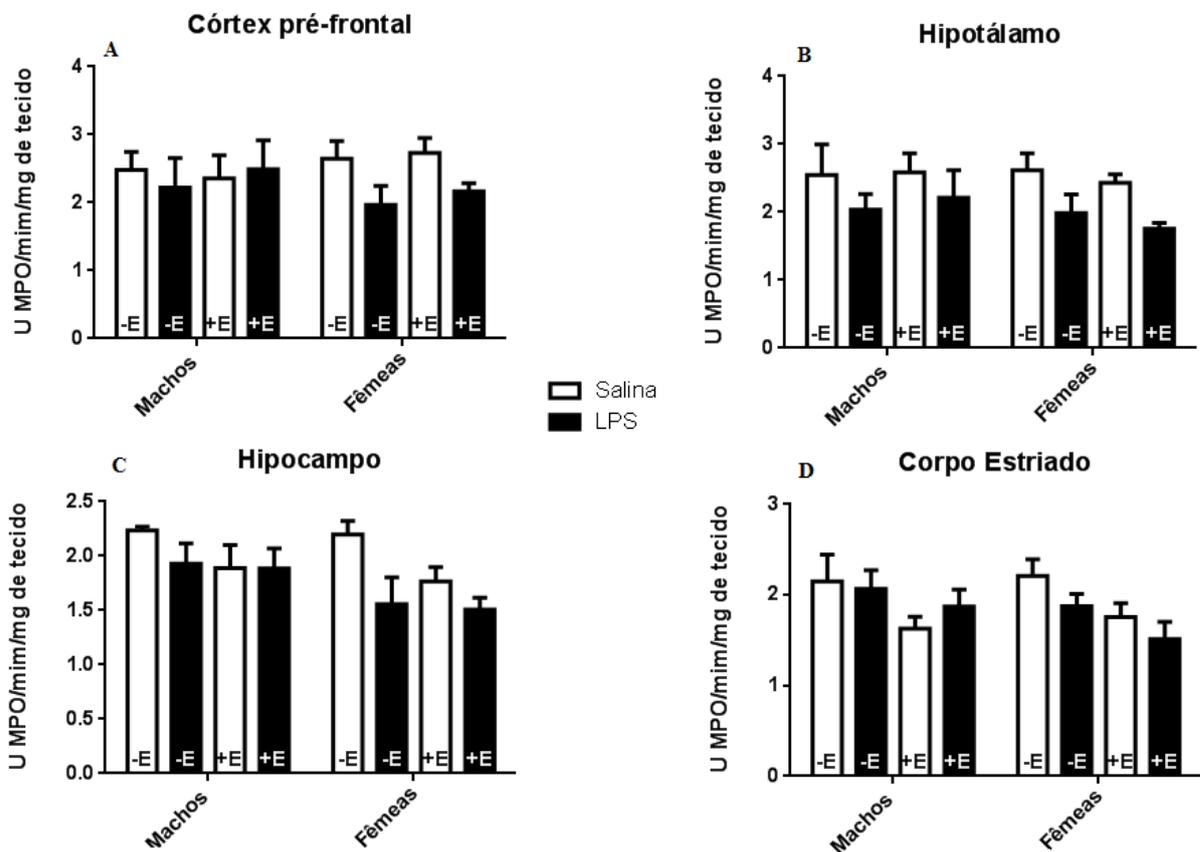


Gráfico representando a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), n de 10 animais por grupo. -E = sem estresse; +E = com estresse.

A análise *two way* ANOVA revelou efeitos significativos na interação entre os fatores analisados sexo *versus* desafios no início da vida ( $F(3, 52) = 5,872$ ;  $P = 0,0016$ ), e um efeito significativo desses fatores quando analisados isoladamente, sexo ( $F(1, 52) = 2,962$ ;  $P = 0,0912$ ) e desafios no início da vida ( $F(3,52) = 25,23$ ;  $P < 0,0001$ ). Pelo teste *post hoc* de Turkey, observa-se que os níveis de BDNF foi aumentado significativamente, nos animais machos, os grupos LPS + sem estresse ( $p < 0,0001$ ), Sal + estresse ( $p < 0,05$ ) e LPS + estresse ( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao grupo controle. O grupo das fêmeas também observou-se um aumento significativo nos grupos Sal + estresse ( $p < 0,05$ ) e no grupo LPS + estresse ( $p < 0,01$ ) (Figura 13).

**Figura 13:** Níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) do hipocampo dos animais submetidos ao modelo de dois desafios.

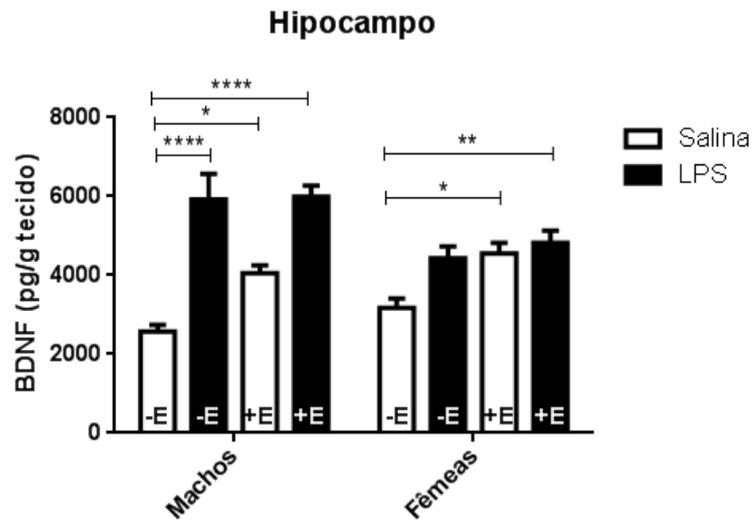


Gráfico representando a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), n de 8-10 animais por grupo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo controle de acordo com *two way* ANOVA seguido pelo teste post hoc de Turkey. -E = sem estresse; +E = com estresse.

## 7. DISCUSSÃO

Ao nosso conhecimento, não existem evidências experimentais acerca do desafio neonatal (LPS) juntamente com o estresse na adolescência, o que reforça a relevância desse estudo para compreender o papel das alterações comportamentais e neuroimunes na trajetória desenvolvimental dos transtornos psiquiátricos e o efeito do sexo. No nosso trabalho, os resultados indicam que o tratamento com LPS intraperitoneal nos animais PN5 e PN7, juntamente com o estresse na adolescência induz alterações comportamentais nos animais adultos (PN60) com comportamento do Transtorno do Espectro Autista. Os animais não apresentaram depressão pelo teste da sacarose (ausência de anedonia) e não apresentaram sintomas positivos característicos da esquizofrenia no teste de inibição pré-pulso. No entanto, os animais apresentaram alterações no teste de interação social e no teste de labirinto em Y. O Transtorno do Espectro Autista foi acompanhado pela presença de sintomas tipo depressão no nado forçado (machos e fêmeas) e sintomas tipo ansiedade (fêmeas).

O teste do campo aberto (CA) permite verificar a exploração do animal frente a um novo ambiente, possibilitando avaliar a atividade locomotora em geral e o comportamento relacionado com a ansiedade em roedores, no qual o animal tende a evitar os espaços abertos, permanecendo periféricamente ao aparato ou contra a parede, diminuindo assim o número de visitas ao centro (BAILEY e GROWLEY, 2009). As alterações comportamentais quanto a locomoção no CA tem sido controversos na literatura. É possível observar a diminuição desta atividade no trabalho de Bernardi e colaboradores (2014) em animais tratados com LPS no PN2 e PN60 nas fêmeas mas não nos machos, assim como, Walker e colaboradores (2009) também observou esta diminuição, no entanto, nos machos mas não nas fêmeas, em animais tratados com LPS no PN3 e PN5 e submetidos ao estresse na vida adulta (PN85).

Um resultado consistente neste trabalho é que o efeito do LPS neonatal combinado com a exposição ao estresse puberal culminou com um significativo aumento no comportamento tipo ansiedade nas fêmeas mas não nos machos, como pode ser observado na diminuição do tempo na área central no teste do CA (Figura 5D). O grupo Salina + Estresse das fêmeas já teve uma redução significativa no número de visitas ao centro, e sendo potencializado com o desafio do LPS neonatal (grupo fêmeas LPS + estresse). O aumento da ansiedade pelo labirinto em cruz elevado, em machos e fêmeas, sem alterações na atividade locomotora, já foi demonstrado em estudos anteriores através da ativação imune pré-natal

pelo LPS (OSKVIG, 2012; FORTIER, 2004). A ausência nos sinais de ansiedade em machos adultos (PN101) tratados com LPS no PN3 e PN5 também já foi demonstrado em um outro estudo (TISHKINA et al, 2016). Bourke e Neigh (2011) descreveram que o estresse na adolescência (PN 37- 49) aumenta o comportamento tipo depressivo e ansioso nas fêmeas pelo teste do nado forçado (NF), sacarose e pelo labirinto em cruz elevado, enquanto que nos machos não houve alterações significativas no comportamento tanto na adolescência quanto nos animais adultos, sugerindo que as fêmeas são mais sensíveis ao estresse. Ao contrário dos nossos resultados, Walker e colaboradores (2009) demonstrou que os machos tratados com LPS neonatal (PN3 e PN5) e submetidos ao estresse na vida adulta (PN85) apresentou um comportamento tipo ansiedade e as fêmeas não, tendo como justificativa o possível papel protetor do estradiol nas fêmeas. No entanto, vale ressaltar que no momento da administração do LPS neonatal, não há diferenças entre os hormônios sexuais existentes entre os animais neonatos machos e fêmeas (WALKER et al, 2009).

Diante do exposto, é importante ressaltar que estes diferentes resultados encontrados na literatura podem estar relacionados ao diferente período neonatal em que estes animais foram expostos ao desafio imune, no qual o PN1-3 está relacionado ao desenvolvimento do sistema imune, o estabelecimento da barreira hematoencefálica e as alterações do estado de maturação dos oligodendrócitos, enquanto o PN7-10 está relacionado ao pico do crescimento cerebral, da gliogênese, o aumento da densidade dendrítica e axonal e a consolidação do sistema imune (SEMPLE et al, 2014).

Tanto os machos quanto as fêmeas demonstraram um aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado exibindo portanto um sintoma tipo depressivo. O teste do NF é considerado um teste válido para avaliar sintomas depressivos onde é baseado na observação na movimentação e conseqüentemente na tentativa de fuga do cilindro com água e em seguida a imobilidade como um estado de desespero induzida por uma situação inevitável (PORSOLT, 1978). Nos nossos resultados, a imobilidade nos machos foi potencializada no grupo LPS + estresse, enquanto este efeito não foi observado nas fêmeas, onde tanto o LPS e o estresse isolados foram similares ao grupo LPS + estresse. Bernardi e colaboradores (2014), demonstraram uma diminuição significativa na mobilidade no teste do NF nos machos mas não nas fêmeas em animais tratados com LPS no PN 2 e PN 60 e Dinel e colaboradores (2014) também observaram este efeito nos machos adultos (PN 90), no entanto, tratados com LPS no PN 14. Estudos prévios demonstraram um efeito depressivo durante a idade adulta, através do teste do NF, em animais machos expostos ao LPS em diferentes fases neonatal

(PN3 e PN5) (TISHKINA et al, 2016). Mas estes resultados foram obtidos em eventos inflamatórios neonatais diversos e na ausência do estresse na adolescência, no qual pode ocorrer discrepâncias desde que o período de exposição neonatal ao LPS e da inserção do segundo desafio que pode impactar no comportamento no animal adulto.

Com o intuito de comprovar o comportamento depressivo nos animais com base no aumento da imobilidade no teste do NF, foi realizado o teste da sacarose com a intenção de demonstrar a anedonia nestes animais. O teste da sacarose não demonstrou significância entre os grupos, descartando assim, a anedonia que está presente em animais depressivos. Com isso, foram realizados outros testes para avaliar sintomas positivos, negativos e cognitivos na esquizofrenia e os sintomas tipo autismo.

A esquizofrenia foi descartada devido à ausência da psicose (sintoma positivo) pelo teste de inibição pré-pulso, ficando então evidente a presença do Transtorno do Espectro Autista pela alteração no teste de interação social e do teste do labirinto em Y.

O autismo é um distúrbio neurológico complexo que afeta indivíduos através do rompimento do desenvolvimento da interação social e da comunicação, juntamente com interesses restritos e comportamentais estereotipado restrito (KIM et al, 2016; GUPTA et al, 2014; ONORE et al, 2012). A doença muitas vezes é acompanhado também por ansiedade e depressão (STRANG, 2012), sintomas já descritos nos nossos resultados através da diminuição do tempo na área central pelas fêmeas e da diminuição da imobilidade pelo nado forçado dos machos e das fêmeas.

As alterações cognitivas foram observadas neste trabalho, tanto nos machos quanto nas fêmeas. Estas alterações estão condizentes com o aumento dos níveis de BDNF no hipocampo, uma região com o papel chave no aprendizado, na memória e nos comportamentos afetivos (NINAN, 2014). O aumento dos níveis do BDNF também está demonstrado no presente trabalho. O BDNF está associado a função de plasticidade e transmissão sináptica no hipocampo promovendo a sobrevivência e efeitos tróficos (NINAN, 2014; VILLANUEVA, 2013).

O aumento do BDNF sugere efeitos benéficos nas doenças neurodegenerativas em estudos pré-clínicos (XIE et al, 2010; SIMMONS et al, 2009; NAGAHARA et al, 2009), no entanto, diversos estudos demonstram que a sinalização alterada do BDNF no córtex e no hipocampo tem um importante impacto nas funções cognitivas (PATTWELL et al, 2012; SOLIMAN et al, 2010; NINAN et al, 2010; YU et al, 2009; CHEN et al 2006). O pró-BDNF, precursor do BDNF maduro, apresenta funções opostas e distintas do BDNF, reduzindo a

diferenciação neuronal e as espinhas dendríticas e induz a apoptose, enquanto o BDNF maduro tem sido associado a formação da espinha dendrítica e da sobrevivência neuronal. Portanto, alterações na secreção do BDNF maduro tem sido associado a alterações na memória (EGAN et al, 2003; HARIRI et al, 2003). O presente estudo não avaliou a presença do pró-BDNF ou do BDNF maduro, no entanto, é possível que a presença do pró-BDNF seja o responsável pelas alterações cognitivas no teste do labirinto em Y.

A micróglia apresenta uma importante função durante o desenvolvimento do SNC no qual inclui a atividade fagocítica durante o desenvolvimento das sinapses e neurônios, influencia na liberação de citocinas, neurotrofinas e fatores de crescimento, dentre outras funções (BROCHE, 2013). Ela ainda pode adotar diferentes fenótipos ativados em resposta a uma injúria no cérebro. Dois principais fenótipos ativados tem sido descritos: fenótipo M1 que possui atividade pró-inflamatória e neurotóxica através da liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12) e pela produção de espécies reativas de oxigênio, estando presente nesta situação a MPO devido a sua potencialização das espécies reativas de oxigênio; e fenótipo M2 que apresenta uma atividade anti-inflamatória e neuroprotetora através da liberação de citocinas IL-4 e IL-13 (TAKANO, 2015; VARNUM e IKEZU, 2012; LEFKOWITZ, 2008).

Apesar do fenótipo M2 estar aparentemente relacionado a efeitos benéficos no cérebro, Gupta e colaboradores (2014) relatam a possibilidade de que o estágio M2-ativado está correlacionado negativamente em cérebros autistas, no qual implica em uma resposta microglial desregulada e exagerada em tecidos cerebrais autistas.

Além disso, o fenótipo M2 também secreta BDNF (CUNNINGHAM et al, 2013; MIRON et al, 2013; COULL et al, 2005) corroborando com o aumento de BDNF já relatado neste trabalho e com o comprometimento cognitivo. Dessa forma, a ausência da atividade da MPO microglial pode estar relacionado devido a presença do fenótipo M2 e não do fenótipo M1, no entanto, assim como o BDNF, não foi avaliado qual fenótipo ativado estava presente nos animais expostos ao modelo de dois desafios.

## 8. CONCLUSÃO

- A exposição neonatal ao LPS associado ao estresse na adolescência gerou importantes alterações no desenvolvimento de importantes sistemas, dando origem a alterações comportamentais e neuroquímicas duradouras;
- Sintomas tipo depressão nos machos (presentes no teste do nado forçado), sintomas tipo ansiedade nas fêmeas (presentes no teste do campo aberto) e alterações cognitivas nos machos e fêmeas foram observadas nos animais adultos após a exposição neonatal ao LPS características do Transtorno do Espectro Autista;
- Foram observadas alterações, tanto nos machos quanto nas fêmeas, na memória de trabalho e acredita-se que seja pelo aumento do pró-BDNF (não avaliado neste trabalho);
- Não foi observado a atividade da MPO possivelmente pela presença do fenótipo ativado M2 microglial;

## REFERÊNCIAS

- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signaling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 499-511, 2004.
- ANDERSEN, S. L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity?. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, p. 3-18, 2003.
- ANDREWS, K.; FITZGERALD, M. Biological barriers to paediatric pain management. **The Clinical Journal of Pain**, v. 13, n. 2, p. 138-143, 1997.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, n. 21, p. 205-235, 1973.
- BAILEY, K. R.; CRAWLEY, J. N. Anxiety-Related Behaviors in Mice. **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. (2ªEd). CRC Press/Taylor & Francis. 2009, cap. 5, p. 77-101.
- BARTH, C. R.; et al. LPS-Induced neonatal stress in mice affects the response profile to an inflammatory stimulus in an age and sex-dependent manner. **Developmental Psychobiology**, v. 58, n. 5, p. 600-613, 2016.
- BERNARDI, M. M. et al. Neonatal lipopolysaccharide exposure induces sexually dimorphic sickness behaviour in adult rats. **Psychology & Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 113-123, 2014.
- BILBO, S. D.; WILLIAMSON, L. L.; SHOLAR, P. W.; SMITH, S. H. Microglia and Memory: Modulation by early-life infection. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 43, p. 15511-15521, 2011.
- BILBO, S. D.; SCHWARZ, J. M. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 3, n. August, p. 14, 2009.
- BOURKE, C. H.; NEIGH, G. N. Behavioural effects of chronic adolescent stress are sustained and sexually dimorphic. **Hormones and Behavior**, v. 60, n. 1, p. 112-120.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618-622, 1982.
- BROCHE, D.; PERRY, V. H.; NICOLL, J. A. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 39, p. 3-18, 2013.
- BROWN, A. S. et al. Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. **Archives of General Psychiatry**, v. 61, n. 8, p. 774-780, 2004.
- BROWN, A. S. et al. Nonaffective psychosis after prenatal exposure to rubella. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 3, p. 438-443, 2000.

- CASTRO, J. E. et al. Personality traits in rats predict vulnerability and resilience to developing stress-induced depression-like behaviors, HPA axis hyper-reactivity and brain changes in pERK1/2 activity. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 8, p. 1209–1223, 2012.
- CHEN, Z. Y. et al. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. **Science**, v. 314, n. 5796, p. 140-143, 2006.
- COLTON, C. A. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 4, p. 399-418, 2009.
- COULL, J. A. M. et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. **Nature**, v. 438, p. 1017-1021, 2005.
- CUNNINGHAM, C. L. et al. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 33, p. 4216-4233, 2013.
- de KLOET, E. R.; JOELS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, p. 463-475, 2005.
- DELLAGIOIA, N.; DEVINE, L.; PITTMAN, B.; HANNESTAD, J. Bupropion pre-treatment of endotoxin-induced depressive symptoms. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.31, p. 197-204, 2013.
- DINAN, T. G. Inflammatory markers in depression. **Curr Opin Psychiatry**, v. 22, p. 32-36, 2009.
- DINEL, A.-L. et al. Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood. **Journal of neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 155, 2014.
- DOBBING, J.; SANDS, J. Comparative aspects of the brain growth spurt. **Early Human Development**, v. 3, n. 1, p. 79-83, 1979.
- DUNJIC-KOSTIC, B. et al. Melancholic and atypical major depression—connection between cytokines, psychopathology and treatment. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.28, p. 1–6, 2012.
- DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H.; BEAUREPAIRE, Rd. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 891-909, 2005.
- EGAN, M. F. et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. **Cell**, v. 112, n. 2, p. 257-269, 2003.
- FERREIRA MELLO, B. S. et al. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 10, p. 1521–1529, 2013.
- FORTIER, M. E.; JOOBER, R.; LUHESHI, G. N.; BOKSA, P. Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine-induced locomotion and startle

responses in adult rat offspring. **Journal of Psychiatric Research**, v. 38, n. 3, p. 335-345, 2004.

FRANK, M. G.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Stress-induced glucocorticoids as a neuroendocrine alarm signal of danger. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 33, p. 1-6, 2013.

FUSAR-POLI, P. et al. At risk for schizophrenic or affective psychoses? A meta –analysis of DSM/ICD diagnostic outcomes in individuals at high clinical risk. **Schizophrenia Bulletin**, v. 39, p. 923-932, 2013.

aGALLEY, J. D. et al. Exposure to a social stress or disrupts the community structure of the colonic mucosa-associated microbiota. **BMC Microbiology**, v.14, p. 1-13, 2014.

bGALLEY, J. D. et al. The structures of the colonic mucosa-associated and luminal microbial communities are distinct and differentially affected by a prolonged murine stressor. **Gut Microbes**, v.5, p. 748-760, 2014.

GANGULY, P.; BRENHOUSE, H. C. Broken or maladaptive? Altered trajectories in neuroinflammation and behavior after early life adversity. **Developmental Cognitive Neuroscience**, v. 11, p. 18–30, 2015.

GIOVANOLI, S. et al. Supplementary Materials for Stress in Puberty Unmasks Latent Neuropathological Consequences of Prenatal Immune Activation in Mice Supplementary Materials & Methods. **Science (New York, N.Y.)**, v. 1095, n. March, 2013.

GUPTA, S. et al. Transcriptome analysis reveals dysregulation of innate immune response genes and neuronal activity-dependent genes in autism. **Nature communications**, 2014. DOI: 10.1038/ncomms6748 |www.nature.com/naturecommunications.

HARIRI, A. R. et al. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. **Journal of Neuroscience**, v.23, n. 17, p. 6690-6694, 2003.

HEBB, C.; KONZETT, H. Difference between morphine and synthetic analgesics in their actions on ganglionic transmission. **Nature**, v. 163, p. 720-721, 1949.

HENNESSY, M. B.; DEAK, T.; SCHIML-WEBB, P. A. Early attachment-figure separation and increased risk for later depression: Potential mediation by proinflammatory processes. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 34, p. 782-790, 2010.

HOFFMAN, H. S.; ISON, J. R. Reflex modification in the domain of startle: some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. **Psychological Review**, v. 87, n. 2, p. 175-189, 1980.

HOSHINO, K. et al. Cutting edge: toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide:evidence for TLR4 as the Lps gene product. **The Journal of Immunology**, v. 162, p. 3749-3752, 1999.

JONES, K. A.; THOMSEN, C. The role of the innate immune system in psychiatric disorders. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 53, n. March, p. 52-62, 2013.

KELLY, J. R. et al. Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, p. 1-20, 2015.

KESSLER, R.C.; The costs of depression. **The Psychiatric Clinics of North America**, v. 35, p. 1-14, 2012.

KIM, K. C. et al. Clinical and Neurobiological Relevance of Current Animal Models of Autism Spectrum Disorders. **Biomolecules & therapeutics Han'guk Ŭnyong Yangmul Hakhoe**, v. 24, n. 3, p. 207-243, 2016.

KINKEAD, B. et al. Algorithmically designed peptides ameliorate behavioral defects in animal model of ADHD by an allosteric mechanism. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 151, n. 1, p. 68-81, 2006.

KOO, J. W.; DUMAN, R. S. IL-1 beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. **The National Academy of Sciences of the USA**, v. 105, p. 751-756, 2008.

LEFKOWITZ, D. L.; LEFKOWITZ, S. S. Microglia and myeloperoxidase: A deadly partnership in neurodegenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 5, p. 726-731, 2008.

LENON, E. M. et al. Early life stress triggers persistent colonic barrier dysfunction and exacerbates colitis in adult IL-10<sup>-/-</sup> mice. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 19, p. 712-719, 2013.

LEVIN, R. et al. Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) present deficits in prepulse inhibition of startle specifically reverted by clozapine. **Progress in neuro - psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1748-1752, 2011.

LEVINE, J. et al. Cerebrospinal cytokine levels in patients with acute depression. **Neuropsychobiology**, v. 40, p. 171-176, 1999.

LORIA, V. et al. Myeloperoxidase: A new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators of Inflammation**, v. 2008, p. 10-13, 2008.

aMACEDO, D. S. et al. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, p. 1521-1529, 2013.

bMACEDO, D. S. et al. Time course of the effects of lipopolysaccharide on prepulse inhibition and brain nitrite content in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 713, p. 31-38, 2013.

MACEDO, D. S. et al. Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience**, v. 268, p. 236-246, 2014.

MAES, M. Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune activation is the key component of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 664-675, 2011.

MAES, M. et al. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. **Metabolic Brain Disease**, v. 24, n. 1, p. 27-53, 2009.

MAES, M. Major depression and activation of the inflammatory response system. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 461, p. 25-46, 1999.

MAO, Q. Q. et al. Brain-derived neurotrophic factor signalling mediates the antidepressant-like effect of piperine in chronically stressed mice. **Behavioural Brain Research**, v. 261, p. 140-145, 2014.

MATHE, A. A.; ANGELUCCI, F.; BRENE, S. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. **Molecular Psychiatry**, v. 10, p. 345-352, 2005.

MAYNARD, T. M. et al. Neural development, cell-cell signaling, and the “Two-Hit” hypothesis of schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, n. 27, p. 457-476, 2001.

MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 873-904, 2007.

MCEWEN, B. S. Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1032, p. 1-7, 2004.

MESSAY, B.; LIM, A.; MARSLAND, A. L. Current understanding of the bi-directional relationship of major depression with inflammation. **Biology of Mood & Anxiety Disorders**, v. 2, p. 1-4, 2012.

MIRON, V. E. et al. M2 microglia and macrophages drives oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. **Nature Neuroscience**, v. 16, p. 1211-1218, 2013.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Classificação, estrutura e replicação bacteriana. **Microbiologia Médica**. (6ªEd). Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2011, cap. 2, p. 9-22.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study. **The Lancet**, v. 349, p. 1498-1504, 1997.

NAGAHARA, A. H. et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. **Nature Medicine**, v. 15, n. 3, p. 331-337, 2009.

NINAM, I. Synaptic regulation of affective behaviors; role of BDNF. **Neuropharmacology**, v. 76, 2014. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.011.

NINAM, I. et al. The BDNF Val66Met polymorphism impairs NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 26, p. 8866-8870, 2010.

O'MAHONY, S. M. et al. Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. **Biological Psychiatry**, v. 65, p. 263-267, 2009.

ONORE, C.; BERTIN, A.; JALFRE, M. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 28, p. 383-392, 2012.

OSKVIK, D. B. et al. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. **Brain, Behavior, and Immunity**, n. 26, v. 4, p. 623-634, 2012.

De PALMA, G. et al. Microbiota and host determinants of behavioral phenotype in maternally separated mice. **Nature Communications**, v. 6, p. 1-13, 2015.

PATTWELL, S. S. et al. The BDNF Val66Met polymorphism impairs synaptic transmission and plasticity in the infralimbic medial prefrontal cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 7, p. 2410-2421, 2012.

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

PYTER, L. M. et al. Sex differences in the effects of adolescent stress on adult brain inflammatory markers in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 30, p. 88-94, 2013.

RADYUSHKIN, K. et al. Neuroligin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. **Genes, Brain and Behavior**, v. 8, n. 4, p. 416-425, 2009.

ROS, E.J.; et al. Developmental consequences of fetal exposure to drugs: what we know and what we still must learn. **Neuropsychopharmacology Reviews**, v.40, n.1, p.61-87, 2015.

SATER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D. N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and agonist  $\beta$ -carbolines. **Psychopharmacology**, v. 94, p. 491-495, 1988.

SEMPLE, B. D.; et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*, v. 0, p. 1-16, 2013. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.04.001

- SHAEIB, F. et al. The Impact of Myeloperoxidase and Activated Macrophages on Metaphase II Mouse Oocyte Quality. **Plos One**, v. 11, n. 3, p. e0151160, 2016.
- SIMMONS, D. A. et al. Up-regulating BDNF with an ampakine rescues synaptic plasticity and memory in Huntington's disease knockin mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 106, v. 12, p. 4906-4911, 2009.
- SMITH, F. et al. Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestinal. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 298, p. 352-363, 2010.
- SMITH, P. L. P. et al. Neonatal peripheral immune challenge activates microglia and inhibits neurogenesis in the developing murine hippocampus. **Developmental Neuroscience**, v. 36, n. 2, p. 119-131, 2014.
- SÖDERHOLM, J. D. et al. Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, p. 1257-1263, 2002.
- SOLIMAN, F. et al. A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. **Science**, v. 327, n. 5967, p.863-866, 2010.
- SPEAR, L. The adolescent brain and age-related behavioural manifestations. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 4, p. 417-463, 2000.
- STRANG, J. F. et al. Depression and Anxiety Symptoms in Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorders without Intellectual Disability. **Research in Autism Spectrum Disorders**, v. 6, p. 406-412, 2012.
- TAKANO, T. Role of Microglia in Autism: Recent Advances. **Developmental Neuroscience**, v. 37, p. 195-202, 2015.
- TANG, H. et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 587-590, 2016.
- TISHKINA, A. et al. Neonatal proinflammatory challenge in male Wistar rats: Effects on behavior, synaptic plasticity, and adrenocortical stress response. **Behavioural Brain Research**, v. 304, p. 1-10, 2016.
- TOMAZ, V. S. et al. Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience**, v. 268, p. 236-246, 2014.
- VALKANOVA, V.; EBMEIER, K. P.; ALLAN, C. L. CRP, IL-6 and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. **Journal of Affective Disorders**. v. 150, n. 3, p. 736-744, 2013.
- VARNUM, M. M.; IKEZU, T. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 60, p. 251-266, 2012.

VILLANUEVA, R. Neurobiology of major depressive disorder. **Neural Plasticity**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

WALKER, A. K. 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**, v. 34, n. 10, p. 1515–1525, 2009.

WANG, S. X.; WU, W. C. Effects of psychological stress on small intestinal motility and bacteria and mucosa in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, p. 2016-2021, 2005.

WISCHHOF, L. et al. Prenatal LPS-exposure – a neurodevelopmental rat model of schizophrenia – differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. **Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatric**, v. 57, p. 17-30, 2015.

XIE, Y.; HAYDEN, M. R.; XU, B. BDNF overexpression in the forebrain rescues Huntington's phenotypes in YAC128 mice. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 44, p. 14708-14718, 2010.

YAP, Y. W. et al. Chlorinative stress: an under appreciated mediator of neurodegeneration? **Cellular Signalling**, v.19, p. 219-228, 2007.

YU, H. et al. Variant BDNF Val66Met polymorphism affects extinction of conditioned aversive memory. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 13, p. 4056-4064, 2009.

## ANEXO A



Universidade Federal do Ceará  
 Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
 Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "ESTUDO DA ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A ADMINISTRAÇÃO NEONATAL DE LIPOLISSACARÍDEO E DESAFIADOS NA ADOLESCÊNCIA: MODELO DE UM DESAFIO X DOIS DESAFIOS.", protocolo nº83/2015, sob responsabilidade do Profa. Dra. Danielle Macedo Gaspar, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 26 de março de 2016.

Vigência do projeto	01/09/2015 a 30/08/2016
Espécie/Linhagem	Ratos heterogênico Wistar
Nº de Animais	102
Peso/Idade	170g 60 dias
Sexo	50-Machos e 52-Femêas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 26 de março de 2015

  
 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira  
 Coordenador do CEUA - UFC

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
 RODRIGO JOSÉ BEZERMA DE SIQUEIRA  
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Sigepe: 1520734