



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

WESLEY FERNANDES FONSECA

**HIPORRESPONSIVIDADE FRENTE AO DESAFIO IMUNOLÓGICO NOS
PARÂMETROS TERMORREGULATÓRIOS, HORMONAIS E COMPORTAMENTAIS
EM PERÍODOS FINAIS DA GESTAÇÃO**



Alfenas/MG

2019

WESLEY FERNANDES FONSECA

**HIPORRESPONSIVIDADE FRENTE AO DESAFIO IMUNOLÓGICO NOS
PARÂMETROS TERMORREGULATÓRIOS, HORMONAIS E COMPORTAMENTAIS
EM PERÍODOS FINAIS DA GESTAÇÃO**

Tese apresentada como parte de requisitos para obtenção de título de Doutor em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG. Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Alfenas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca da Unidade Educacional Santa Clara da Universidade Federal de
Alfenas

Fonseca, Wesley Fernandes.

Hiporresponsividade frente ao desafio imunológico nos parâmetros termorregulatórios, hormonais e comportamentais em períodos finais da gestação / Wesley Fernandes Fonseca. -- Alfenas, MG, 2019.
145 f.

Orientador: Alexandre Giusti-Paiva.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2019.

Bibliografia.

1. Lipopolissacarídeos. 2. Gravidez. 3. Comportamento de Doença. 4. Sistema Hipófise-Suprarrenal. 5. Corticosterona. I. Giusti-Paiva, Alexandre. II. Título.

CDD-571

WESLEY FERNANDES FONSECA

**HIPORRESPONSIVIDADE FRENTE AO DESAFIO IMUNOLÓGICO NOS
PARÂMETROS TERMORREGULATÓRIOS, HORMONAIS E COMPORTAMENTAIS
EM PERÍODOS FINAIS DA GESTAÇÃO**

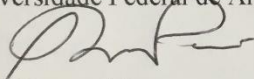
A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG. Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia.

Aprovada em: 29/04/2019

Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG

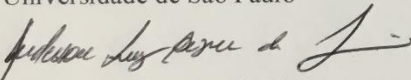
Assinatura:



Prof. Dr. Rafael Simone Saia

Instituição: Universidade de São Paulo

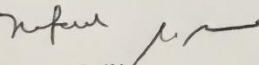
Assinatura:



Prof. Dr. Anderson Luiz Bezerra da Silveira

Instituição: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

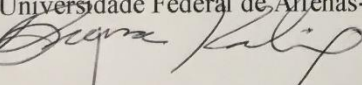
Assinatura:



Profa. Dra. Bruna Kalil

Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG

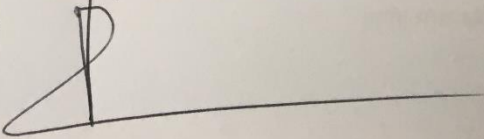
Assinatura:



Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Junior

Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG

Assinatura:



Dedico a Deus, autor de toda a vida e que deu a vida
para nos salvar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, autor e princípio, começo e o fim de todas as coisas, por ter me capacitado para chegar até aqui. Sem sua mão forte e poderosa, nada seria possível. Por meio d'Ele e Para Ele são feitas todas as coisas. Embora tão indigno e não sendo merecedor, a misericórdia de Deus se mostrou mais uma vez grandiosa e permitiu que um sonho se tornasse realidade.

Agradeço aos meus pais e toda minha família por serem reflexo de Deus em minha vida e por terem me ensinado os valores de amor e perdão. Agradeço pelos esforços, pelos ensinamentos, pela coragem ao me incentivar e por nunca medirem esforços para que meus objetivos fossem trilhados e alcançados.

Agradeço à Letícia, presente de Deus em minha vida e obra-prima d'Ele por ser simplesmente quem é e por ser aquilo que eu mais precisava quando eu menos merecia.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva, pelos ensinamentos, reflexões, momentos de crescimento e aprendizado que serão levados eternamente na memória. Agradeço pela confiança, pela paciência, pelos incentivos que me permitiram ser o que sou hoje.

Agradeço também à Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Cardoso Vilela Giusti pelas orientações e pelos ensinamentos, além de ser um modelo a ser seguido, sempre dedicada ao trabalho e também à vida, sendo tão atenciosa à todos, disposta a ajudar e incentivar, dotada de um grande coração.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório e companheiros de trabalho que fizeram com que a jornada pudesse ser levada de modo mais alegre e feliz. Agradeço pelos momentos de partilha, de alegrias, de comemorações, viagens para disciplinas e congressos e histórias que me farão lembrar carinhosamente dos dias intensos no laboratório.

Além disso, agradeço também todos aqueles que já passaram pelo laboratório e hoje trilham seus caminhos profissionais e pessoais, mas deixaram marcas profundas em mim que lembro com gratidão quando olho para o meu interior. Sempre me lembrarei com alegria de momentos ímpares e compartilhados com Layla, Mara, Ana Laura, Vanessa Veronezi, Bianca Sílvia Enes, Líd, Luciana, Vanessa Cardoso, Clarice e Lurya.

Agradeço ao técnico José dos Reis pelo carinho e amizade, pelas risadas e histórias incontáveis, pelo cuidado tão zeloso junto para com os animais que permitiram que os experimentos pudessem ser conduzidos de forma ética e profissional.

Agradeço também ao Prof. Dr. Bruno Zavan por ser meu amigo e grande incentivador, além de exemplo de profissional tanto na questão didática quanto no mérito científico.

Agradeço também aos meus amigos que são a família que Deus me deu em Alfenas, meus amigos que realizaram sonhos que outrora seriam inimagináveis, senão fosse pela graça de Deus. Agradeço ao Ygor, Alex, Felipeta, Paulinho e Will. Além disso, agradeço também aquilo que melhor poderia ter me acontecido na vida: o Kerigma! Não há palavras que possam descrever o que esse ato de amor representa em minha vida e a alegria que me proporciona.

Agradeço ainda ao Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues por ter tão gentilmente permitido que os experimentos de dosagem de corticosterona pudessem ser realizados em seu laboratório e pelos ensinamentos fundamentais que permitiram crescer e observar a ciência à partir de uma perspectiva que pudesse ao mesmo tempo ser profissional e pessoal, demonstrando amor à ciência. E agradeço à técnica Val que tanto me ensinou nos dias na FMRP na USP.

Agradeço ao Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas pela criação e manutenção do desta iniciativa pioneira que visa formar profissionais capacitados na área da Fisiologia, aptos para ingressarem no campo do ensino e da pesquisa, oferecendo a oportunidade de aprendizado em diferentes centros com os melhores profissionais da área.

Agradeço à CAPES, FINEP e CNPq pelo apoio financeiro e à Universidade Federal de Alfenas por oferecer o suporte adequado para a realização deste trabalho.

Agradeço também a todos aqueles que embora não tenham sido citados nominalmente foram importantes para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Por último, mas não menos importante, agradeço também aos animais utilizados neste trabalho que permitiram, por meio de suas vidas, os resultados e conclusões salutares contribuindo para o enriquecimento da ciência.

“Resultados negativos são justamente o que eu desejo. Eles são tão valiosos quanto os resultados positivos. Eu não poderei encontrar aquilo que funciona melhor se não encontrar o que não funciona.” — Thomas A. Edison

RESUMO

A administração de Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), um produto da parede celular de bactéria gram-negativa, mimetiza quadro de inflamação, culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Além disso, a administração do LPS promove o comportamento doentio, conjunto de alterações comportamentais, o qual é caracterizado por quadros de anorexia, anedonia, redução da atividade locomotora e exploratória, além de induzir comportamento semelhante à depressão e ansiedade. Há ainda a ativação do eixo HPA com consequente produção de hormônios glicocorticoides, em decorrência à administração do LPS. No entanto, a gestação é um momento em que há drásticas modificações no eixo HPA, sendo que a concentração plasmática de glicocorticoides encontra-se diminuída no início da mesma. Entretanto, há um aumento nos níveis de glicocorticoides a partir da segunda metade da gestação. Além do mais, é conhecida a hiporresponsividade do eixo HPA durante a gestação, sobretudo em seu período final, diante à agentes estressores. Ainda são escassos na literatura científica estudos acerca do comportamento doentio na gestação e a influência dos glicocorticoides na hiporresponsividade frente a situações de estresse. O presente estudo foi proposto com o fito de avaliar a responsividade de fêmeas prenhes ao estresse imunológico provocado através da administração de LPS. Para tanto, foi administrado salina ou LPS (200 μ g/Kg) em ratas prenhes (N= 8-20; CEUA:644/2015) nos seguintes dias de gestação (DG): 6, 9, 12, 15, 18 e 20. Através do teste de campo aberto, foi avaliada a atividade locomotora dos animais. Foi avaliado também o padrão de ingestão alimentar após a aplicação do LPS. Foi avaliado ainda a interação social após 2 horas a aplicação do LPS além de avaliar o estado anedônico das fêmeas prenhes através da análise de preferência à sacarose. Após a constatação de que no 20DG não houve qualquer resposta comportamental, além da observação que no 12DG há maior responsividade frente ao desafio imunológico em parâmetros comportamentais, tomou-se esses dois pontos afim de investigar alterações na termorregulação por meio de implantes de sensores de telemetria, alterações nas marcação para c-Fos nos neurônios em diversas regiões encefálicas, além de dosar citocinas e corticosterona plasmática, mensurando também níveis proteicos de IBA-1 e GFAP. Verificou-se no 20DG não foi constatada qualquer alteração na temperatura dos animais. Já no 12DG há uma resposta bifásica de temperatura uma vez que o LPS provocou hipotermia nas primeiras duas horas seguida de uma drástica elevação da temperatura. Não foram observadas alterações quanto à ativação neuronal em áreas como BNST, MPOA, LS, CPx, PVN e SON quando fora administrado

LPS 2 horas antes da perfusão e coleta do cérebro em animais prenhes no 20DG. Já no 12DG observou-se maior expressão de c-fos em todas as regiões encefálicas analisadas. Não foram observadas alterações quanto à produção de citocinas no 20DG. No entanto, foi constatado aumento na concentração plasmática de TNF- α em animais prenhes após 2 horas o desafio imunológico por LPS no 12DG. É observado um aumento na concentração plasmática de corticosterona em animais prenhes no 12DG, não sendo evidenciadas alterações no 20DG. A expressão de proteínas relacionadas à ativação de astrócitos (GFAP) e de micróglia (IBA-1) no hipotálamo de ratas prenhes submetidas ao LPS no 12DG e 20DG foi analisada através da técnica de Western Blot, não sendo observadas alterações nestes parâmetros. Dessa forma, de posse dos resultados obtidos, percebe-se uma hiporresponsividade ao desafio imunológico pelo LPS no 20DG, uma vez que não foram observadas quaisquer alterações em parâmetros comportamentais, nem alterações quanto à produção de citocinas e corticosterona plasmáticas. Ademais, não há ativação neuronal em áreas centrais em decorrência à administração do LPS no período pré-parto. No entanto, observa-se uma hiperresponsividade frente a endotoxemia pelo LPS no 12DG, uma vez que evocou o quadro de comportamento doentio verificado pelo déficit na capacidade exploratória/locomotora, anorexia, queda na interação social, anedonia, alteração em parâmetros termorregulatórios, já que há hipotermia seguida de elevação da temperatura corporal, aumento da expressão de c-Fos em áreas cerebrais relacionadas ao comportamento doentio além de aumentar a concentração plasmática de TNF- α e corticosterona..

Palavras-chave: LPS; gestação; *sickness behavior*; corticosterona; eixo HPA; comportamento doentio.

ABSTRACT

The administration of *Escherichia coli* Lipopolysaccharide (LPS), a gram-negative bacterial cell wall product, mimics inflammation, culminating in the production of proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α . Moreover, LPS administration promotes sickness behavior, set of behavioral changes, which is characterized by anorexia, anhedonia, decreased locomotion and exploratory activity and induces similar behavior to depression and anxiety. There is also the HPA axis activation with consequent production of glucocorticoid hormones, due to the administration of LPS. Nonetheless, pregnancy is a time when there are drastic changes in the HPA axis, and the plasma concentration of glucocorticoids is decreased at the beginning of the same. However, there is an increase in glucocorticoid levels from the second half of gestation. Furthermore, it is known to hyporesponsiveness of the HPA axis during pregnancy, particularly in its final period before the stressors. They are still rare in the literature studies about sickness behavior during pregnancy and the influence of glucocorticoids in hyporesponsiveness in face of stress. This study was proposed with the aim to evaluate the responsiveness of pregnant animals to immune stress caused by LPS administration. For this purpose, saline or LPS (200 μ g / kg) were given in pregnant rats (N=8-20; CEUA 644/2015) on the following days of gestation (DG): 6, 9, 12, 15, 18 and 20. Through the open field test, the locomotor activity of the animals was evaluated. It was also evaluated the pattern of food intake after the application of LPS. The social interaction was also evaluated after 2 hours the application of LPS in addition to evaluate the anecdotal status of pregnant females through the analysis of sucrose preference. After the observation that in the 20DG there was no behavioral response, besides the observation that in 12DG there is greater responsiveness to the immunological challenge in behavioral parameters, these two points were taken in order to investigate changes in thermoregulation by telemetry sensors implants, changes in c-Fos labeling in neurons in several brain regions, as well as cytokine and plasma corticosterone levels, also measuring protein levels of IBA-1 and GFAP. It was found in 20DG was not observed any change in temperature of the animals. 12DG there is a biphasic temperature response since the LPS caused hypothermia in the first two hours followed by a drastic rise in temperature. No changes were observed as the neuronal activation in areas such as BNST, MPOA, LS, CPx, SON and PVN when LPS was administered 2 hours before perfusion and collection of the brain in pregnant animals 20DG. In the 12DG, greater expression of c-fos was observed in all brain regions analyzed. No changes were observed in the production of cytokines in 20DG. However, there was

an increase in the plasma concentration of TNF- α in pregnant animals after 2 hours the immunological challenge by LPS in 12DG. An increase in the plasma concentration of corticosterone in pregnant animals in 12DG is observed, with no changes in 20DG. Expression of proteins related to the activation of astrocytes (GFAP) and microglia (IBA-1) in the hypothalamus of pregnant rats subjected to LPS in the 12DG and 20DG was analyzed by Western Blot technique, with no changes in these parameters were observed. Thus, with the results obtained, there is a hyporesponsiveness to the immunological challenge of LPS in 20DG, since no changes in behavioral parameters were observed, nor did changes in the production of plasma cytokines and corticosterone. In addition, there is no neuronal activation in central areas due to LPS administration in the prepartum period. However, hyperresponsiveness to endotoxemia by LPS in 12DG was observed, since it evoked sickness behavior verified by the deficit in exploratory / locomotor capacity, anorexia, drop in social interaction, anhedonia, alterations in thermoregulatory parameters, since its initial hypothermia followed by increase in body temperature and increased c-Fos expression in brain areas related to sickness behavior, and increase the plasma concentration of TNF- α and corticosterone.

Key-words: LPS; pregnancy; *sickness behavior*; corticosterone; HPA axis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio Adenocorticotrófico
ANOVA	Análise de variância
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AUC	Área sob a curva
AVP	Arginina vasopressina
BNST	Núcleo da estria terminal
CA	Campo aberto
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBG	Globulina ligante de corticosterona
CEUA	Comitê de Ética em Uso e Experimentação Anima
CO	Monóxido de Carbono
CORT	Corticosterone ou Corticosterona
COX 2	Ciclooxigenase 2
CRF	Hormônio Liberador de Corticotrofina
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
DAB	hidroclorato de diaminobenzidina
DEXA	Dexametasona
DG	Dia gestacional
DOCA	11-desoxicortisol
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EOP	Peptídeo opióide endógeno
EPM	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos da América
Fig	Figura
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GM-CSF	Fator estimulado de colônia
GR	Glicocorticoide receptor
GR	Glicocorticoide receptor ou receptor de glicocorticoide
H2O2	Peróxido de hidrogênio

HHA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
i.c.v	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
IBA-1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
IFN	Interferon
IL	Interleucina
Il-1	Interleucina 1
IL-1B	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-5	Interleucina 5
Il-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
iNOS	Óxido Nítrico Sintase indutível
Kg	kilograma
LBP	LPS- binding protein
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
LS	Área Septal Lateral
mg	miligrama
Min	minute
mL	mililitro
MnPO	Núcleo Pré-óptico mediano
mPGES1	Prostaglandina microssomal sintetase 1
MPOA	Área pré-optica medial
MR	Mineralocorticoide receptor ou receptor de mineralocorticoide
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
NTS	Núcleo do Trato Solitário

OVL	Órgão vasculoso da lâmina terminal
PBS	Tampão fosfato
PCx	Córtex Piriforme
PFG	Prostaglandinas F
pg	Picograma
PG	Prostaglandina
PGE₂	Prostaglandina
PGE₂	Prostaglandinas
pH	Potencial hidrogeniônico
POA	Área Pré-óptica
POMC	Pró-ópiomelanocortina
PRF	Fator liberador de prolactina
PS	Preferência à sacarose
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RPM	Rotações por minuto
RU-38486	Mifepristone
SAL	Salina
SI	Sistema Imune ou Sistema Imunológico
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SON	Núcleo Supraóptico do Hipotálamo
TBE	2,2,2 tribromoetanol
TLR-4	<i>Toll like receptor 4</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF-β	Fator de necrose tumoral beta
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas-MG

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
=	Igual
+	Mais
±	Mais ou menos
<	Menor /
/	Por
%	Porcentagem ~
μ	Micro
α	Alfa
β	Beta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Flutuações hormonais ao longo da gestação de ratos.....	27
Figura 2	Mecanismo de ação intracelular do LPS em células imunológicas.....	29
Figura 3	Mecanismo de ação do LPS e formas de comunicação com o Sistema Nervoso Central.....	33
Figura 4	Aparato para execução do teste do campo aberto.....	45
Figura 5	Aparato utilizado para a execução do teste de Interação Social.....	48
Figura 6	Presença de espermatozoides no lavado vaginal de ratas no fase estro do ciclo estral.....	58
Figura 7	Gráfico referente à exposição dos animais no campo aberto após 2 horas do LPS.....	60
Figura 8	Efeito do LPS na ingestão alimentar ao longo de 24 horas em diferentes dias de gestação.....	62
Figura 9	Efeito do LPS na ingestão alimentar 24 horas após a endotoxemia em diferentes dias de gestação.....	63
Figura 10-	Efeito do LPS após 2 horas de sua aplicação na interação social de animais prenhes ao longo da gestação.....	65
Figura 11	Análise da preferência à sacarose de animais prenhes submetidos à endotoxemia por LPS (200 µg/Kg) em variados períodos da gestação.....	67
Figura 12-	Análise da variação da temperatura animais prenhes submetidos à endotoxemia por LPS (200 µg/Kg) ao longo de 480 minutos no 12º DG e no 20º DG.....	69

Figura 13	Análise do índice térmico de animais nos 12DG e 20DG submetidos à endotoxemia através da administração de LPS (200 µg/Kg).....	71
Figura 14	Análise do índice térmico de animais nos 12DG e 20DG submetidos à endotoxemia através da administração de LPS (200 µg/Kg)	73
Figura 15	Efeito do LPS na dose de 200 µg/Kg em ratos controle (salina) e tratados no 12º DG e 20º DG sobre a expressão de c-Fos.....	74
Figura 16	Efeito do desafio imunológico através da administração de LPS (200 µg/Kg) em ratas prenhes no 12º DG e 20ºDG sobre a concentração plasmática de citocinas.....	77
Figura 17	Efeito do LPS administrado em ratas prenhes no 12ºDG e 20ºDG sob a concentração plasmática de corticosterona analisada após 2 horas os tratamentos.....	78
Figura 18	Efeito da administração do LPS sobre a quantidade de proteínas (IBA-1 e GFAP) no hipotálamo de fêmeas prenhes.....	80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	PRENHEZ DE RATOS	22
1.2	RESPOSTAS AO DESAFIO IMUNOLÓGICO COM LPS.....	27
1.3	O LPS DURANTE A GESTAÇÃO	36
2	JUSTIFICATIVA	40
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	41
3.1.1	Objetivos Específicos	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	ANIMAIS	42
4.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	42
4.3	TRATAMENTO COM LPS.....	43
4.4	ANÁLISE COMPORTAMENTAL	43
4.4.1	Análise da locomoção.....	44
4.4.2.	Análise da ingestão alimentar	46
4.4.3	Análise da anedonia	46
4.4.4	Teste de interação social.....	47
4.5	ANÁLISE DA TEMPERATURA CORPORAL.....	48
4.6	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS, PERFUSÃO E C-FOS	49
4.7	DOSAGEM DE CITOCINAS	50
4.8	DOSAGEM DE CORTICOSTERONA	51
4.9	WESTERN BLOT	52
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
5	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	55

5.1	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL EM PARÂMETROS RELACIONADOS À LOCOMOÇÃO/EXPLORAÇÃO, INGESTÃO ALIMENTAR, INTERAÇÃO SOCIAL E ANEDONIA.....	55
5.2	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS, PERFUSÃO E IMUNOHISTOQUÍMICA.....	56
5.3	ANÁLISE DA TEMPERATURA.....	57
5.4	DOSAGEM DE CORTICOSTERONA E CITOCINAS	57
6	RESULTADOS	58
6.1	ANÁLISE DO TESTE DO CAMPO ABERTO	59
6.2	ANÁLISE DA INGESTÃO ALIMENTAR.....	61
6.3	ANÁLISE DA INTERAÇÃO SOCIAL.....	64
6.4	ANÁLISE DA PREFERÊNCIA À SACAROSE.....	66
6.5	ANÁLISE DA TEMPERATURA.....	68
6.6	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA C-FOS	72
6.7	DOSAGEM DE CITOCINAS PLASMÁTICA	76
6.8	DOSAGEM DE CORTICOSTERONA	78
6.9	WESTERN BLOT	79
7	DISCUSSÃO	81
7.1	CAMPO ABERTO.....	81
7.2	ANÁLISE DA INGESTÃO ALIMENTAR.....	83
7.3	TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL	85
7.4	PREFERÊNCIA À SACAROSE.....	87
7.5	AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA	91
7.6	IMUNOHISTOQUÍMICA	96
7.7	DOSAGEM DE CITOCINAS.....	100
7.8	DOSAGEM DE CORTICOSTERONA	103
7.9	WESTERN BLOT	105

8	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
	ANEXO A	139
	APÊNDICE A	140

1 INTRODUÇÃO

A gestação compreende uma fase marcada por acentuadas modificações fisiológicas com objetivo de garantir o sucesso da prenhez por meio do nascimento da prole. Destaca-se, nesta fase, a modificação no eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), sendo que a resposta do eixo encontra-se diminuído diante de situações de estresse (HILLERER et al, 2011; SLATTERY; NEUMANN, 2007; BRUNTON; RUSSELL; DOUGLAS, 2008; NEUMANN, 2003). Além do mais, é sabido que os níveis de glicocorticoides variam ao longo da gestação, sendo que nos períodos iniciais tais hormônios encontram-se reduzidos contrastando com sua elevação e ápice nos períodos finais da gestação, embora o eixo HPA esteja suprimido (BARLOW; MORRISON; SULLIVAN, 1975; ATKINSON; WADDELL, 1995).

Uma maneira de induzir a ativação do eixo HPA, culminando na produção de glicocorticoides, é o uso de endotoxinas de origem bacterianas, tal como lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* (LPS). O LPS promove a ativação do sistema imune mimetizando a resposta inflamatória de fase aguda sem, no entanto, promover a infecção ao organismo hospedeiro. O LPS liga-se a receptores do tipo TLR-4 culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias, além de promover a ativação do eixo HPA. Ademais, o LPS induz a modificações comportamentais tais como a redução da capacidade exploratória e locomotora, queda na sociabilidade, quadros semelhante à anedonia, caracterizando um quadro denominado de comportamento doentio.

No entanto, devido à hiporresponsividade do eixo HPA durante a gestação e frente à variações na concentração de glicocorticoides ao longo da prenhez, especula-se que a resposta de ratas prenhas frente ao desafio imunológico com LPS quanto à parâmetros comportamentais, termorregulatórios e hormonais possa ser diferencial conforme o período da gestação.

Estudos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa evidenciaram o comportamento doentio induzido por LPS em camundongos prenhas no 10º dia de gestação (ZAVAN, 2011; FONSECA, 2015), sendo que o uso de fármacos inibidores da síntese de glicocorticoides como a metirapona e a mifepristone não são capazes de prevenir o comportamento doentio por LPS durante a gestação (FONSECA, 2015).

Portanto, estudos que visem elucidar o mecanismo de alterações fisiopatológicas diante da exposição à agentes infecciosos e conhecer variações quanto à resposividade ao desafio

imunológico são cruciais a fim de aprimorar o diagnóstico precoce e tragam, à luz da ciência, tratamentos eficazes para o prognóstico materno e fetal em casos de resposta inflamatória (CASTRO et al, 2008; ZAVAN, 2011). É vital contribuir, por meio da ciência, para o entendimento da resposta inflamatória sistêmica durante a gestação e compreender as respostas diferenciadas diante da exposição à agentes infecciosos, uma vez que há modificações quanto ao eixo HPA e responsividade ao estresse. Sendo assim, é de elevado mérito a avaliação do comportamento durante a gestação como ferramenta de verificação da resposta frente a agentes estressores, bem como avaliar alterações quanto à parâmetros termorregulatórios, imunológicos e hormonais.

Em nosso estudo, utilizamos o rato como modelo experimental à fim de observar as alterações evocadas pelo LPS ao longo da gestação. A escolha pelo rato como modelo experimental se deve ao fato da fácil manipulação dos animais além da facilidade na obtenção de animais prenhes. Ademais, optou-se pelos ratos devido ao vasto conhecimento da literatura científica à respeito das alterações comportamentais, térmicas e hormonais frente ao desafio imunológico com LPS. Porém, nosso modelo difere-se dos demais já estudados uma vez que estudamos as respostas em ratas prenhes, sendo que a gestação é elemento fundamental na responsividade frente à endotoxina.

1.1 PRENHEZ DE RATOS

Uma mudança importante que ocorre durante a gestação é quanto à responsividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) materno que encontra-se profundamente reduzido durante a prenhez (PLANT; ZELEZNIK, 2015).

Os primeiros estudos à respeito da atenuação do eixo HPA durante a gestação foram relatados no início dos anos 1990 (DA COSTA et al, 1996; NEUMANN et al, 1998). Tais estudos consideravam benéfica esta atenuação do eixo, no sentido de conservar energia bem como também proteger o feto contra a programação adversa devido à exposição aos glicocorticoides (PLANT; ZELEZNIK, 2015). O mecanismo exato pelo qual há a atenuação do eixo HPA durante a gestação ainda não está plenamente elucidado pela ciência mas possivelmente envolve a ativação de um mecanismo inibitório do peptídeo opióide endógeno (EOP) que recentemente demonstrou ser

ativado pela allopregnenolona, um metabólito neuroesteroidal da progesterona, formado no cérebro e encontrada em altas concentrações nos períodos finais da gestação (BRUNTON et al, 2009; CORPECHOT et al, 1993).

O eixo HPA desempenha um papel crucial no restabelecimento da homeostase após um estímulo estressor. O conceito de estresse foi introduzido na ciência a partir de estudos pioneiros conduzidos por Hans Selye no ano de 1936 e foi definido como sendo uma síndrome de adaptação geral resultado da soma de todas as reações sistêmicas não específicas do corpo que se seguem à longa e contínua exposição ao estresse. Frente à agentes estressores, podendo estes ser de natureza física ou emocional, neurônios localizados na divisão parvocelular medial do PVN (núcleo paraventricular do hipotálamo) que sintetizam CRH (hormônio liberador de corticotrofina) e em alguns casos co-expressam também arginina vasopressina (AVP) são ativados e secretam CRH e/ou AVP a partir dos terminais nervosos na eminência mediana para o sistema sanguíneo porta hipofisário entre hipotálamo e hipófise. CRH e AVP agem sinergicamente em seus respectivos receptores (CRH-R1 e V1-b) na pituitária anterior a fim de estimular a secreção de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), o qual, por sua vez, desencadeia a síntese e produção dos glicocorticoides, podendo ser o cortisol ou a corticosterona, de acordo com a espécie animal, a partir da adrenal (PLANT; ZELEZNIK, 2015).

Em resposta à um estímulo estressor, os glicocorticoides atuam promovendo mobilização da energia (MUNCK; KORITZ, 1962), atuando nas respostas cardiovasculares (ZHU; XUE; LI, 1995), imunológicas (BESEDOVSKY; DEL REY, 1992), comportamentais (BRAIN, 1972), além de exercerem o feedback negativo na via de produção dos glicocorticoides, promovendo a regulação da produção através da ligação aos receptores de glicocorticoides (GR; Nr3c1) e receptores de mineralocorticoides (MR; Nr3c2) podendo ser no cérebro ou na pituitária anterior (DALLMAN et al, 1992; PLANT; ZELEZNIK, 2015).

No entanto, existem mecanismos que podem proteger o feto diante de um aumento excessivo na concentração de glicocorticoides, uma vez que estes podem interferir no desenvolvimento fetal, ocasionando em alterações neuroendócrinas (EDWARDS et al, 1993). A placenta expressa a enzima 11- β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (11- β HSD-2), uma enzima que converte corticosterona em 11-desidrocorticosterona, uma molécula inerte e menos prejudicial que a corticosterona. A enzima 11- β HSD-2 atua como barreira a fim de limitar a exposição do feto aos glicocorticoides maternos (WELBERG; SECKL; HOLMES, 2000; WELBERG; SECKL,

2001). Durante a gestação de roedores a enzima 11β HSD2 encontra-se altamente ativa (WELBERG; SECKL; HOLMES, 2000). A 11β HSD2 está expressa em grandes quantidades na placenta e em tecidos do feto (BROWN et al, 1996). Sabe-se que a enzima 11β HSD é encontrada nas células do sinciotrofoblasto (LINDSAY; NIEMAN, 2005). Além do mais, estudos tanto em roedores quanto em humanos demonstram que a eficiência da enzima placentária 11β HSD-2 varia consideravelmente e pode ser diminuída por variações na dieta, infecções, inflamações, hipóxia e estresse, permitindo, desse modo, que maior quantidade de cortisol atravessasse pela placenta, afetando o desenvolvimento do feto (SECKL, 2004; COTTRELL; SECKL, 2009; PLANT; ZELEZNIK, 2015).

Com o intuito ainda de proteger o feto contra as altas concentrações de glicocorticoides, há a redução do eixo HPA materno, amenizando o impacto do estresse, reduzindo a probabilidade do feto sofrer programações prejudiciais (EDWARDS et al, 1993 BARKER, 2002; WELBERG; SECKL, 2001). A redução do eixo HPA é tida como a primeira linha de defesa a fim de limitar a exposição do feto aos glicocorticoides (PLANT; ZELEZNIK, 2015).

No entanto, embora haja a hiporresponsividade do eixo HPA ao longo da gestação, há um aumento na concentração de glicocorticoides em períodos finais da gestação, observados através da Figura 1 (LINDSAY; NIEMAN, 2005), modificação a nível neuro-endócrino materno visando a proteção do feto e assegurando o parto (FONSECA, 2005).

Como ilustrado na Figura 1, na fase inicial da gestação de ratos, a variação circadiana do ACTH e da corticosterona é suprimida e, além disso, os níveis diários médios da variação circadiana são reduzidos (ATKINSON; WADDELL, 1995). Os níveis de cortisol salivar também são, em geral, reduzidos em mulheres durante o início da gestação, quando se comparados com o período final da gestação (OBEL et al, 1995; HARVILLE et al, 2007). A redução na secreção de glicocorticoides no início da gestação tem sido sugerida como sendo benéfica pois facilita a implantação do blastocisto, uma vez que altas concentrações de cortisol salivar em mulheres com 1 a 3 semanas após a concepção foram associados com ocorrência de abortos espontâneos (NEPOMNASCHY et al, 2006).

A partir da segunda metade da gestação, os níveis basais circulantes de corticosterona aumentam progressivamente (como verificado na Figura 1), embora a secreção de ACTH seja ainda fortemente suprimida (ATKINSON; WADDELL, 1995). Isso se deve ao aumento da sensibilidade da glândula adrenal à ACTH como consequência da ação do estrógeno sobre a

camada cortical da adrenal (CARR et al, 1981; FIGUEIREDO et al, 2007; LINDSAY; NIEMAN, 2005). De forma similar, os níveis de cortisol aumentam de forma progressiva na gestação de mulheres, como relatado por BUSS e demais colaboradores (2009). Conforme a gravidez progride, as respostas fisiológicas normais à agentes estressores e também o nível do cortisol ao despertar, um marcador da atividade basal da HPA, são atenuados (LINDSAY; NIEMAN, 2005).

Por volta do 17º dia de gestação, o eixo HPA fetal já é capaz de responder às alterações dos hormônios maternos com liberação de CRF, ACTH, corticosterona e β endorfinas (OHKAWA et al, 1991). Essa corticosterona produzida pelo feto consegue atravessar a barreira placentária. Desse modo, além da concentração de glicocorticoides maternos, que já estão em níveis circulantes mais elevados durante essa fase gestacional se comparados à primeira metade da gestação, há a presença de corticosterona de origem fetal, além de β -endorfinas presentes na circulação da mãe, fazendo com que os níveis de hormônios glicocorticoides estejam elevados (CHURCHILL et al, 1981; MILKOVIC et al, 1973; SANDMAN; KASTIN, 1981; ZARROW; PHILPOTT; DENENBERG, 1970; FONECA, 2005). Tais evidências podem ser observadas graficamente por meio da Figura 1.

No cérebro, a expressão de RNAm de Crh e Avp no PVN e de RNAm de GR (Nr3c1) e MR (Nr3c2) no PVN e no hipocampo permanecem inalterados durante as fases iniciais de gestação (JOHNSTONE et al, 2000). Mais ainda, o conteúdo de ACTH na hipófise anterior e a expressão de RNAm para seu precursor (POMC) também permanecem inalterados durante a primeira metade da gestação. Todavia, no final da gravidez, a expressão basal de RNAm de Crh e Avp no PVN é reduzida com concomitante redução do conteúdo de CRH na eminência mediana e também redução de RNAm para POMC e receptor do tipo 1 para CRH (CRH-R1; crhr1) na hipófise anterior (JOHNSTONE et al, 2000). Essas adaptações retratam, portanto, a redução acentuada do eixo HPA no final da gestação (PLANT; ZELEZNIK, 2015).

Sabe-se que na primeira metade da gestação de roedores, as respostas de ACTH e de corticosterona frente a agente estressores permanecem semelhantes às respostas encontradas em fêmeas não-prenhes (NEUMANN et al, 1998; PARKER; MENZIES; DOUGLAS, 2011; NAKAMURA et al, 1997) mesmo que a liberação de CRH já possa estar reduzida (NEUMANN et al, 1998). No entanto, a responsividade do eixo HPA é profundamente reduzida no final da gestação (PLANT; ZELEZNIK, 2015). Em roedores, isso é observado quando expostos a agentes estressores psicológicos, como, por exemplo, na exposição a um ambiente novo relacionando a

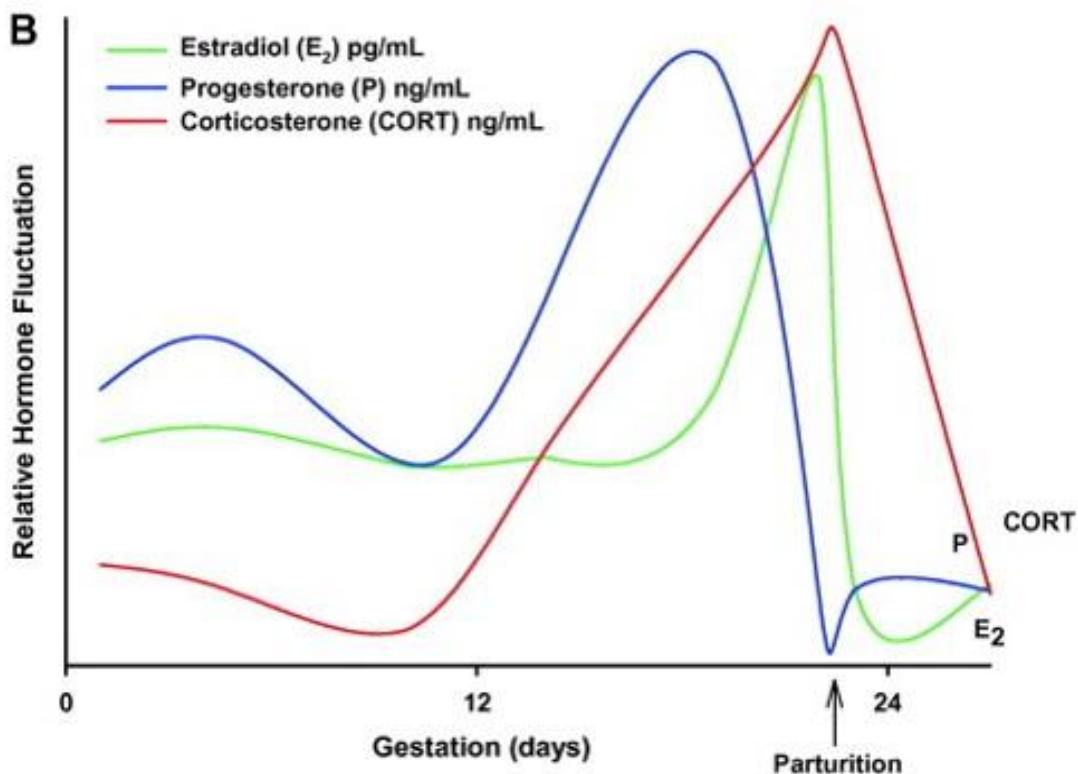
questões de ansiedade (NEUMANN et al, 1998; DOUGLAS et al, 2003) ou ainda em situações de estresse por contenção (DA COSTA et al, 1996). Além do mais, é demonstrado que há hiporresponsividade no final da gestação em roedores diante de estressores físicos ou químicos, como o uso de endotoxinas (BRUNTON et al, 2005) ou administração de citocinas (BRUNTON et al, 2005). Também há a demonstração da hiporresponsividade do eixo HPA ao estresse em situações como o nado forçado (NEUMANN et al, 1998; DOUGLAS et al, 2003; MA et al, 2005).

Porém, nos casos em que há a demonstração da redução da responsividade do eixo HPA frente à agentes estressores, há, concomitantemente, redução nos níveis de ACTH e na secreção de corticosterona (NEUMANN et al, 1998; DOUGLAS et al, 2003; DA COSTA et al, 1996; BRUNTON et al, 2005), sendo associado com redução ou até mesmo ausência na expressão de RNAm de Crh e/ou Avp (BRUNTON et al, 2005; DA COSTA et al, 2001). Tal evidência aponta para uma redução central do direcionamento do eixo HPA por neurônios CRH/vasopressina no final da gestação (PLANT; ZELEZNIK, 2015). Essa responsividade alterada nos períodos tardios da gestação envolve adaptações na pituitária anterior, no hipotálamo e também em centros cerebrais superiores, sendo que os mecanismos que envolvem a queda da resposta do eixo HPA na lactação envolve mecanismos diferentes daquela da gestação (BRUNTON; RUSSELL; DOUGLAS, 2008).

Tendo conhecimento da redução da atividade do eixo HPA no final da gestação, é importante relacionar tal redução com a resposta diante a agentes estressores ao longo da gestação.

Uma conhecida maneira de ativar o eixo HPA e observar alterações em nível neuroendócrino e também comportamental é através da mimetização da resposta inflamatória de fase aguda por meio do uso do Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, o LPS.

Figura 1. Flutuações hormonais ao longo da gestação de ratos



Fonte: PAWLUSKI et al, 2009. Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging.

Nota: Níveis relativos de hormônios como progesterona, representada em azul (ng/mL), corticosterona, representada em vermelho (ng/mL) e estadiol (pg/mL) representada em verde, ao longo da gravidez e no parto, em ratos.

1.2 RESPOSTAS AO DESAFIO IMUNOLÓGICO COM LPS

Experimentalmente, um quadro de inflamação generalizada pode ser provocado em animais através da exposição à produtos da parede celular de bactérias gram-negativas como o Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS). Através de tal exposição há a mimetização da resposta inflamatória de fase aguda, ativação do sistema imunológico, sem, no entanto, causar infecção ao hospedeiro (BURRELL, 1994; BELOOSESKY et al, 2010; SMITH et al, 2007).

O LPS é um lipídio complexo, formado por um componente denominado de lipídio A ligado a um polissacarídeo. O polissacarídeo é formado por um único núcleo ligado a uma série terminal de unidades repetidas. O lipídio A consiste em unidades dissacarídicas de glicosamina fosforilada, onde estas unidades estão ligadas a diversos ácidos graxos de cadeia longa, podendo apresentar variações de acordo com a espécie bacteriana. Já o núcleo do polissacarídeo, por sua vez, é constituído de maneira semelhante entre todas as espécies gram-negativas que possuem LPS. No entanto, cada espécie possui uma unidade de repetição em particular. De forma geral, os elementos de repetição consistem em trissacarídeos lineares ou ainda tetra ou pentassacarídeos ramificados (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000; KIRSTEN, 2010).

O LPS é sintetizado na membrana plasmática e transportado para a posição exterior final da membrana. Posteriormente, o LPS é ligado à superfície celular sendo liberado apenas quando as células bacterianas são lisadas. O LPS então é clivado em lipídio A e polissacarídeo, sendo que a porção do lipídeo A será reconhecida pelo sistema imune e haverá interação imunológica. A especificidade antigênica é conferida pelas unidades terminais de repetição, as quais, por sua vez, circundam a célula e foram uma camada de polissacarídeos hidrofílicos (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000; KIRSTEN, 2008; 2010; ADEREM; ULEVITCH, 2000).

O LPS, definido como sendo uma endotoxina (uma vez que é tóxico para os animais e deve estar ligado a uma superfície celular para promover seus efeitos), pode atuar diretamente em macrófagos, monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas e também em células endoteliais. (SALUK- JUSZCZAK; WACHOWICZ, 2005; KIRSTEN, 2010).

O LPS, inicialmente no plasma, liga-se a uma proteína de fase aguda do hospedeiro denominada de LBP (*lipopolysaccharide binding protein*) a fim de ser transportado na corrente sanguínea. A LBP é produzida no fígado animal e após a sua ligação ao LPS forma-se o complexo LPS:LBP. Posteriormente, tal como ilustrado pela Figura 2, o complexo recém formado transfere o LPS para a proteína de membrana periférica CD14, um receptor, presente na superfície de macrófagos, iniciando, assim, o processo de ativação celular e reconhecimento por parte do sistema imunológico (FENTON; GOLENBOCK, 1998; ADEREM; ULEVITCH, 2000; MIYAKE, 2003).

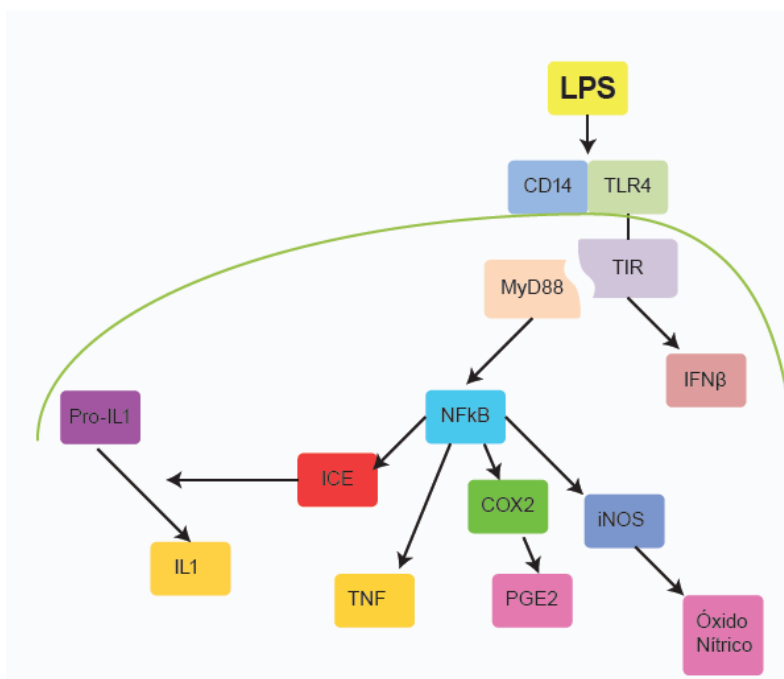
O complexo formado, chamado de LPS:CD14, ativa a sinalização do receptor semelhante ao Toll (TLR-4) que é complexada com a proteína MD-2. Nesse instante, inicia-se a geração do sinal transmembranar em direção ao núcleo, processo esse de natureza intracelular. No interior do

macrófago há uma série de reações que ocorrem em cascata, destacando-se a atuação de MyD 88, IRAK, AP-1 e outras, culminando na ativação do fator de transcrição NF- κ B, fator este que ativa os genes que transcrevem as proteínas envolvidas no processo de defesa do organismo frente à infecção, culminando na geração de citocinas pró-inflamatórias, processo ilustrado na Figura 2 (ADEREM; ULEVITCH, 2000; HARJU et al, 2005; ROMERO R. et al, 2007; KIRSTEN, 2010).

Entre as citocinas resultantes produzidas por meio desse processo descrito acima, destaca-se o papel relevante do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), da interleucina-1 beta (IL-1 β) e a interleucina 6 (IL-6), entre outras (HAVA et al, 2006).

As citocinas são capazes de regular processos importantes, sobretudo relacionados às questões imunes, como inflamação, febre, proliferação e diferenciação celular, síntese de proteínas de fase aguda, quimiotaxia, fibrose, ações antivirais e moléculas de adesão (ROTHWELL; HOPKINS, 1995). Porém, devido às suas características estruturais, uma vez que apresentam baixo peso molecular e são grandes em tamanho, são impedidas de atravessar a barreira hematoencefálica, contudo podem atuar no sistema nervoso central (SNC) de diferentes maneiras (DUNN, 2007; SALUK-JUSZCAK; WACHOWICZ, 2005; TOYAMA, 2012; ASHDOWN et al, 2006; DUNN, 2006).

Figura 2. Mecanismo de ação intracelular do LPS em células imunológicas



Fonte: Modificado de DellaGioia; Hannestad, 2011

As citocinas podem atuar por meio do nervo vago, modulando ações no SNC. O nervo vago é tido como a principal via aferente de comunicação para o cérebro. Por meio dele, as citocinas entram em contato a partir das terminações de ramificações vagais periféricas, presentes em todos os órgãos do peritônio (KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002), as quais, por sua vez, apresentam receptores para citocinas. Através da ativação destes receptores, desencadeia uma transmissão de impulso nervoso até sua ligação no núcleo vagal presente no encéfalo. Esta referida via de comunicação das citocinas com o SNC está ilustrada na Figura 3.

Nesse sentido, interleucina 1 (IL-1) secretado por macrófagos ativados por LPS é capaz de estimular as fibras vagais, as quais, por sua vez, levarão as informações para o SNC (DELLAGIOIA; HANNESTAD, 2010; GOEHLER et al, 1999). Quando, por sua vez, realizou-se, experimentalmente a secção do nervo vago, foi constatado que não houve a ativação de áreas como o hipotálamo, o tronco cerebral e áreas do sistema límbico, não sendo observadas também alterações comportamentais típicas do comportamento doente após a aplicação de LPS ou IL-1, demonstrando que a comunicação via nervo vago é importante para a ativação cerebral e modulação das respostas comportamentais (DANTZER et al, 1998).

Outra forma das citocinas alcançarem o SNC se dá através de áreas onde a barreira hematoencefálica é mais frágil e porosa, como o plexo coroide e os órgãos circumventriculares, estimulando, *à posteriori*, macrófagos destas áreas a produzirem maiores concentrações de citocinas, como IL-1 que exerceria seus efeitos em receptores específicos em diversas áreas do cérebro, como, por exemplo, o núcleo do trato solitário, o hipocampo e a amígdala (BASSO et al, 2003; KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002). Esta via de comunicação também está ilustrada através da Figura 3. Estudos comprovando elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias após infecção nos órgãos circumventriculares, como a área postrema, a eminência mediana e o órgão vasculoso da lâmina terminal, quando comparados à outras regiões do cérebro (DUNN, 2006), demonstram a importância desta via.

Outro modo de mediação das citocinas no SNC se dá por meio do contato das citocinas com as células endoteliais. Tanto o LPS quanto as citocinas, através do contato com os receptores das células endoteliais do organismo infectado, estimulam a ativação da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), que medeia a produção de prostaglandinas (PGE2) e outros eicosanoides, além de influenciar na produção da prostaglandina microsomal sintetase 1 (mPGES1). A PGE2, por exemplo, exerce seus efeitos por meio de receptores (EP4) presentes em neurônios da área pré-

optica medial além de atuar também em receptores no núcleo paraventricular do hipotálamo (ENGBLOM et al, 2003; KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002; USHIKUBI et al, 1998), tal como pode ser observado por meio da Figura 3. Os eicosanoides são mediadores inflamatórios de origem lipídica tais como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, e conseguem atravessar a barreira hematoencefálica, atuando em áreas específicas do cérebro, modulando respostas comportamentais. Como repercussão, há ativação dos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico, gerando alterações comportamentais (CUSCHIERI et al, 2006; ENGBLOM et al, 2002 e 2003, KIRSTEN, 2008; SONCINI et al, 2012; USHIKUBI et al, 1998; ZAVAN, 2011). Trabalhos utilizando ferramentas farmacológicas como, por exemplo, inibidores de eicosanoides e inibidores da COX-2, observaram supressão do comportamento doentio (CALDER, 2004; SALUK-JUSZCZAK; WACHOWICZ, 2005; DUNN, 2006; ROCHE et al, 2006; XU et al, 2006).

Há outras formas ainda pelas quais as citocinas podem modular ações nas regiões centrais, como por exemplo, cruzando a barreira hematoencefálica por meio de sistema de capturas específicos, processo este também ilustrado através da Figura 3. No entanto, a capacidade de transporte desses sistemas é relativamente baixa e pouco eficiente (DUNN, 2006).

Não obstante, merece destaque também a capacidade do LPS induzir a produção da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual, por sua vez, contribui para a produção do óxido nítrico (NO), potente vasodilatador com reconhecidas funções anti-inflamatórias. O NO apresenta a capacidade de atuar também no SNC modulando ações (ROCHE et al, 2006; MURATORE et al, 2009; KIRSTEN, 2010).

Os mecanismos citados acima não atuam de modo individualizado, mas atuam sim de modo simultâneo e integrado, a partir da liberação das citocinas, por meio de mecanismos intracelulares (DUNN, 2006).

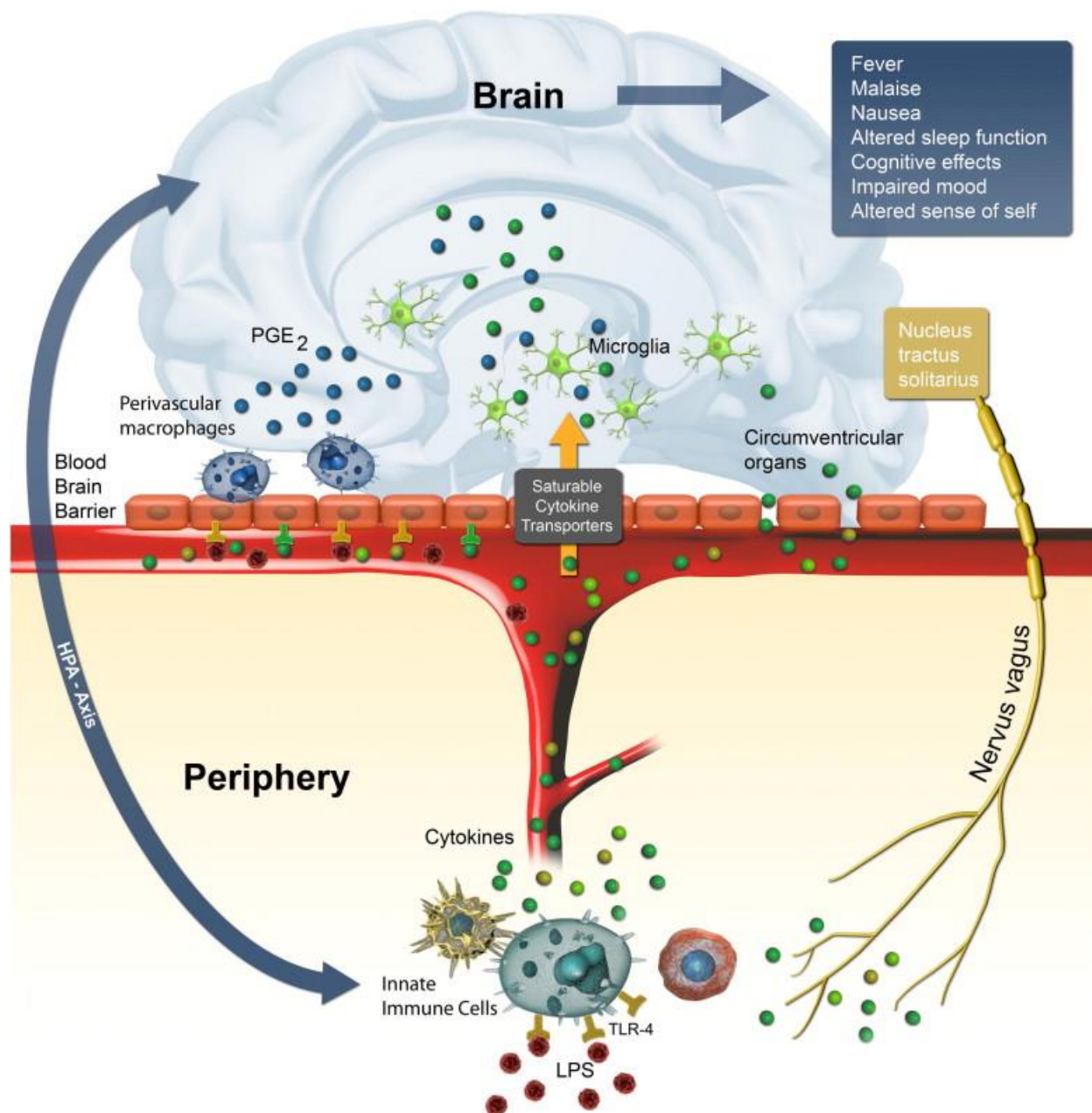
Porém, não basta que as citocinas alcancem as regiões cefálicas. Para que possam exercer papel atuante é necessário que haja a interação com os receptores e geração das respostas por meio de mecanismos adequados. Nesse ponto, estudos descritos na literatura científica comprovam a existência de receptores de citocinas em diversas regiões do cérebro, incluindo receptores específicos para IL-1 β , TNF- α e também IL-6, sendo que tais receptores estão expressos tanto nas células da glia quanto também em neurônios (DUNN, 2006; AVITSUR; YIRMIYA, 1999).

As citocinas, em contato com a micróglia, desencadeiam a produção de novas citocinas no cérebro, causando uma potencialização de seu efeito. É plausível, portanto, afirmar, que a

microglia atua de modo análogo aos macrófagos, sendo considerado como um “órgão imune” do cérebro, combatendo infecções e a própria inflamação (LENT, 2001; MEYER et al, 2005; HAVA et al, 2006; XU et al, 2006; KIRSTEN, 2010).

Desse modo, a administração de LPS é capaz de produzir citocinas e comunicar-se com áreas do SNC e modular respostas centrais, modificando, por exemplo, comportamentos inatos. Sendo assim, o LPS é capaz, por meio desse mecanismo acima elucidado, induzir comportamentos de anorexia, pirexia, anedonia, sonolência, redução da atividade locomotora e exploratória além de provocar um comportamento semelhante à depressão, diminuição da atividade sexual, prejuízo no aprendizado e memória, caracterizando um quadro denominado comportamento doentio, ou *sickness behavior* (KLUGER, 1991; KENT et al., 1996; DANTZER et al., 1998^a, b, DANTZER et al, 2008; DANTZER, 2004; DANTZER, 2001; LEONARD, 2001; ENANGA et al., 2002; ROMANOVSKY, 2004; MATSUMURA; KOBAYASHI, 2004; DINARELLO, 2004; KINOSHITA, 2007; HART, 1988; DANTZER et al, 2001; KENT; KELLEY; DANTZER, 1992; DANTZER, 2001).

Figura 3. Mecanismo de ação do LPS e formas de comunicação com o Sistema Nervoso Central



Fonte: Schedlowski; Engler; Grigoleit, 2014. Endotoxin-induced experimental systemic inflammation in humans: A model to disentangle immune-to-brain communication.

Nota: Vias de comunicação aferente a partir da periferia para o cérebro. Sinais oriundos do sistema imunológico periférico podem atingir o cérebro através de vias humorais e neurais. A figura demonstra ainda as alterações nas funções cerebrais ocasionadas pela ação das citocinas em áreas específicas do SNC, causando alterações tais como febre, mal-estar, náusea, alterações na funções de sono, efeitos cognitivos, prejuízo no humor e alterações na sensações de sentido.

Além das alterações comportamentais, outro quadro característico do processo infeccioso provocado através da administração do LPS é o aumento fisiológico do *setpoint* termorregulatório, quadro característico de febre (HART, 1988; COHN, 2003; DINARELLO, 1984). Existem diversas teorias de como a febre ocorre a partir de sinais de infecção/inflamação na periferia, entre os quais estão o trabalho de revisão de BLATTEIS (2006) afirmando que a febre é produzida a partir da ativação da cascata do sistema complemento, culminando na produção da proteína ativa C5a, além da proteína amilóide sérica A, ceruloplasmina, haptoglobulina, antiproteinase e fibrinogênio, atuando, nas células de Kupfer no fígado, causando liberação de prostaglandina E2 (PGE2). Esta se liga a receptores aferentes vagais enviando estímulos para o núcleo do trato solitário (NTS) e posteriormente para a área pré-óptica anterior (POA). Na POA há a liberação de noradrenalina que se liga a receptores α -1 e α -2 adrenérgicos. Num primeiro momento, neurônios sensíveis a calor são inibidos, caracterizando, dessa forma, as respostas iniciais da febre. No entanto, posteriormente, ocorre produção de PGE2 dependente da enzima ciclooxigenase-2 que também irá inibir esses neurônios, sendo esta fase denominada de fase tardia da febre. Além do mais, citocinas classificadas como pirógenas, como interleucina 1 (IL-1) juntamente com a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF) parecem contribuir para a resposta tardia da febre, uma vez que o uso de antagonistas destes compostos não produziu efeito significativo nos primeiros 30 minutos da febre (KINOSHITA, 2007).

Os sistemas efetores, os quais são responsáveis pelo aumento da temperatura corpórea, como a musculatura estriada esquelética, atuam de modo a aumentar a produção do calor, promovendo tremores musculares. Ademais, o sistema cardiovascular, responsável pela vasoconstrição cutânea, também atua diminuindo a perda de calor (BLAITTES, 2006; KINOSHITA, 2007). A contração muscular é realizada através da sinalização da POA para a medula espinhal, atingindo os cornos ventrais e também os neurônios motores da musculatura esquelética. A partir da POA também há projeções para a área tegmental ventral seguida para neurônios pré-motores localizados na medula. Estes atingem os neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo simpático, e então, os pós-ganglionares, que realizam, por sua vez, a vasoconstrição (BLATTEIS, 2006; KINOSHITA, 2007).

A regulação da temperatura corporal não é determinada apenas por uma única região mas por um conjunto de estruturas que incluem regiões do hipotálamo, sistema límbico, tronco cerebral, formação reticular, medula espinhal e gânglios simpáticos (BLATTEIS, 1998). Embora

todas estas regiões apresentem importância no controle da temperatura, destaca-se a POA como sendo uma das estruturas mais importantes por ser um sítio termossensível que recebe aferências dos termorreceptores periféricos e da medula espinhal (MORRISON et al, 2008; ROMANOVSKY, 2007).

O *setpoint* da temperatura corporal pode ser considerado como um termostato dinâmico, uma vez que gera respostas compensatórias diante de variações da temperatura (KANOSUE et al, 1997). É preciso caracterizar que a febre é uma elevação regulada da temperatura corporal e não uma incapacidade dos mecanismos que regulam a temperatura corporal de atuar e exercer o controle de temperatura, dissipando o ganho de calor. A febre não depende da temperatura do ambiente, se desenvolvendo em qualquer temperatura (CABANAC; MASSONNET, 1980; IUPS, 2001; ORLANDI, 2016).

A febre é considerada como sendo um aumento controlado da temperatura em resposta a um agente invasor e apresenta função protetora e adaptativa, objetivando atingir temperaturas consideradas como desfavoráveis para o crescimento de microorganismos patogênicos. No entanto, altas temperaturas por um período de tempo prolongado pode ser prejudicial ao organismo e até mesmo leva-lo à óbito (HARDEN et al., 2015). No âmbito imunológico, a febre é benéfica uma vez que aumenta a mobilidade e migração de neutrófilos e também de monócitos, aumenta a fagocitose, produção de linfócitos T auxiliares, dentre outros (BLATTEIS, 2006; ROSENSPIRE et al, 2002).

As citocinas produzidas pelas células imunológicas, em decorrência à administração do LPS, estimulam a síntese de PGE que atuam diretamente sobre a POA, que é rica em receptores para este mediador. Desse modo, há elevação do *setpoint* termorregulatório, elevando também a temperatura corporal (ENGSTRÖM et al, 2012; LAZARUS et al, 2007).

Trabalhos utilizando-se da administração de diversas citocinas demonstram problemas gestacionais similares aos que ocorrem devido à administração de LPS na gestação (ROMERO et al, 2007). Porém, nesse ponto, é necessário afirmar que alguns trabalhos divergem entre si nos resultados apresentados. Para alguns autores, as citocinas podem atravessar a barreira placentária. No entanto, experimentos realizados em cultura demonstram que apenas uma pequena quantidade de citocina parece ser capaz de atravessar a barreira placentária, percorrendo âmnio, córion e decíduas (URAKUBO et al, 2001; LEVITON; DAMMANN; DURUM, 2005; MEYER et al, 2005; KIRSTEN, 2010).

1.3 O LPS DURANTE A GESTAÇÃO

O LPS administrado durante a gestação provoca reabsorção embrionária, abortos, morte fetal intrauterina e partos prematuros, embora o exato mecanismo não esteja plenamente elucidado ainda pela ciência, podendo apresentar efeitos tóxicos indiretos. Porém, todas alterações supracitadas, que ocorrem durante o período gestacional, são resultantes do aumento da produção e liberação das citocinas pró-inflamatórias (XU et al, 2006; ZHAO et al, 2008).

Em se tratando do processo gestacional *per se* é sabido que a administração do LPS provoca morte fetal dependente da dosagem do composto, tal como relatado por Toyama (2012), utilizando como modelo experimental camundongos Swiss no 18º dia de gestação. Segundo o trabalho de Toyama, em 2012, os animais prenhes submetidos ao tratamento com LPS na dose de 300µg/Kg apresentaram 100 % de aborto. Já as fêmeas que receberam a dosagem de 150µg/Kg de LPS apresentaram 55% de aborto espontâneo. As citocinas pró-inflamatórias produzidas como resultado da administração do LPS alcançam o líquido amniótico e prejudicam o correto desenvolvimento da gestação. Nesse sentido, o trabalho realizado por Oksvig e demais colaboradores (2012) demonstraram que ratos Sprague-Dawley expostos a baixas doses de LPS no 15º dia de gestação apresentaram aumento na concentração de citocinas tanto no plasma materno quanto também no líquido amniótico após 4 horas à administração do LPS. A endotoxina bacteriana é capaz de induzir não somente aborto espontâneo, mas também reabsorções embrionárias e morte embrionária uterina (AVITSUR; COHEN; YIRMIYA, 1997; KIRSTEN, 2008; XU et al, 2006; ZHAO et al, 2008). Porém, apesar de provocar a significativa redução no número da prole, não há alterações tanto no peso total quanto no peso individual da prole, além de não serem diagnosticadas também danos no desenvolvimento físico e nos reflexos da prole cujas mães receberam LPS (KIRSTEN et al, 2010; ROJAS, 2019).

A ligação do LPS a partir dos receptores denominados de *toll-like receptors* é primordial para a geração da falha gestacional já observada anteriormente em modelos murinos (CLARK et al, 2004). A endotoxina, tal como dito anteriormente, é capaz de provocar a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1, IL-6 e o TNF (CHUA; ROFE; COYLE, 2006). Determinadas citocinas ajudam no estabelecimento do sucesso da gestação, como por exemplo, IL-4, IL-6 e IL-10. Outras, no entanto, são danosas para o embrião/feto podendo causar falhas

gestacionais (DAHER et al, 2004). Nesse sentido, a perda embrionária é ocasionada devido a mudanças imunológicas que ocorrem no ambiente uterino e também devido a mudanças hormonais na gestação. Estudos prévios afirmam que a aplicação do LPS pode contribuir, de maneira significativa, para o término da gestação em qualquer período em que for aplicado, mas não provoca, no entanto, mudanças no funcionamento do sistema endócrino de ratas prenhas (RIOUX-DARRIEULAT; PARANT; CHEDID, 1978).

A administração do LPS em ratas prenhas tem sido amplamente usada para estudos relacionados com alterações comportamentais tanto na prole juvenil quanto adulta e também com alterações histológicas na prole adulta (MEYER et al, 2006; SHI et al, 2003; OZAWA et al, 2006; KIRSTEN, 2008; KIRSTEN, 2010).

A administração de LPS durante o período gestacional induz a ativação imuno-materna, sendo um modelo já bem estabelecido na literatura científica e viável para estudos relacionados com indução de quadros semelhantes à depressão, ansiedade, déficits na cognição e memória e desordens neuropsiquiátricas na prole, como esquizofrenia e autismo (LIN; WANG, 2014; ENAYATI et al, 2012; LIN; LIN; WANG, 2012; WISCHHOF et al, 2015 a; b; KIRSTEN, 2008; KIRSTEN, 2012; KIRSTEN et al., 2012). Além disso, a exposição ao LPS durante o período pré-natal está relacionando intimamente com alterações fisiológicas à longo prazo na prole dos animais (ASIAEI; SOLATI; SALARI, 2011). Durante a gestação, um período de tempo específico é considerado como sendo período crítico na indução de desordens do neuropsiquiátricas e déficits comportamentais na prole de roedores (MEYER et al, 2006). Nesta janela de tempo, em questão, a exposição ao LPS tem como consequência a produção de citocinas que atravessam a barreira placentária e estas, por sua vez, interrompem os processos de desenvolvimento do cérebro do feto (KIRSTEN et al, 2013), prejudicando de maneira significativa seu desenvolvimento normal.

É sabido que a administração do LPS durante a gestação, além de aumentar os níveis de NO, induz também aumento da peroxidação lipídica (STUSS; WIKTORSKA; SEWERYNEK, 2010; FRANCESCHELLI, 2014; REQUINTINA; OXENKRUG, 2003) e redução dos níveis de glutathiona tanto na placenta quanto no fígado materno e fetal (XU et al., 2006). Além disso, há a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) após a administração do LPS na gestação, sendo este processo independente da produção de citocinas (ARSENAULT et at, 2014).

Estudos demonstram ainda que o LPS durante o período gestacional induz um quadro de neurotoxicidade através da ativação da micróglia (AL-AMIN et al, 2016). A indução do LPS no

útero também causa a ativação da micróglia que resulta em aumento nos níveis de NO, ROS e de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (LING et al, 2002). A partir da ativação da micróglia e dos astrócitos, há a indução da iNOS, resultando na produção de ROS. O NO, por sua vez, pode prejudicar os oligodendrócitos e a mielina, interferindo, desse modo, na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e transloca o fator indutor de apoptose (KIM et al, 2010). Portanto, pode-se afirmar que o estresse oxidativo gerado a partir da administração do LPS durante a gestação desempenha um papel crucial na geração de danos aos axônios neuronais por meio da interrupção da cadeia mitocondrial. Como resultado, a produção de energia será significativamente reduzida, havendo, concomitantemente, oxidação das proteínas e lipídios, degradação do microtúbulo e o transporte axonal será interrompido (COLEMAN, 2005).

A exposição pré-natal ao LPS pode levar ainda à danos no cérebro devido a produção de radicais livres considerados como sendo tóxicos, tal como espécies de OH, presentes no fígado (CAMBONIE et al, 2004). Os radicais livres, por sua vez, reagem com o DNA, proteínas e lipídios, interrompendo a função celular podendo levar até mesmo à morte da célula.

Estudos demonstram que o LPS é capaz de induzir a ativação da micróglia, promover reação em astrócitos e de induzir processos de apoptose em precursores de oligodendrócitos, os quais, produzem ânion superóxido, NO e contribuem para a neurodegeneração (MAYER, 1998).

Além disso, a indução da endotoxemia através da administração do LPS é capaz de causar morte celular neuronal em regiões como o córtex, o hipocampo e também provocar a depleção de neurônios dopaminérgicos no estriado. (NOLAN et al, 2003; KIM et al, 2002).

Como visto, a administração do LPS desencadeará a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α (DINARELLO, 1991; KENT et al, 1992). As citocinas atuam no cérebro provocando alterações comportamentais típicas do comportamento doente (KENT et al, 1992; ROTHWELL; HOPKINS, 1995; DANTZER, 2001; RAMACHANDRA et al, 1992). As citocinas atuam também no sistema nervoso central de modo a aumentar o metabolismo de serotonina e noradrenalina através da cascata de sinalização de prostaglandinas via enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) (ENGBLOM et al, 2002; 2003). Tais reações promovem ainda o aumento da secreção do CRH, ativando o eixo HPA, aumentando, conseqüentemente, a concentração plasmática do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de glicocorticoides (BESEDOVSKY et al, 1986; DUNN, 1988; TURNBULL; LEE; RIVIER, 1998 HAUGER et al, 2009; OHMURA; YOSHIOKA, 2009).

Porém, durante a gestação, há modificações do eixo podendo ocasionar em respostas comportamentais alteradas gerando um estado de hiporresponsividade perante às situações de estresse, uma vez que o eixo encontra-se significativamente diminuído (HILLERER et al, 2011; SLATTERY; NEUMANN, 2007; BRUNTON; RUSSELL; DOUGLAS, 2008; NEUMANN, 2003). No início da gestação a concentração de glicocorticoides encontra-se reduzida e tais concentrações somente começarão a se elevar por volta do 10º dia de gestação em camundongos (BARLOW; MORRISON; SULLIVAN, 1975), bem como em ratos (ATKINSON; WADDELL, 1995). Dessa forma, é possível que roedores em período gestacional possam apresentar comportamentos diferenciados diante da administração de endotoxinas devido estas mudanças hormonais, fazendo que com a resposta diante da aplicação do LPS seja menor em períodos mais tardios da gravidez. Especula-se ainda que modificações além da resposta comportamental possam ser diferenciais devido à hiporresponsividade do eixo HPA, modificações estas em parâmetros tais como termorregulatórios e hormonais.

Estudos prévios realizados em nosso grupo de pesquisa já comprovaram o comportamento doentio em camundongos prenhes em seu 10º dia de gestação mediante ao tratamento com lipopolissacarídeos de *E. coli* (ZAVAN, 2011; FONSECA, 2015). Os trabalhos revelam ainda que o uso de fármacos anti-glicocorticoides como a metirapona e a mifepristone não são capazes de prevenir o comportamento doentio gerado através da aplicação do LPS quando aplicados no 10º dia de gestação (FONSECA, 2015).

2 JUSTIFICATIVA

Diante da importância do processo gestacional *per se* além da comprovada alteração dos níveis de glicocorticoides ao longo da gestação é fundamental importância estudar a interferência da modificação do eixo HPA ao longo da gestação em quadros de endotoxemia. Assim, devido ao fato de durante a gestação tanto de mulheres quanto de roedores à hiporresponsividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal perante às situações de estresse, e ausência de dados na literatura a respeito do motivo pelo qual existem tais alterações, particularmente no término do período gestacional, propomos avaliar a responsividade ao estresse, tanto quanto à respostas autonômicas, termoregulatórias, hormonais e comportamentais diante de um desafio imunológico resultante da administração sistêmica de LPS.

3 OBJETIVOS

O trabalho foi desenvolvido traçando objetivos gerais e específicos, como observado a seguir.

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito da administração de lipopolissacarídeo de *E. coli* durante o período gestacional de ratas quanto a responsividade ao desafio imunológico com LPS, envolvendo respostas termoregulatórias, hormonais e comportamentais.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do LPS no comportamento do feto de ratas gestantes, observando para isso comportamento semelhante à anedonia, alterações nos parâmetros exploratórios/locomotores; déficits em interações sociais, além de verificar um possível estado anoréxico dos animais submetidos à endotoxemia;

- Avaliar o efeito da administração de LPS sobre a temperatura corpórea de animais prenhes;

- Avaliar a interferência dos dias de gestação sobre a ativação do eixo HPA em resposta a endotoxemia e sobre a dosagem de citocinas plasmáticas;

- Quantificar o número de neurônios reativos à proteína c-fos em diversas áreas relacionadas à resposta ao estresse no encéfalo de ratas prenhes submetidas ao tratamento com LPS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a execução do trabalho e cumprimento dos objetivos anteriormente estabelecidos, foram utilizados métodos descritos a seguir.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 544 ratas virgens da linhagem Wistar, com idades entre 8 e 12 semanas, mantidas sob regime *ad-libidum* de água e ração comercial. Os animais foram alojados no biotério do Laboratório de Fisiologia Translacional da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Além do número de animais anteriormente citado, foram utilizados também 20 ratos machos pertencentes à linhagem Wistar para realização do acasalamento dos animais. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas-MG e concedidos por meio da aprovação do Comitê de Ética e Uso Animal da UNIFAL-MG (Protocolo 644/2015).

Os animais estiveram sujeitos a regime de claro/escuro de 12 horas, sendo que a temperatura do biotério onde estiveram alojados ficaram sobre estrito controle ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$).

As fêmeas virgens foram colocadas para acasalamento com machos adultos, férteis e pertencentes à mesma linhagem, obedecendo à proporção de 3 fêmeas para cada macho, ao final de cada tarde. Na manhã seguinte ao acasalamento, foi realizada a verificação da existência da presença de espermatozoides no lavado vaginal da fêmea observado através de um microscópio óptico OLYMPUS modelo CX31RBSFA.

Após a verificação da presença de espermatozoides foi considerada esta manhã como sendo o dia de gestação zero (0 ddg) ou zero dia gestacional (0 DG).

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As fêmeas prenhes foram divididas em 2 grupos experimentais (Controle e LPS) que foram testados em diferentes dias gestacionais: 6° DG, 9° DG, 12° DG, 15° DG, 18° DG e 20° DG.

Cumpr-se ressaltar que para a execução de determinados testes a fim de averiguar o comportamento dos animais, foi utilizado, para isso, 2 grupos experimentais adicionais (controle e LPS) de ratas não prenhes, na fase diestro do ciclo estral.

4.3 TRATAMENTO COM LPS

Os animais experimentais, na manhã do dia de gestação nos quais foram especificamente testados, foram pesados usando-se para isso uma balança de precisão (SHIMADZU modelo UX4200H). Após a averiguação do peso do animal gestante, o mesmo recebeu uma única injeção intraperitoneal contendo lipopolissacarídeo de *E. coli* de sorotipo 026:B6 adquirido a partir da *Sigma Aldrich* dissolvido em salina estéril (NaCl 0,9%) na dosagem de 200 µg/kg do animal. Os animais pertencentes ao grupo controle, por sua vez, receberam, de modo similar, uma única injeção na região intraperitoneal contendo salina estéril (NaCl 0,9% na dose de 1 ml/Kg), o qual foi o veículo diluente do LPS. É salutar informar que os tratamentos ocorreram entre o período das 7:00 até as 9:00 horas impreterivelmente.

A escolha da dose de 200 µg/kg foi adotada com base em estudos anteriores conduzidos por nosso grupo de pesquisa, sendo observado alterações comportamentais significativas (CABRAL, 2016; ROJAS, 2019, VIEIRA, 2017, SILVA, 2015) sem prejuízos demasiados no processo gestacional (FONSECA, 2015; ZAVAN, 2011).

4.4 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Após 2 horas da aplicação das injeções, os animais foram submetidos a testes comportamentais a fim de verificar alterações comportamentais mediante à comparação com os animais do grupo controle, medindo-se para isso parâmetros semelhantes à ansiedade, déficits

exploratórios/locomotores e alterações na preferência à sacarose, além de observar alterações quanto à sociabilidade e consumo alimentar.

Os testes de comportamento foram gravados utilizando-se uma câmera de vídeo previamente instalada na sala de comportamento animal destinada exclusivamente à ratos fêmeas do Laboratório de Fisiologia Translacional na UNIFAL-MG. A fim de evitar que parâmetros externos influenciassem nos resultados, os testes comportamentais foram realizados em ambiente próprio, com luminosidade e temperatura adequadas, objetivando que não houvesse geração de estresse e interferências aos animais experimentais. Os pesquisadores que manipularam os animais estavam cientes da correta conduta para não influenciar de modo significativo no comportamento dos animais, uma vez que estes são sensíveis ao manuseio, além de serem pesquisadores treinados e capacitados para o correto manuseio do animal. Estes ambientes estavam isentos de influência de cheiro, atividade sonora e interferência de outros pesquisadores, constituindo em um ambiente próprio para a realização dos testes comportamentais.

4.4.1 Análise da locomoção

A fim de proceder à análise de parâmetros relacionados a locomoção e exploração foi utilizado o teste de campo aberto.

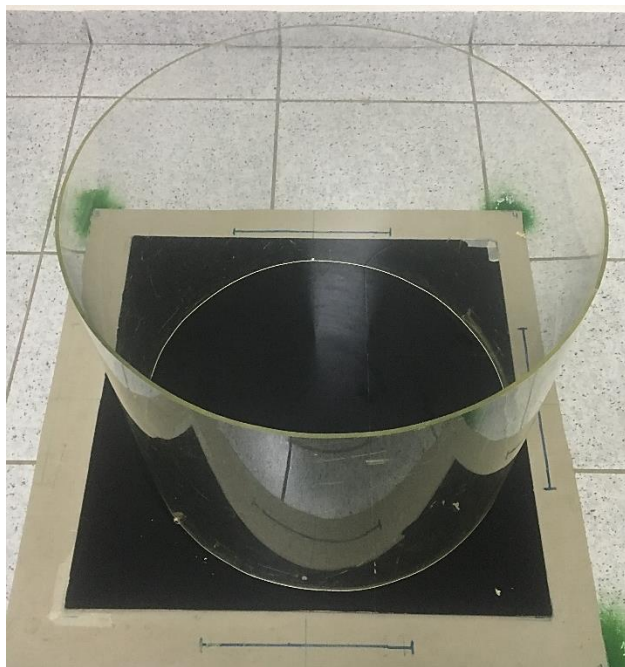
- Teste do campo aberto

O aparato de campo aberto é constituído por um círculo de acrílico de 60 cm de diâmetro, com paredes de 50 cm de altura. O fundo desta arena é marcado por 4 círculos concêntricos, cortados por 2 retas dividindo a arena em 12 quadrantes. O teste foi realizado introduzindo o animal no centro da arena de experimentação, deixando que o mesmo explorasse o campo livremente por um período de 5 minutos, de maneira similar à trabalhos anteriores (VIEIRA, 2017; HALL, 1934; FONSECA, 2015). Durante a realização do teste, não foi permitida a presença do

pesquisador no recinto, precavendo-se a fim de que não houvesse geração de estresse para os animais.

Durante a análise do vídeo, o comportamento do animal foi averiguado, medindo-se o tempo imóvel e também a distância percorrida pelo animal. Para tanto, a análise do vídeo comportamental foi realizada empregando-se o software Ethovision versão 10.0 instalado previamente em um computador equipado com Windows 7 e capaz de executar as análises comportamentais. Entre a exposição de um rato e outro foi necessário a limpeza do chão da arena com álcool na concentração de 5% secando bem e deixando circular um pouco de ar.

Figura 4. Aparato para execução do teste do campo aberto



Fonte: do autor

4.4.2. Análise da ingestão alimentar

A análise do padrão de ingestão alimentar dos animais experimentais foi realizada na própria caixa moradia, de maneira similar à conduzida por Cabral (2016). Na manhã da realização do teste foram conduzidos os tratamentos com aplicação de salina ou LPS. Nesse instante, a comida foi retirada dos animais permitindo um jejum de 2 horas. Obedecido esse tempo, os animais foram imediatamente submetidos ao teste do campo aberto. Logo em seguida, os animais voltaram para suas caixas e a comida foi reapresentada aos mesmos. A ração, em pellets, foi inicialmente pesada. Posteriormente, a ração foi novamente pesada 2, 4, 6 e 24 horas após a reintrodução alimentar. Foi calculada a diferença do peso da ração oferecida no início do teste e o peso do alimento nos horários supracitados, sendo normalizada de acordo com o peso do animal.

Para estudo da variação do peso corporal, o animal foi pesado antes e ao final do tratamento (24 horas após a reintrodução alimentar).

4.4.3 Análise da anedonia

Com a finalidade de investigar a possível anedonia em animais submetidos ao tratamento com LPS em diversos dias da gestação foi realizado o teste de preferência à sacarose.

- Teste de preferência à sacarose

Foi utilizado o teste de preferência à sacarose de maneira semelhante à descrita por Soncini e colaboradores (2012).

Para tanto, os animais foram submetidos a um período de 5 dias de treinamento expondo-os a uma solução de sacarose a 10%, durante um período de 2 horas por dia. Durante o período de treinamento, os animais puderam ter livre acesso a água e comida. Após o período de treino, os animais foram testados. No dia de gestação específico de cada grupo, os animais tiveram acesso à

solução de sacarose e água pesados previamente, sendo que ao término do prazo de 2 horas os volumes ingeridos de água e sacarose foram verificados medindo a diferença de peso das duas garrafas (LI et al, 2012).

A preferência à sacarose (PS) foi determinada usando a seguinte equação:

$$PS = \frac{\text{volume de sacarose ingerido (mL)}}{\text{total(volume de água + volume de sacarose ingerido)}} \times 100$$

4.4.4 Teste de interação social

O teste de interação social consistiu no confronto entre o animal testado (animal residente) e um indivíduo da mesma espécie que tivesse, porém, idade e peso inferior – 100g a menos – (animal intruso). Para tanto, os animais foram colocados na arena de campo aberto e a interação entre residente e intruso foi registrada por uma câmera filmadora, durante 5 minutos. Para evitar que o comportamento exploratório atrapalhasse a exibição do comportamento de interação social, o animal residente foi ambientado à arena do campo aberto por 2 dias consecutivos, anteriores do dia do teste, por um período de 15 minutos.

No dia do teste, a exibição de comportamentos tais como: a exploração anogenital do intruso, o comportamento apresentado pelo animal residente em seguir o animal intruso e ainda o comportamento de monta (colocar as patas dianteira sobre o intruso) foram considerados como comportamentos de interação social e o tempo despendido em cada parâmetro comportamental foi mensurado. Os vídeos foram analisados e o tempo total de interação entre residente e intruso foi contabilizado (DER-AVAKIAN & MARKOU, 2014).

Figura 5. Aparato utilizado para a execução do teste de Interação Social



Fonte: do autor

4.5 ANÁLISE DA TEMPERATURA CORPORAL

Com o objetivo de averiguar interferências a partir do tratamento com LPS na temperatura corpórea dos animais, usou-se um transmissor de biotelemetria implantado na cavidade peritoneal nos animais. Para tanto, os animais foram submetidos a uma cirurgia a fim da introdução do transmissor. Com um prazo de 72 horas antes da aplicação do LPS, os animais foram devidamente anestesiados, seguindo rigidamente recomendações do Comitê de Ética da referida Universidade, através do uso de 2,2,2 tribromoetanol (TBE, i.p.; Sigma Aldrich, Brasil) na dose de 250 mg/kg. Em seguida, teve-se acesso à cavidade peritoneal por meio de laparotomia de 2cm no ventre dos animais. O transmissor (série 4000 E-Mitter; Mini Mitter, Bend, OR), devidamente limpo, foi implantado, seguido por sutura com dois pontos internos feitos no tecido muscular juntamente com dois pontos externos realizados no tecido epitelial (CRUNFLI; VILELA. GIUSTI-PAIVA, 2014). Imediatamente após o procedimento cirúrgico, foi administrado antibiótico ao animal (Pentabiótico; Fort Dodge, Brasil). Após a recuperação completa da anestesia, com exposição à temperatura de

32°C, os animais foram isolados em gaiolas individuais com livre acesso à água e comida (CLEMENT; MILLS; BROCKWAY, 1989).

No dia de gestação que os animais foram testados (12°DG ou 20°DG) colocou-os individualmente sobre uma placa receptora telemétrica (Data Science) acoplado a um computador capaz de receber, transformar e armazenar os dados referentes à temperatura dos mesmos. Cumpre-se ressaltar que os transmissores implantados transmitiram minuto a minuto, para a placa receptora, informações referentes à temperatura interna do animal. O registro referente à temperatura interna dos animais foi realizado por um período inicial de 40 minutos (tempo necessário para coleta da temperatura basal), sendo que após esse tempo foi injetado intraperitonealmente as drogas em questão (salina nos animais pertencentes ao grupo controle e LPS nos animais teste). A obtenção de tal registro é fundamental para verificar a temperatura basal dos animais. Após a injeção, a temperatura dos animais foi mensurada por um período de 8 horas (CRUNFLI; VILELA. GIUSTI-PAIVA, 2014) e repassadas para o software (Vital View, Mini Mitter), que armazenou os dados. Para determinação da temperatura basal calculou-se a média das temperaturas aferidas 30 minutos antes da primeira administração e a diferença entre a temperatura basal média e a temperatura obtida a cada intervalo foi calculada para obtenção da variação de temperatura (delta) (SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2015).

4.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS, PERFUSÃO E C-FOS

Os animais prenhes dos dias 12 DG e 20DG, transcorridas 2 horas da aplicação das drogas, foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol (250 mg/kg) e foram perfundidos, via punção intracardíaca, com solução contendo salina heparinizada seguida de solução de paraformaldeído 4% à 4°C. Os cérebros foram removidos, mergulhados em solução fixadora por 4 horas e em seguida colocados em solução de sacarose 30% em tampão fosfato 0,01M a 4°C. Posteriormente, os cérebros foram seccionados através de criostato na espessura de 30 µm.

Em seguida, os cortes foram submetidos à reação de bloqueio da peroxidase endógena usando-se para isso solução de H₂O₂ a 1% e bloqueio também das ligações inespecíficas com o uso de albumina bovina sérica (5%). Posteriormente, os cortes foram incubados em temperatura

ambiente durante 16 à 18 horas com anticorpo anti-fos primários policlonais (SANTA CRUZ, diluição 1:4000). A seguir, os cortes foram então incubados com o anticorpo secundário biotilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA) na diluição de 1:200. A coloração foi obtida por meio do complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector), empregando diaminobenzidina (DAB) com níquel e cobalto como cromógenos. O produto teve coloração violeta escuro-preto ao núcleo. A montagem dos cortes histológicos foi processada utilizando-se Gelatina de Albrecht (1,5% gelatina/álcool 80%), secados a temperatura ambiente, desidratado com xilol e cobertos com o meio de montagem (Entellan, Merck, Alemanha).

A análise microscópica foi realizada através de um microscópio óptico (Nikon H55L) acoplado a uma câmera digital Nikon DS-Ri1 e devidamente documentadas através de um sistema de captura de imagem acoplado ao microscópio (NIS Element Advanced Research). A determinação do número de neurônios imunorreativos a proteína c-fos foi mensurada em áreas específicas relacionadas com o comportamento de locomoção, febre e ingestão alimentar, como nos núcleos paraventricular (PVN, do inglês paraventricular nucleus; 1.30 mm posterior ao bregma), supraótico (SON, do inglês supraoptic nucleus; 1.30 mm posterior ao bregma), núcleo do leito da estria terminal (BNST do inglês bed nucleus of the stria terminalis; 0.20 mm anterior ao bregma) e área pré-ótica medial (MPOA, do inglês preoptic área; 0.30 mm anterior ao bregma), área septal lateral (LS do inglês lateral septal; 0.72 mm anterior ao bregma) e córtex piriforme (CPx; 0.12 mm anterior ao bregma) (VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2014; PAXINOS; WATSON, 2007). Uma área pontilhada para cada área a ser contada foi reproduzida baseada nas coordenadas deferidas pelo atlas de cérebro de ratos, sendo que assim foi projetada uma delimitação para cada imagem da seção a ser contada (PAXINOS; WATSON, 2007). A contagem foi realizada unilateralmente em uma seção por animal, e o limiar de coloração positiva foi estabelecido individualmente por dois participantes diferentes que estavam cegos para as condições experimentais.

4.7 DOSAGEM DE CITOCINAS

Os animais prenhes pertencentes ao 12° DG e ao 20° DG, após 2 horas de tratamento (salina ou LPS) tiveram o sangue coletado por meio de decapitação pelo tronco encefálico em tubos heparinizados. O sangue coletado foi então centrifugado à 3500 rpm durante 15 minutos a 4°C para separação e coleta do plasma que foi armazenado a -80°C até o dia da dosagem. As concentrações plasmáticas das citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) foram mensuradas através de ensaios enzimáticos (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay) usando kits comerciais (Peprotech, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Microplacas com 96 poços (High binding, Costar, EUA) foram previamente sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura e posteriormente tiveram os sítios inespecíficos bloqueados usando, para isso, solução de albumina bovina. Após lavagem, as amostras de plasma ou padrões foram incubados. Posteriormente, após as lavagens, foi adicionado anticorpo de detecção, seguida de incubação com solução de avidina-peroxidase e posterior adição da solução cromogênica para leituras das reações colorimétricas que foram realizadas a 405nm em leitor de microplacas (Synergy H1, BioTek). Posteriormente, a partir da obtenção da curva padrão, foram calculadas as concentrações plasmáticas de citocinas das amostras.

4.8 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA

A fim de se examinar a ativação do eixo HPA após tratamento com LPS, foi dosada a corticosterona dos animais através da técnica de radioimunoensaio (RIE). Os animais foram decapitados e 5 mL de sangue foi coletado em tubos heparinizados. Imediatamente após a coleta, o sangue foi centrifugado a uma rotação de 3000 RPM à 4° C durante 15 minutos. O plasma obtido foi armazenado devidamente em freezer com temperatura de -80° C até o momento das dosagens hormonais.

A corticosterona foi extraída de 25 μ L de soro através do uso de 1 mL de etanol e, em seguida, foi liofilizada. As amostras então foram solubilizadas em tampão apropriado e ensaiadas em duplicatas juntamente com a realização de uma curva padrão. As replicatas foram então incubadas com anticorpo anti-corticosterona produzido em coelho e com corticosterona triciada [1,2-3(H)] (New England Nuclear). A fim de proceder a separação da fração livre daquela fração

ligada foi utilizado uma solução contendo carvão dextran 0,5/0,05% por meio de centrifugação. O sobrenadante obtido foi lido em cintilador e as concentrações foram estimadas com base na curva padrão anteriormente obtida (ELIAS et al, 2004; ELIAS et al, 1997).

4.9 WESTERN BLOT

Para a quantificação de proteínas através da técnica de western blot foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental (controle ou LPS) pertencentes tanto ao 12° DG quanto também ao 20° DG. Após 2 horas de aplicação das respectivas drogas, os animais foram eutanasiados através de decapitação e os encéfalos foram expostos e coletados, em banho de gelo. Regiões encefálicas como córtex pré-frontal, hipotálamo e hipocampo foram coletadas. Inicialmente, tais regiões foram congeladas utilizando-se para isso nitrogênio líquido (- 86°C) e armazenadas em biofreezer (-80°C) até o momento em que as análises foram realizadas. Para o procedimento das análises, as regiões foram descongeladas em geladeira (4°C) e em seguida as amostras foram homogeneizadas em um tampão de lise juntamente com um coquetel de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (9200 RPM, 15 minutos, 4°C) Posteriormente, foi calculada a quantidade de proteína presente em cada amostra por meio do teste reagente de Bradford (Sigma Aldrich) utilizando a técnica de ELISA para a mensuração da quantidade proteica. As amostras contendo o tampão de lise somadas ao Laemmli foram fervidas a uma temperatura de 100°C e submetidas a análise de Western blotting. As proteínas foram separadas por meio de um gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE a 12%) por meio da técnica de eletroforese durante 150 minutos e posteriormente transferidas para membrana de PVDF por meio de um sistema semiseco (Bio-Rad Laboratories), Hercules, CA).

A membrana, então, foi lavada por 3 vezes, em PBS contendo 0,05% de Tween 20. Em seguida, a mesma membrana foi bloqueada utilizando-se para isso solução de 5% de leite desnatado em PBS durante 2 horas em temperatura ambiente. A fim de evitar ligações inespecíficas. A incubação primária foi utilizada usando-se um anticorpo anti GFAP (1:1000; Santa Cruz, 33673) ou anti IBA-1 (1:500; AbCam) overnight a 4°C. No dia seguinte, a membrana foi lavada por 3 vezes com solução de PBS 0,1M com 0,05% de Tween 20. A incubação secundária

foi realizada com anticorpo anti-rabbit (1:4000, *Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)*, ab6721, Abcam, Cambridge, Reino Unido).

Após o período de incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas 3 vezes com solução de PBS 0,1M e Tween 20 a 0,05%. As membranas foram submetidas a um kit de detecção comercial durante aproximadamente 1 à 2 minutos (kit de deteco ECL, Bio-Rad, Hercules, CA). As membranas foram, então, escaneadas através de um equipamento de captura de imagens (ChemiDoc XRS), capturando as imagens das membranas por quimiluminescência e analisadas, em relação a intensidade de cada banda expressa, empregando-se um software específico e próprio (ImageLab versão 6.0.1) proveniente da Bio-Rad Laboratories, Inc. Posteriormente, estas mesmas membranas foram submetidas ao processo de *stripping* seguido do bloqueio em 5% de leite desnatado em PBS durante 2 h. a temperatura ambiente Terminado o tempo de bloqueio, as membranas foram lavadas e procedeu a incubação em período overnight com anticorpo anti-actina (1:5000, Sigma Aldrich 4700).

No dia seguinte, após as lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário para β -actina (1:2000, Abcam- ab 6789). Após a incubação, procedeu-se as lavagens e utilizou-se um kit de detecção comercial durante aproximadamente 1 à 2 minutos (kit de deteco ECL, Bio-Rad, Hercules, CA) para marcação das bandas. As imagens foram então obtidas por meio de um sistema de quimiluminescência (Chemidoc, Bio- Rad, Hercules, CA) e as intensidades de banda foram quantificadas utilizando um software específico da Bio-Rad.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no presente estudo foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados oriundos dos testes comportamentais foram analisados através do emprego do teste estatístico ANOVA *two-way* considerando dois fatores sendo que um deles foi o tratamento com LPS e o outro fator foi dia de gestação em que o animal foi submetido aos testes. A análise estatística foi continuada empregando-se o pós-teste de Tukey. Já os dados obtidos através da telemetria foram analisados através da realização da área sob a curva calculando-se o delta da temperatura no intervalo de 3 à 8 horas. Já os dados oriundos da dosagem hormonal juntamente

foram analisados através do emprego do teste t de Student's analisando o grupo controle e o grupo tratado com LPS e também foram analisados por meio do uso da ANOVA *two-way* no qual um fator foi o tratamento com LPS ou salina e outro fator foi o dia de gestação. Neste caso, também empregou-se como pós-teste o teste de Tukey. Para todos os testes, assumiu como fato de significância como sendo $p < 0.05$.

5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Com finalidade de expor o desenho experimental que foi utilizado no presente estudo de modo sistemático, apresenta-se, nesse trecho, os protocolos experimentais usados:

5.1 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL EM PARÂMETROS RELACIONADOS À LOCOMOÇÃO/EXPLORAÇÃO, INGESTÃO ALIMENTAR, INTERAÇÃO SOCIAL E ANEDONIA

Os animais (n=12-15) foram testados em diferentes dias de gestação sendo divididos em 2 grupos: controle e tratado com LPS. No grupo controle foi administrado via IP salina 0,9% enquanto que o grupo tratado recebeu uma única injeção intraperitoneal de LPS 200µg/Kg. Após 2 horas da aplicação, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto.

- Teste do campo aberto

Os animais foram habituados na noite anterior à sala de experimentos comportamentais do laboratório de Fisiologia Translacional. Na manhã da realização do teste, após duas horas da aplicação das drogas (salina ou LPS), os animais foram introduzidos no aparato de campo aberto. No momento de realização do teste, os animais foram introduzidos no centro do aparato e filmados por 5 minutos.

- Teste de ingestão alimentar

No momento da aplicação das drogas, a oferta alimentar foi suspensa por um período de 2 horas. Após esse momento, a comida foi reintroduzida sendo inicialmente pesada. A ração foi pesada 2, 4, 6 e 24 horas após a reintrodução alimentar.

- Teste de interação social

Outro grupo de animais prenhes (n = 8-10) foram divididos de forma aleatória em controle (no qual recebeu injeção IP de salina) e LPS (os quais receberam injeções IP de LPS 200 µg/Kg). Após serem habituados ao aparato de interação social e pernoitados na sala de comportamento, os animais, em diferentes períodos da gestação, foram introduzidos ao aparato junto com um animal intruso, sendo este uma fêmea na fase diestro do ciclo estral. O teste teve duração de 10 minutos e foi gravado através de um sistema de câmeras. Posteriormente, o vídeo foi analisado e os comportamentos de interação social foram mensurados

- Teste de preferência à sacarose

Os mesmos animais que foram submetidos ao teste de interação social foram expostos também, no mesmo dia gestacional, ao teste de preferência à sacarose, sendo que os animais (n=8-10) foram divididos aleatoriamente em dois grupos distintos: controle e tratado com LPS.

Os animais de ambos os grupos foram expostos à etapa de treinamento durante 5 dias, quando foi oferecido aos animais solução de sacarose 10%. No dia específico de gestação em que os animais foram testados (6° DG, 9° DG, 12°DG, 15°DG, 18°DG ou 20° DG), após 2 horas da aplicação das injeções e imediatamente após a realização do teste de interação social, os animais foram expostos de forma irrestrita à água, comida e solução de sacarose 10% durante 2 horas. As garrafas de água e sacarose foram pesadas no início e no final do teste averiguando-se a diferença de peso entre elas. Ao final do experimento, foi mensurado à preferência do animal à água ou à sacarose.

5.2 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS, PERFUSÃO E IMUNOHISTOQUÍMICA

Outro conjunto de animais, os quais, por sua vez, não foram submetidos a testes comportamentais, foram eutanasiados. Para tanto, usou-se o método de perfusão e os animais tiveram seus cérebros coletados a fim da realização da imunohistoquímica para c-fos.

O grande objetivo da realização da imunomarcção para c-fos foi a identificação de áreas cerebrais que possam estar ativadas ou inibidas ao longo da gestação devido ao desafio imunológico com LPS.

5.3 ANÁLISE DA TEMPERATURA

Este protocolo experimental teve o objetivo de verificar a termorregulação das fêmeas prenhes em comportamento doentio. Cerca de 72 horas antes do dia de gestação no qual os animais (n =10-12) foram testados (12 DG ou 20DG), o transmissor foi implantado na cavidade abdominal. No dia do teste, cerca de 40 minutos antes da injeção, seja com veículo ou com LPS 200µg/Kg, a temperatura basal foi aferida. Respeitado esse período de tempo, os animais receberam as drogas utilizadas e a temperatura foi mensurada posteriormente por um período de 8 horas.

5.4 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA E CITOCINAS

Outro grupo formado por 10 animais controle e outros 10 tratados com LPS foram submetidos a dosagens de corticosterona através da técnica de radioimunoensaio e dosagens de citocinas plasmáticas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α). Para tanto, os animais prenhes no 12º dia de gestação e também no 20º dia de gestação foram injetados com as respectivas drogas e decorrido o período de 2 horas da aplicação das mesmas os animais foram então decapitados e deu-se prosseguimento à análise tal como elucidado anteriormente.

6 RESULTADOS

Na manhã seguinte ao acasalamento, procedeu a verificação da presença de espermatozoides no lavado vaginal das fêmeas. Através da técnica de lavado vaginal, foi possível identificar animais que se encontraram em diferentes fases no ciclo estral: estro, diestro, metaestro e proestro. Aquelas ratas que se encontraram no período estro do ciclo estral e que continham espermatozoides em seu lavado foram separadas e identificadas como prenhes. O dia da constatação da presença de espermatozoides no lavado vaginal foi chamado de dia gestacional zero (ODG).

A Figura 6 evidencia a presença de espermatozoides no lavado vaginal das ratas envolvidas no presente estudo.

Figura 6 – Presença de espermatozoides no lavado vaginal de ratas no fase estro do ciclo estral



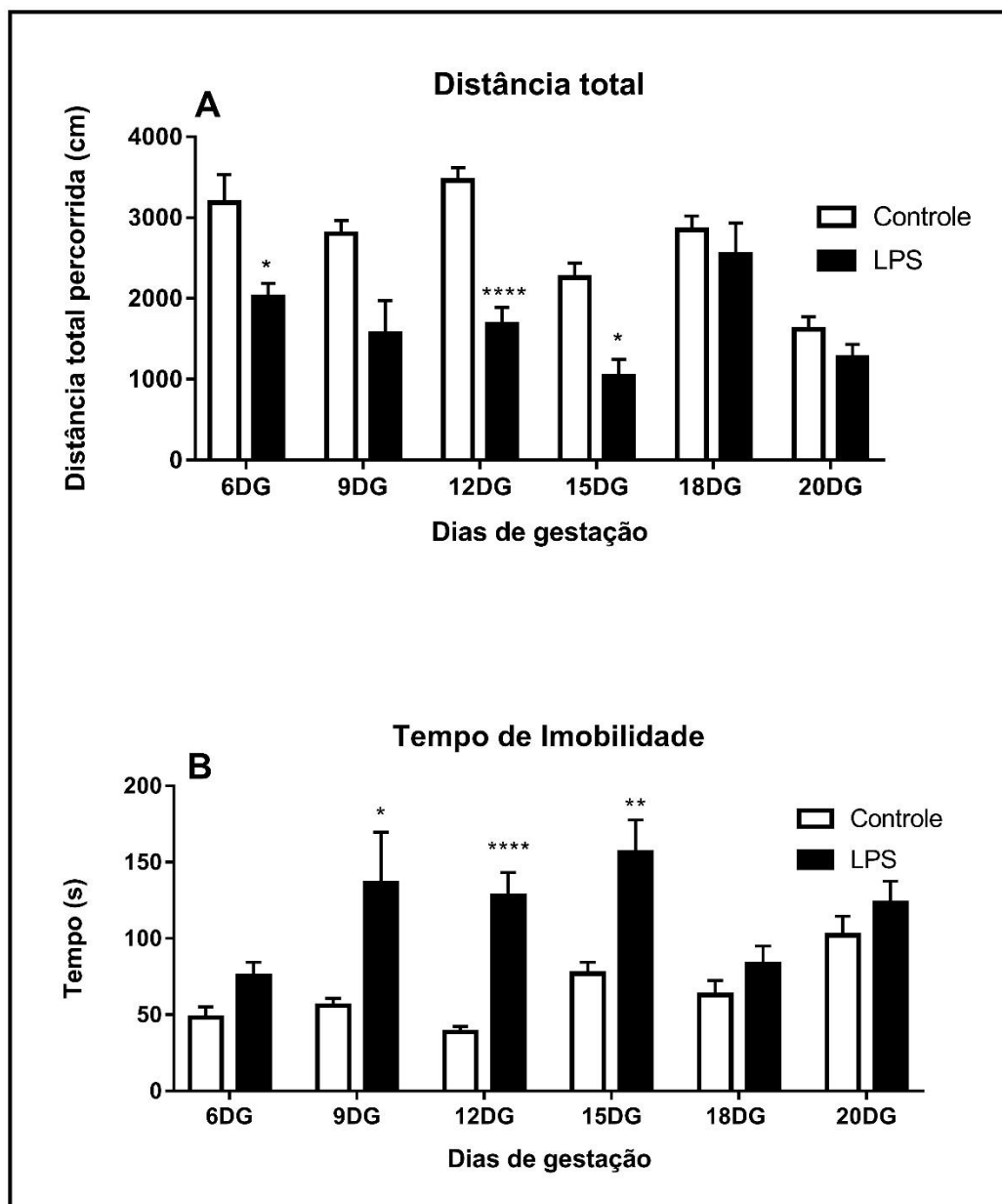
Fonte: do autor

Após a constatação da prenhez, as ratas foram submetidas ao tratamento com salina (NaCl 0,9%) ou LPS em diferentes dias de gestação e avaliadas em diferentes testes comportamentais a fim de verificar a resposta frente ao desafio imunológico. Os resultados obtidos após a execução dos testes estão expostos a seguir.

6.1 ANÁLISE DO TESTE DO CAMPO ABERTO

A Figura 7 expressa os resultados obtidos com os animais submetidos ao Teste do Campo Aberto nos dias 6 DG, 9 DG, 12 DG, 15 DG, 18 DG e 20 DG.

Figura 7 Gráfico referente à exposição dos animais no campo aberto após 2 horas do LPS



Fonte: do autor

Nota: Dados referente a análise do teste do campo aberto em animais prenhes após 2 horas de administração das drogas (salina ou LPS). Dados apresentados com média \pm erro padrão da média (EPM). A-Distância total percorrida (cm) B- Tempo imóvel (segundos) (*) refere-se a diferença significativa do ponto de vista estatístico, sendo $p \leq 0.05$ comparando-se ao respectivo grupo controle (salina); (**) refere-se a diferença com nível de significância onde $p \leq 0.01$ e (****) onde $p < 0.0001$ sempre comparados com o respectivo grupo controle. N= 11-20

Tabela 1- Análise de variância de duas vias sobre a distância total percorrida no teste do campo aberto.

	Tratamento	Dias de gestação	Interação
Distância percorrida	F(1,150)=48,8; P<0,0001	F(5,150)=9,08; P<0,0001	F(5,150)=2,64; P=0,0253

Fonte: do autor

O LPS foi capaz de diminuir a distância total percorrida no 6ºDG ($p = 0,0031$), e também nos dias 12DG ($p < 0,0001$) e 15DG ($p = 0,05$). Nota-se que a endotoxemia aumentou o tempo imóvel nos animais prenhes no 9DG ($p = 0,0272$), no 12DG ($p < 0,0001$) e também no 15DG ($p = 0,0049$), conforme demonstrado na Tabela 2. Desse modo, infere-se que o LPS alterou de maneira significativa a capacidade exploratória/locomotora dos animais prenhes, sobretudo no 12DG, não sendo observadas alterações nos períodos finais da gestação.

Tabela 2- Análise de variância de duas vias sobre o tempo imóvel de animais prenhes no teste do campo aberto após 2 horas de aplicação do LPS.

	Tratamento	Dias de gestação	Interação
Tempo Imóvel	F(1,156)=46,8; P<0,0001	F(5,156)=5,28; P=0,0002	F(5,156)=3,05; P=0,0118

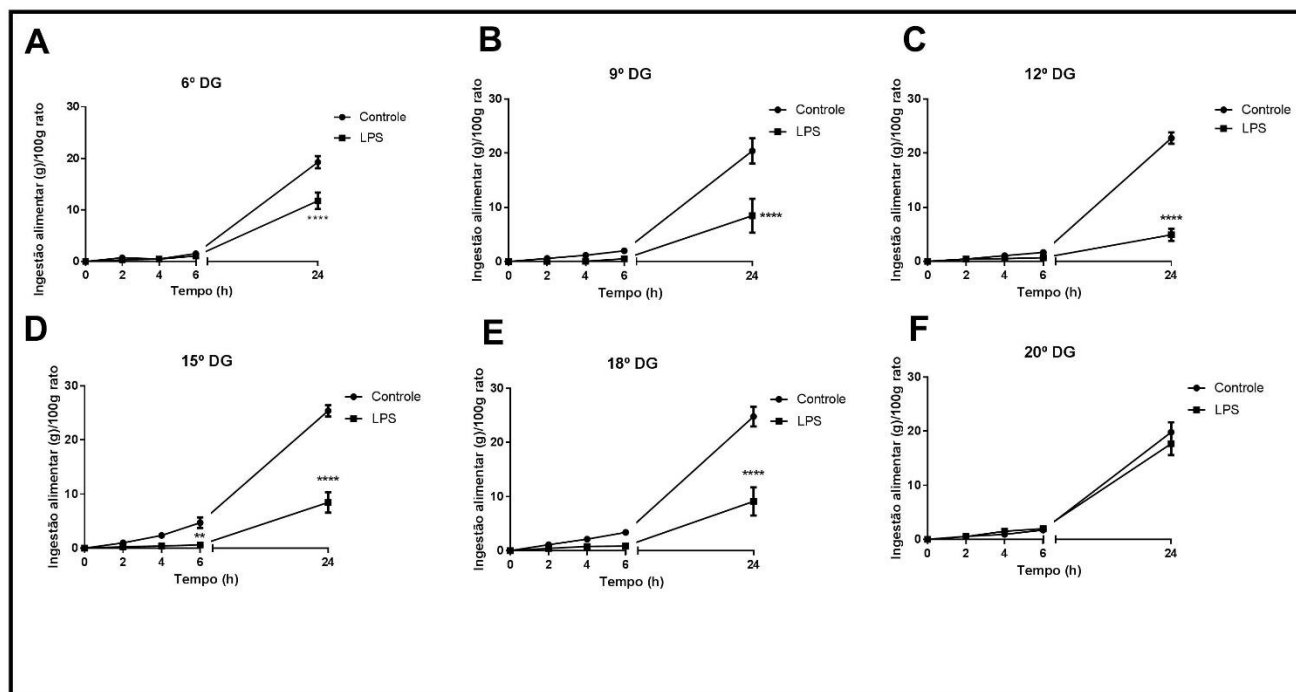
Fonte: do autor

6.2 ANÁLISE DA INGESTÃO ALIMENTAR

Os dados referentes a análise da ingestão alimentar estão expressos na Figura 8.

Nota-se que no 15ºDG há uma redução na ingestão alimentar nos animais prenhes que receberam LPS no tempo de 6 horas, quando comparados ao seu respectivo grupo controle ($p = 0,0183$), além de observar também uma redução no tempo de 24 horas ($p < 0,0001$).

Figura 8– Efeito do LPS na ingestão alimentar ao longo de 24 horas em diferentes dias de gestação



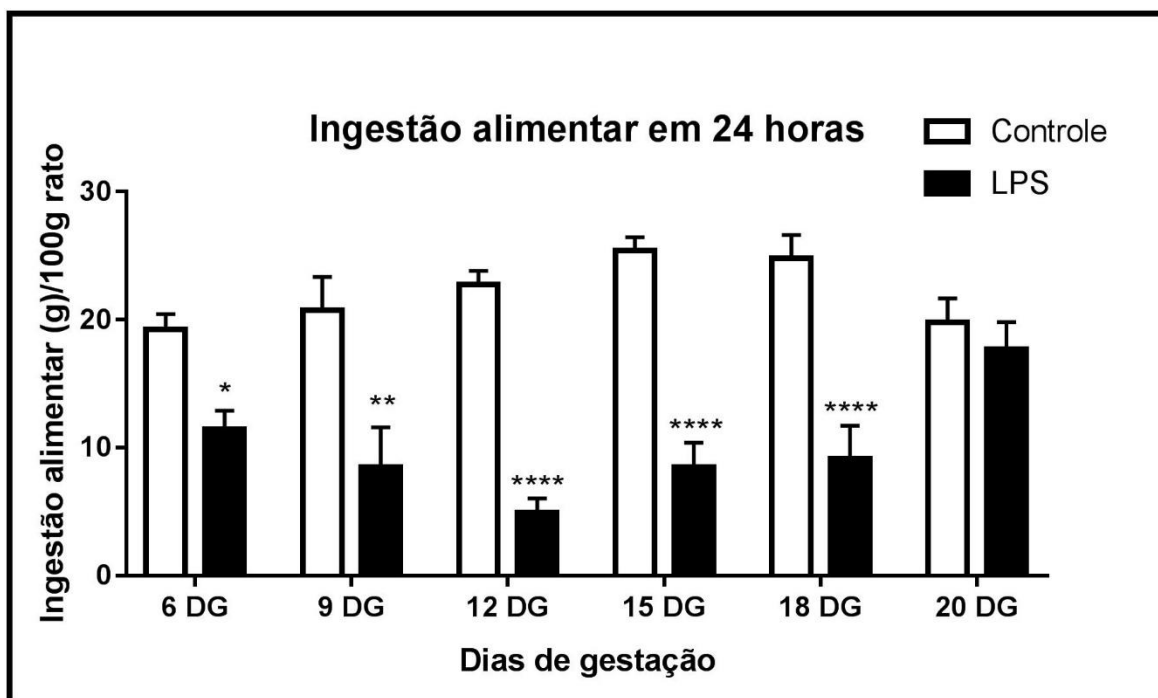
Fonte: do autor

Nota: Dados referentes à análise da ingestão alimentar em 2, 4, 6 e 24 horas após o desafio imunológico. Dados apresentados com média \pm erro padrão da média (EPM). A- Tratamento realizado no 6°DG B- 9°DG C- 12°DG D- 15°DG E-18°DG F- 20°DG. (**) refere-se a diferença com nível de significância onde $p \leq 0.01$ e (****) onde $p < 0.0001$ sempre comparados com o respectivo grupo controle. N = 14-20

Foi observado que em todos os dias de gestação, exceto no 20° DG, há uma redução na ingestão alimentar dos animais que receberam LPS na dose de 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ no tempo de 24 horas quando comparado o grupo controle ($p < 0,0001$).

Para verificar as diferenças em relação à ingestão alimentar especificamente no tempo de 24 horas após a aplicação do LPS procedeu-se a execução do teste do ANOVA two-way, considerando o tratamento e o dia de gestação como fatores de análise. Os resultados estão demonstrados na Figura 9.

Figura 9 – Efeito do LPS na ingestão alimentar 24 horas após a endotoxemia em diferentes dias de gestação



Fonte: do autor

Nota: Dados referente ao delta da ingestão alimentar após 24 horas de administração das drogas (salina ou LPS). Dados apresentados com média \pm erro padrão da média (EPM). (*) refere-se a diferença significativa do ponto de vista estatístico, sendo $p \leq 0.05$ comparando-se ao respectivo grupo controle (salina); (**) refere-se a diferença com nível de significância onde $p \leq 0.01$ e (****) onde $p < 0.0001$ sempre comparados com o respectivo grupo controle. N= 14-20

Observamos uma redução da ingestão de alimentos em todos os dias analisados, exceto no 20° DG, quando comparado aos respectivos grupos controle, após a administração do LPS em animais prenhes.

Nota-se ainda que a maior redução na ingestão alimentar após 24 horas de aplicação do LPS ocorreu no 12° DG, sendo o dia com maior resposta à ação do LPS na indução da anorexia.

Pode-se, portanto, diante dos resultados obtidos, afirmar que o LPS provoca anorexia em até 24 horas após sua aplicação, evidência do comportamento doentio, em todos os dias de gestação analisados, exceto no 20° DG.

Tabela 3- Análise de variância de duas vias sobre o delta da ingestão alimentar em 24 horas de animais prenhes submetidos ao tratamento com salina ou LPS em diversos dias de gestação

	Tratamento	Dias de gestação	Interação
Delta da ingestão alimentar	F(1,161)=132,1; P<0,0001	F(5,161)=1,96; P=0,0865	F(5,161)=5,60; P<0,0001

Fonte: do autor

Ademais, os dados obtidos após execução do pós-teste de Tukey, adotando como significância $p \leq 0.05$ encontram-se dispostos na tabela abaixo.

Tabela 4- Análise do teste de múltiplas comparações de Tukey's entre os animais tratados com salina ou LPS em diversos dias ao longo da gestação verificando o delta da ingestão alimentar

	Média ± Desvio padrão	Valor de p
6º DG Controle vs 6º DG LPS	19,27± 5,092 vs 11,41±6,962	p = 0,0119
9º DG Controle vs 9ºDG LPS	20,77± 7,697 vs 8,467 ±10,34	p = 0,0035
12º Controle vs 9º DG LPS	22,75± 4,634 vs 4,903±4,936	p <0,0001
15º DG Controle vs 15º DG LPS	25,39± 3,462 vs 8,466±7,638	p <0,0001
18 DG Controle vs 15º DG LPS	24,78± 5,816 vs 9,114±8,646	p <0,0001
20º DG Controle vs 20º LPS	19,81± 6,642 vs 17,7± 7,646	p = 0,9997

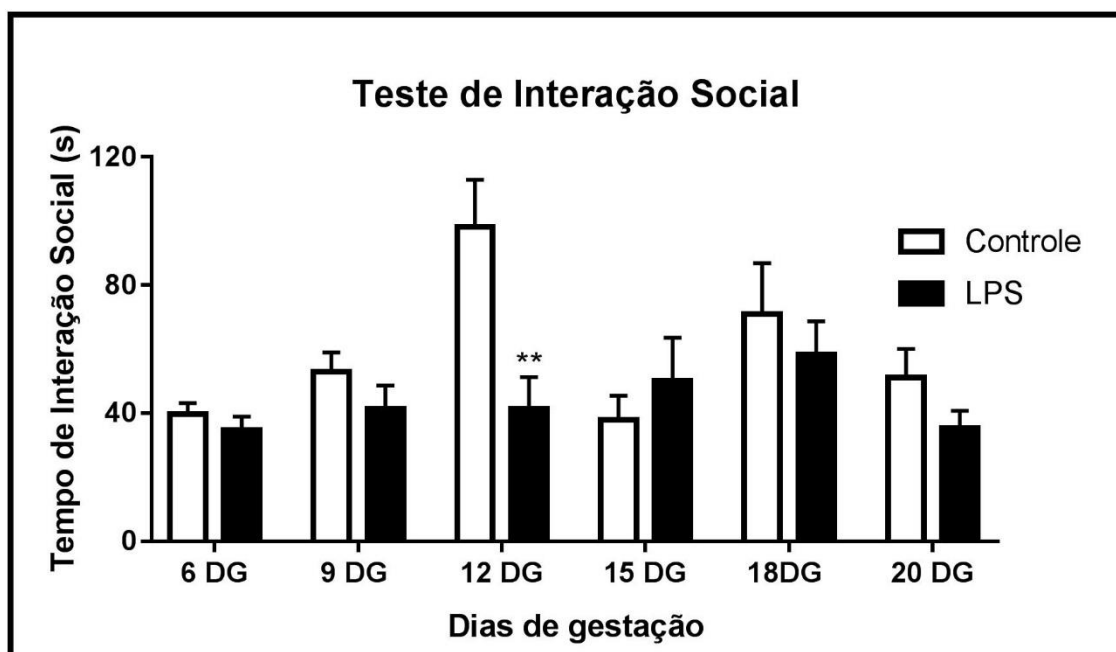
Fonte: do autor

Nota: Valores expressos como média ± Desvio Padrão

6.3 ANÁLISE DA INTERAÇÃO SOCIAL

Nosso estudo verificou também a interferência do LPS (200 µg/Kg) na interação social dos animais prenhes, 2 horas após a aplicação das drogas, em diferentes dias de gestação. Os dados estão expressos na Figura 10, logo abaixo.

Figura 10 – Efeito do LPS após 2 horas de sua aplicação na interação social de animais prenhes ao longo da gestação



Fonte: do autor

Nota: Tempo total de interação social em animais prenhes de diversos dias de gestação submetidos ao desafio imunológico com LPS. Dados apresentados com média \pm erro padrão da média (EPM). (***) refere-se a diferença com nível de significância onde $p \leq 0.01$ comparado ao respectivo grupo controle. N = 8-12

Ao executarmos as análises estatísticas, nota-se que o LPS foi capaz de reduzir a interação social em animais prenhes apenas no 12º DG ($p = 0,0041$), não sendo encontrada diferença estatísticas nos demais dias analisados, ressaltando que a mensuração da sociabilidade foi executada 2 horas após a administração do LPS ou salina nos animais prenhes. Desse modo, afirma-se que o 12º DG é o ponto de maior resposta ao LPS na questão de sociabilidade. As demais informações à respeito dos dados obtidos por meio da realização do teste de interação social encontram-se descritos na tabela abaixo.

Tabela 5- Análise da variância de duas vias dos grupos controle e LPS em vários dias de gestação submetidos ao teste de interação social

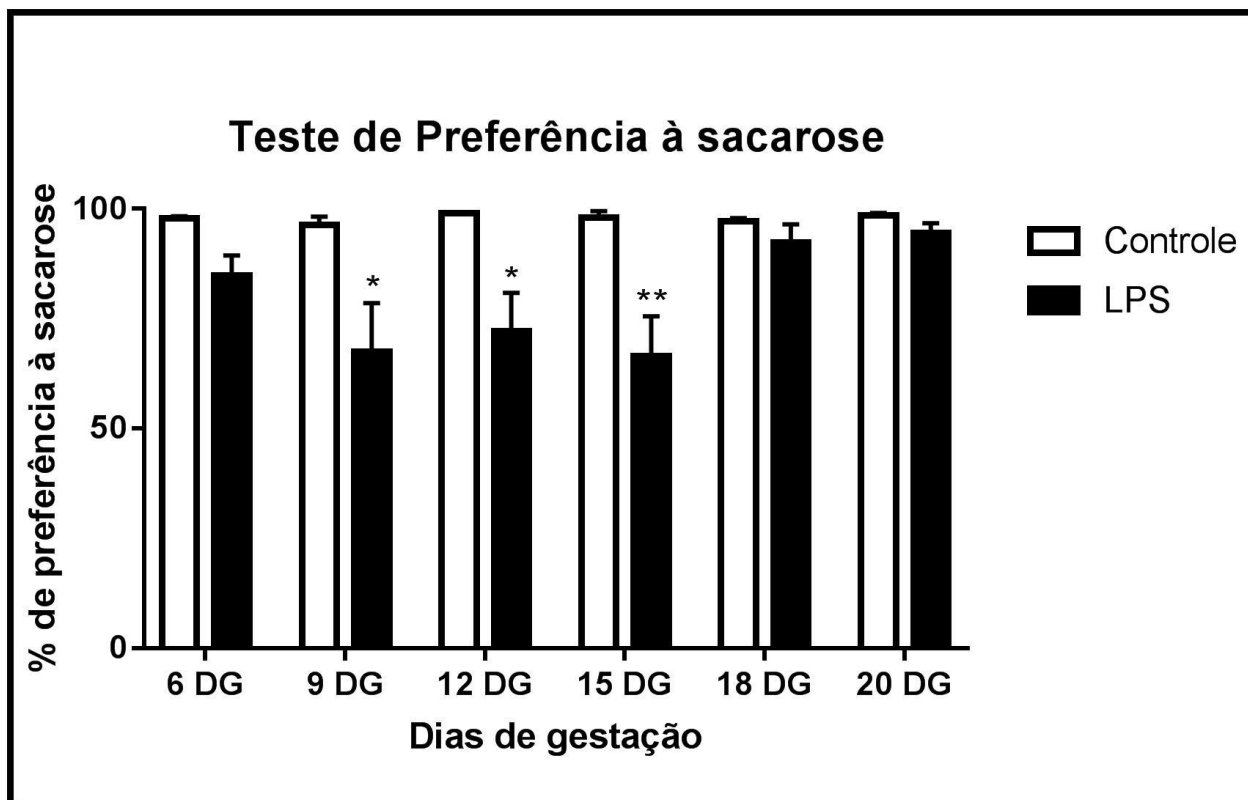
	Tratamento	Dias de gestação	Interação
Tempo total de interação	F (1, 105) = 7,17; P=0,0086	F (5, 105) = 3,653; P=0,0044	F (5, 105) = 2,82; P=0,0197

Fonte: Do autor.

6.4 ANÁLISE DA PREFERÊNCIA À SACAROSE

Em relação ao teste de preferência à sacarose, os resultados obtidos encontram-se dispostos no Gráfico da Figura 11. Nota-se que o LPS administrado 2 horas anteriores à execução do teste foi capaz de diminuir a ingestão e a preferência pela sacarose nos dias 9DG ($p = 0,0139$), 12 DG ($p = 0,0175$) e 15DG ($p = 0,0012$). No entanto, devemos ressaltar que a inexistência de significância estatística no 6ºDG é um artefato estatístico encontrado ao se comparar todos os grupos pelo teste da ANOVA two-way seguido pelo pós-teste de Tukey's, pois se, ao contrário, analisássemos somente o 6ºDG de forma isolada, executando um teste T de Student's não pareado, encontraríamos um valor de $p = 0,0084$. No entanto, nosso objetivo é comparar os dias de gestação e também os grupos de maneira conjunta, a fim de verificar a influência dos dias gestacionais na obtenção da resposta comportamental frente ao desafio imunológico. Desse modo, procedemos a execução e análise do teste de variância de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey's. Diante do maior número de comparações entre si, há uma perda de significância a fim de aumentar a confiabilidade do teste. No entanto, nos outros grupos, o LPS reduziu a preferência à sacarose, indiciando um quadro semelhante a anedonia, típico do comportamento doentio. No final da gestação, como observado nos dias 18 DG e 20DG não há diferença quando comparados os grupos controle e LPS no que tange à preferência à sacarose.

Figura 11 - Análise da preferência à sacarose de animais prenhes submetidos à endotoxemia por LPS (200 µg/Kg) em variados períodos da gestação.



Fonte: do autor

Nota: Dados referentes aos valores obtidos no teste de preferência à sacarose. Dados apresentados com média \pm erro padrão da média (EPM). (*) refere-se à diferença estatística onde $p < 0.05$ e (**) $p < 0.01$ quando comparados ao respectivo grupo controle. N= 12-18

Tabela.6- Análise da variância de duas vias dos grupos controle e LPS de animais prenhes em diferentes períodos da gestação submetidos ao teste de preferência à sacarose

	Tratamento	Dias de gestação	Interação
Preferência à sacarose	F (1, 118) = 38,77; P<0,0001	F (5, 118) = 3,185; P=0,0098	F (5, 118) = 3,035; P=0,0130

Fonte: Do autor.

Destaca-se, ao proceder a execução do pós-teste de Tukey's, que mais uma vez, o 12º DG apresenta diferença no parâmetro analisado, indicando um quadro de anedonia, componente clássico dos sintomas do comportamento doentio.

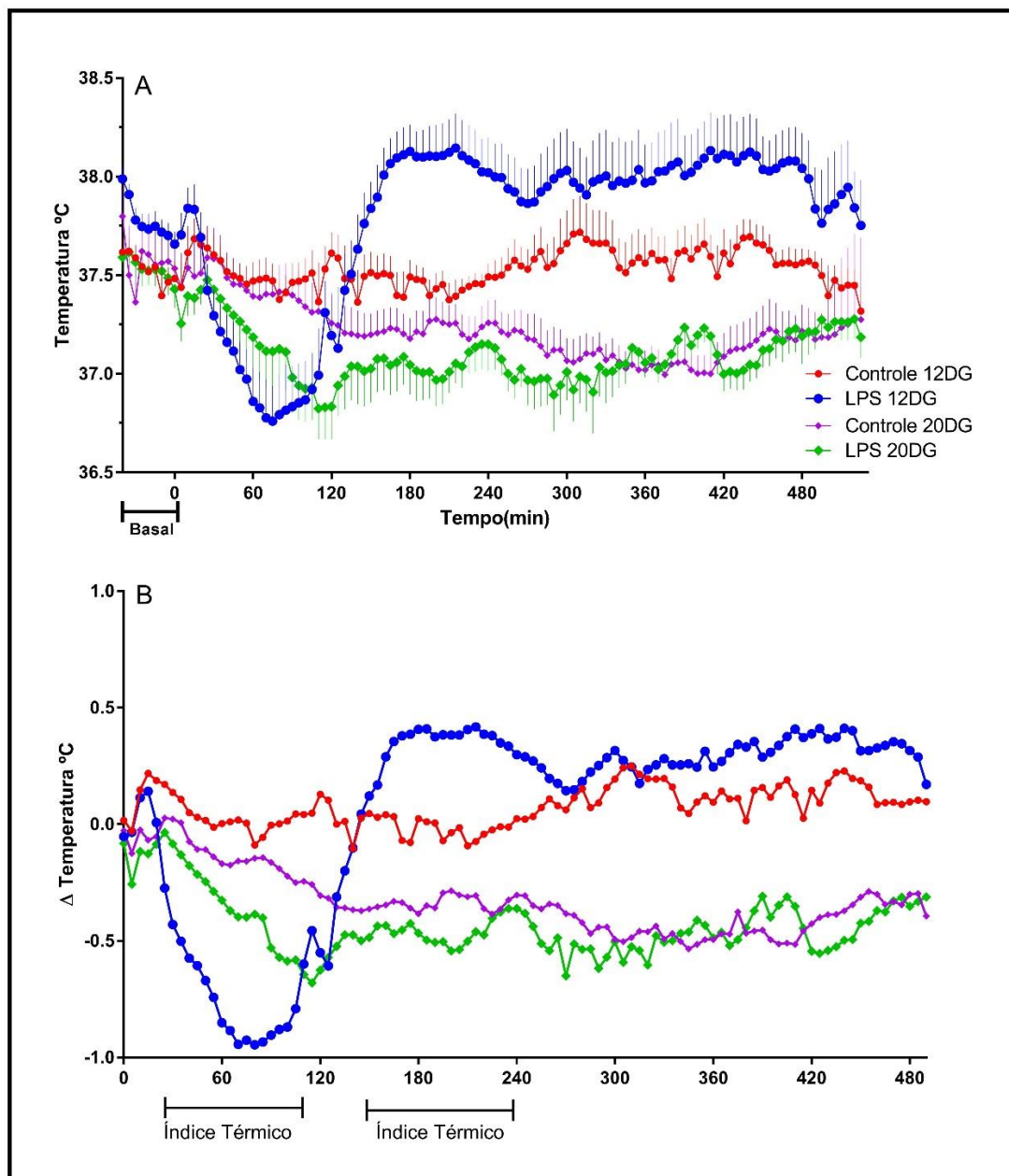
6.5 ANÁLISE DA TEMPERATURA

A partir dos dados obtidos pela realização dos testes comportamentais, podemos verificar que há dois pontos distintos que respondem de maneira diferente à endotoxemia na gestação: há um ponto de maior responsividade, no qual há um conjunto de manifestações do comportamento doentio sendo observado queda na capacidade exploratória e locomotora, diminuição da ingestão alimentar evidenciando um quadro de anorexia, queda na interação social além de apresentar diminuição na preferência à sacarose evidenciando um quadro de anedonia, sendo este o 12º DG. Há, ainda, um ponto no qual não há qualquer alteração provocada pela administração do LPS, ponto em que a resposta comportamental permanece similar aos animais controles, sendo que este ponto pode ser considerado de hiporresponsividade frente ao desafio imunológico, uma vez que não encontramos qualquer diferença nos testes comportamentais realizados; sendo este o 20º DG. Essa observação permitiu que pudéssemos avançar nossos estudos afim de averiguar os mecanismos que promovem essa diferenciação. A partir de então, tomou-se os 12º DG e o 20º DG para realização de outros experimentos que incluem a análise da temperatura corporal interna, o estudo imunohistoquímico de áreas do cérebro para c-Fos, a dosagem de citocinas plasmáticas e a mensuração da concentração plasmática de corticosterona.

A análise da temperatura foi realizada por meio da telemetria, como descrito previamente. Os dados referentes à variação da temperatura dos animais prenhes no 12º DG e 20º DG submetidos ao desafio imunológico com LPS estão dispostos nos gráficos à seguir.

A Figura 12 demonstra temperatura ao longo de 480 minutos, período em que a temperatura foi coletada e analisada e também o delta da temperatura ao longo do referido período analisado.

Figura 12 - Análise da variação da temperatura animais prenhes submetidos à endotoxemia por LPS (200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) ao longo de 480 minutos no 12^o DG e no 20^o DG



Fonte: do autor

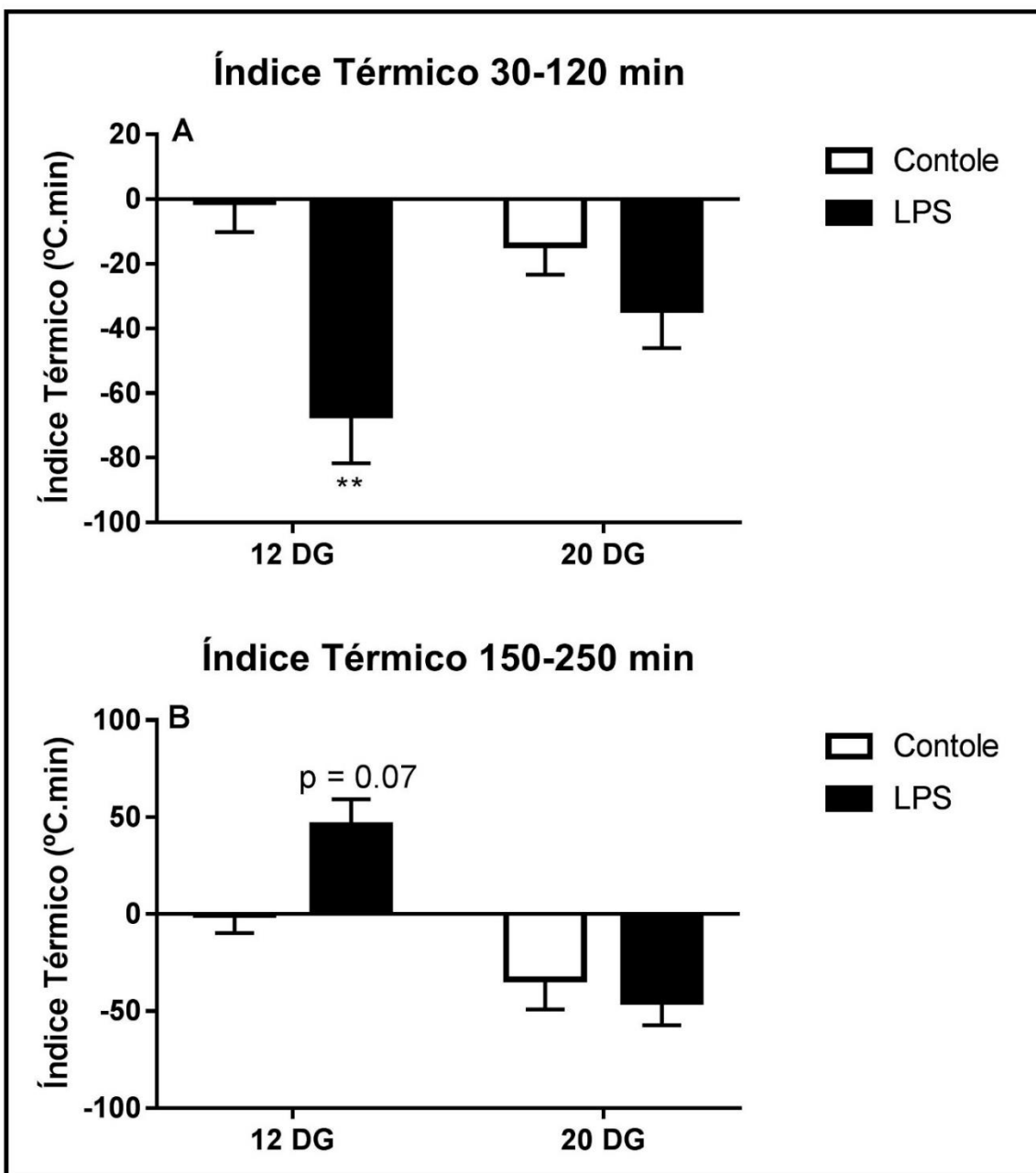
Nota: A- Análise da temperatura corporal de animais prenhes no 12^oDG e 20^oDG submetidos aos tratamentos. B- Delta da temperatura corporal. Dados apresentados como média \pm EPM (n = 12 animais por grupo).

Com os dados obtidos a partir do delta da temperatura, analisamos o índice térmico no período entre 30 a 120 minutos e no período de tempo entre 150 a 250 minutos em ambos os dias estudados. Os valores do dois períodos do índice térmico encontram-se dispostos no Figura 13.

Através do emprego do teste estatística de variância de duas vias e pós-teste de Tukey's podemos verificar que no 12º DG o LPS é capaz de provocar uma hipotermia inicial no período entre 30 a 120 minutos, verificando pela queda no índice térmico quando comparado com o respectivo grupo controle ($p=0,0011$). Posteriormente, no período entre 150 a 250 minutos, verificamos uma tendência do LPS administrado nos animais prenhes no 12º DG à causar hipertermia e febre nos animais quando comparados ao seu respectivo grupo controle ($p= 0,0728$). Não foram encontradas diferenças nos valores de índice térmico entre os animais controle e LPS no 20º DG.

Com isso, pode-se afirmar que o LPS é capaz de provocar uma resposta bifásica no 12ºDG, uma vez que causa hipotermia nas 2 horas iniciais seguida de hipertermia que dura até 250 minutos após sua administração.

Figura 13. Análise do índice térmico de animais nos 12DG e 20DG submetidos à endotoxemia através da administração de LPS (200 µg/Kg)



Fonte: do autor

Nota: Dados apresentados com média \pm erro padrão da média (EPM) do índice térmico do intervalo entre 30 a 120 minutos (A) e do intervalo de tempo entre 150 a 250 minutos. (**) refere-se à diferença estatística onde $p < 0.01$ quando comparado ao respectivo grupo controle. N = 12 animais por grupo

Os demais valores oriundos do teste de ANOVA two-way para os períodos de índice térmico analisados estão expostos nas tabelas 7 e 8.

Tabela.7- Análise do índice térmico no período entre 30-120 minutos de animais administrados com LPS (200 µg/Kg) no 12°DG e 20° DG

	Tratamento	Dias de gestação	Interação
Índice Térmico 30-120 minutos	F (1, 35) = 14,4; P=0,0006	F (1, 35) = 0,727; P=0,3995	F (1, 35) = 4,09; P=0,050

Fonte: Do autor.

Tabela 8 - Análise do índice térmico no período entre 150-250 minutos de animais administrados com LPS (200 µg/Kg) no 12°DG e 20° DG

	Tratamento	Dias de gestação	Interação
Índice Térmico 150-250 minutos	F (1, 33) = 1,85; P=0,1822	F (1, 33) = 24,07; P<0,0001	F (1, 33) = 5,19; P=0,029

Fonte: Do autor.

6.6 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA C-FOS

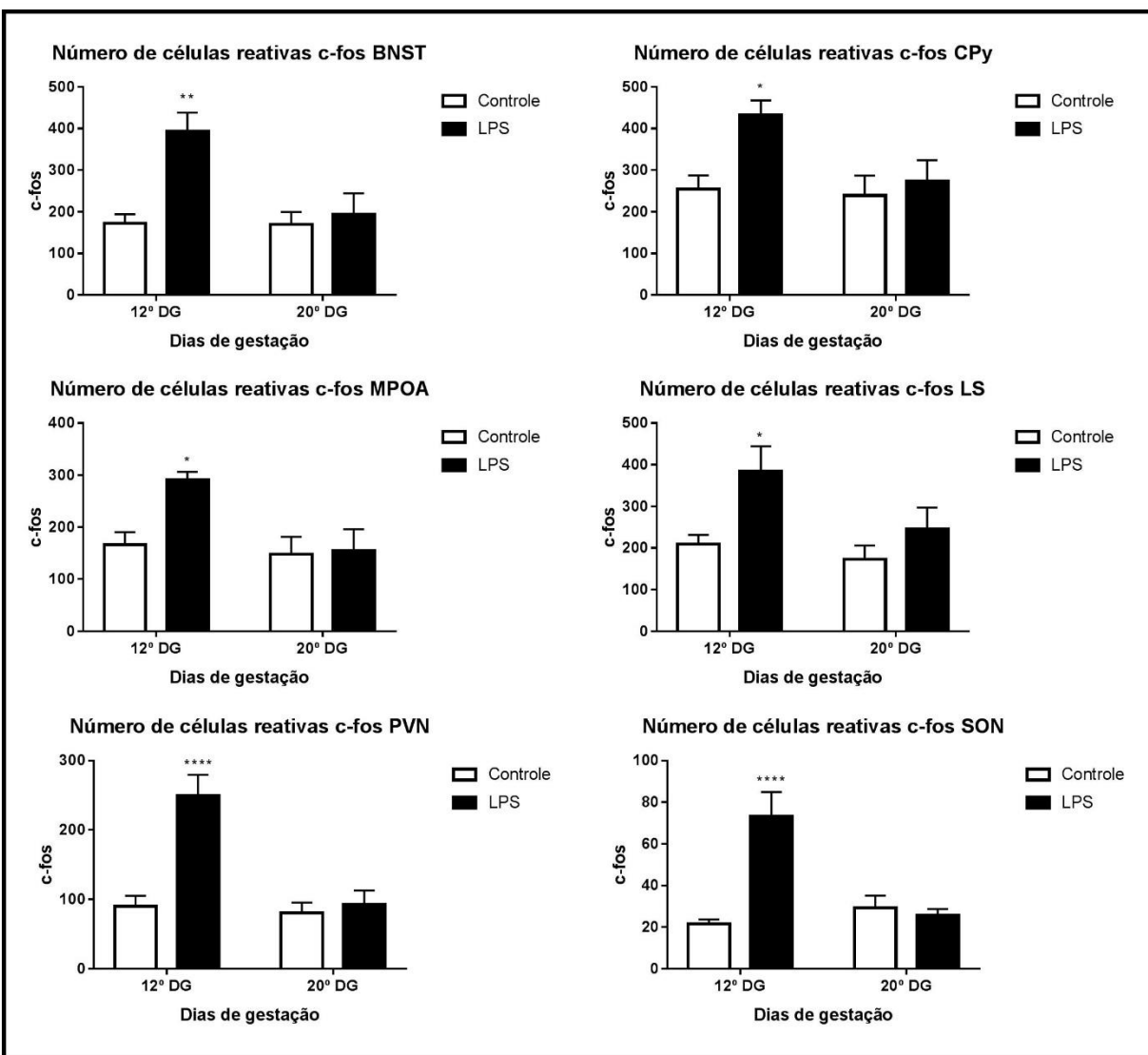
Após a perfusão e procedimentos imunohistoquímicos para marcação da atividade neuronal, as lâminas foram analisadas e observadas regiões específicas relacionadas com o comportamento doentio de animais submetidos ao tratamento com LPS (200 µg/Kg) tanto no 12° DG quanto no 20° DG.

Os dados da marcação da atividade neuronal, através da contagem do número de células positivas para c-Fos bem como as eletromicrografias estão dispostas abaixo.

É possível verificar que o LPS administrado no 12° DG aumentou o número de neurônios que expressam a proteína intranuclear c-Fos em todas as regiões analisadas, quando comparadas ao seu respectivo grupo controle. No entanto, o LPS não foi capaz de provocar qualquer alteração no número de células marcadas positivamente para c-Fos nas áreas estudadas no 20° DG, indicando, desse modo, uma resposta diferencial. O LPS provoca uma hiper-resposta quando

administrado no 12º DG observado pelo aumento do número de células positivas e não causa alteração no 20º DG.

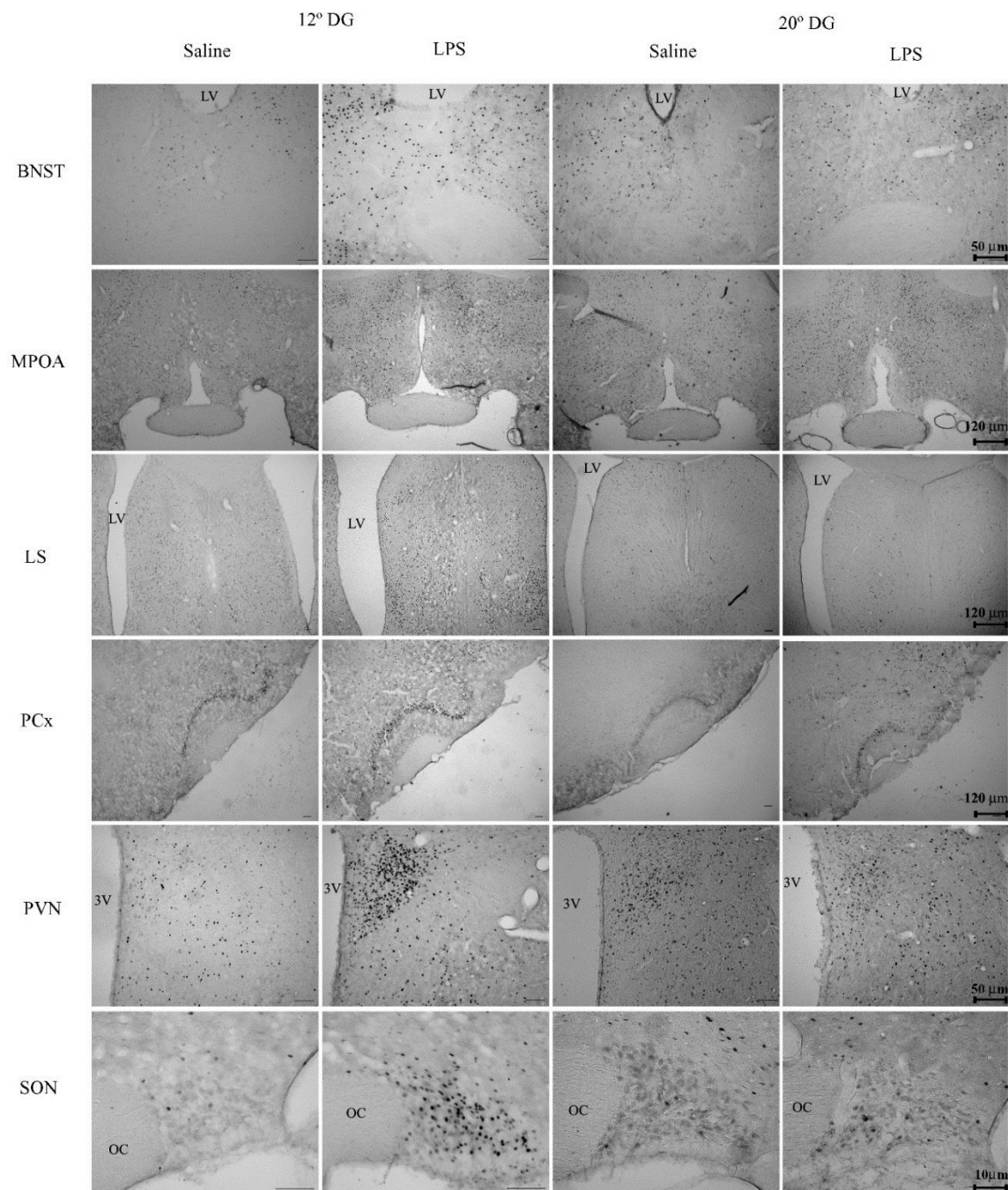
Figura 14 Análise do índice térmico de animais nos 12DG e 20DG submetidos à endotoxemia através da administração de LPS (200 µg/Kg).



Nota: Valores expressos como média ± E. P. M. (*) p < 0,05 e (**) p < 0,01 comparando com o respectivo grupo controle. **** p < 0,0001; comparando com grupo controle. BNST: Bed nucleus of the stria terminalis ou núcleo leito da estria terminal. Cpy: córtex piriforme. MPOA: Área pré optica medial. LS: lateral septal ou área septal lateral. PVN: Núcleo paraventricular do hipotálamo. SON: núcleo supra optico.

Fonte: Do autor.

Figura 15. Efeito do LPS na dose de 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ em ratos controle (salina) e tratados no 12^o DG e 20^o DG sobre a expressão de c-Fos



Fonte: do autor

Nota: Fotomicrografias representativas de cortes de encéfalo mostrando células positivas no BNST (10x), MPOA (10x), LS (10x), CPy (10x), PVN (40x) e SON (100x).

Tabela 9 - Efeito do LPS administrado i.p 2 horas antes da perfusão e coleta dos cérebros em animais prenhes no 12º DG e 20º DG sobre a expressão de c-Fos em neurônios de diversas regiões encefálicas

	Controle DG	12º LPS 12º DG	Controle DG	20º LPS 20º DG
BNST	172,28±56,91	393,0±110,09 **	169,8± 78,02	193,57±134,047
MPOA	166,5±23,95	290,83±15,69 *	148,28±33,26	155,16±41,14
LS	209,28±22,34	384,33±60,22 *	172,57±33,47	245,2±52,23
PCx	254,83±32,46	432,4±35,02 *	239,33±47,51	273,57±50,32
PVN	90,14±39,60	249,85±78,82*****	80,57±39,48	93,0±52,26
SON	21,42±6,13	73,28±30,66*****	29,28±15,35	25,71± 7,91

Nota: Valores expressos como média ± E. P. M. (*) p< 0,05 e (**) p< 0,01 comparando com o respectivo grupo controle. ***** p<0,0001; comparando com grupo controle.

Fonte: Do autor.

Os valores encontrados no teste de variância de duas vias estão expostos nas tabelas abaixo.

Tabela.10 - Análise de variância Two-way sobre o número de células marcadas positivamente para c-Fos em regiões como BNST, MPOA, LS, PCx, PVN e SON após 2 horas do tratamento de salina ou LPS no 12º DG e no 20º DG.

	Fator Tratamento	Fator Dias de gestação	Interação
BNST	F (1, 23) = 10,29; P=0,0039	F (1, 23) = 7,017; P=0,0143	F (1, 23) = 6,683; P=0,0165
MPOA	F (1, 21) = 4,615; P=0,0435	F (1, 21) = 6,348; P=0,0199	F (1, 21) = 3,698; P=0,0681
LS	F (1, 21) = 8,532; P=0,0082	F (1, 21) = 4,301; P=0,0506	F (1, 21) = 1,459; P=0,2405
PCx	F (1, 22) = 6,199; P=0,0208	F (1, 22) = 4,2; P=0,0525	F (1, 22) = 2,839; P=0,1061
PVN	F (1, 24) = 17,18; P=0,0004	F (1, 24) = 16,06; P=0,0005	F (1, 24) = 12,58; P=0,0016
SON	F (1, 24) = 12,78; P=0,0015	F (1, 24) = 8,648; P=0,007	F (1, 24) = 16,85; P=0,0004

Fonte: Do autor.

6.7 DOSAGEM DE CITOCINAS PLASMÁTICA

Após a execução do teste de variância de duas vias, seguida do pós-teste de Tukey's, pode-se afirmar que o LPS administrado no 12º DG foi capaz de aumentar a concentração plasmática de TNF- α , quando se comparado ao seu respectivo grupo controle (p=0,0176) sem, no entanto, causar qualquer outra alteração nas demais citocinas analisadas. Em contraste, não observamos qualquer alteração na concentração das citocinas pró-inflamatórias no 20º DG

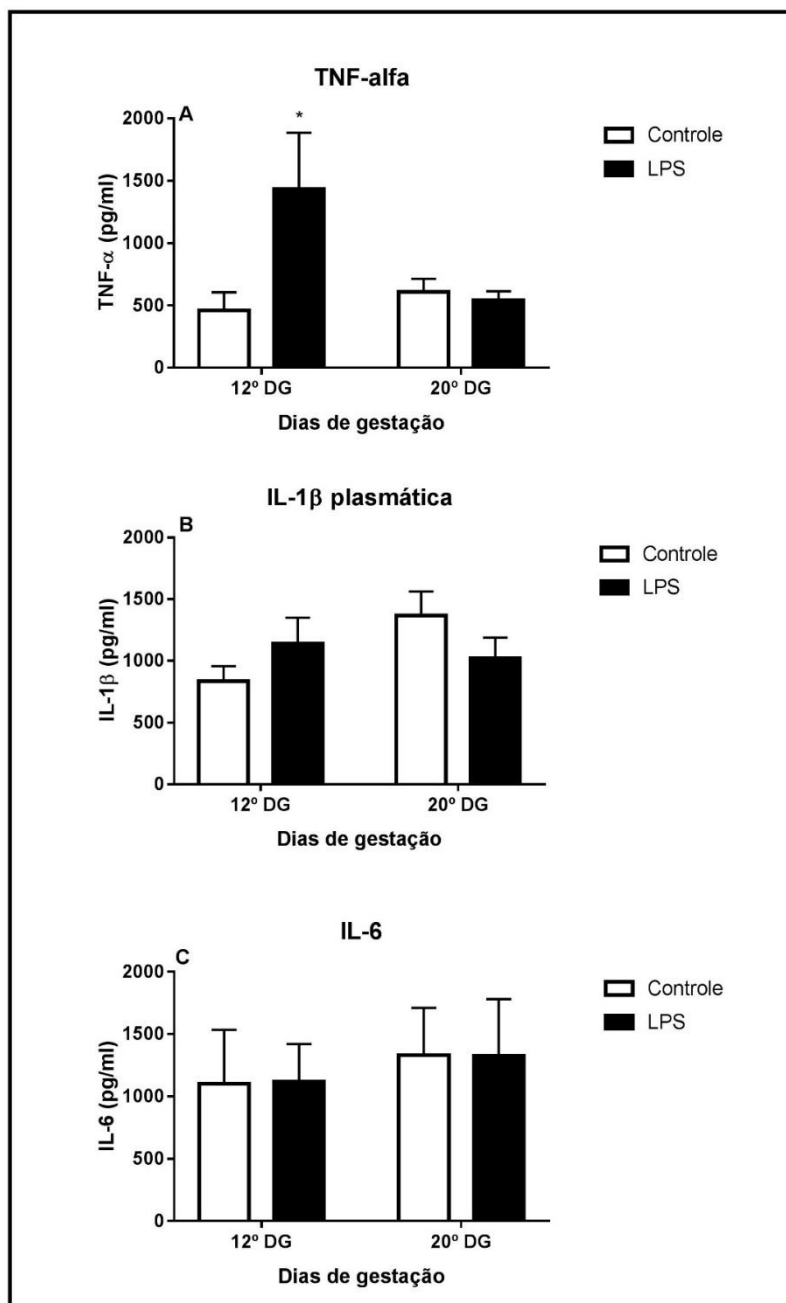
Os valores obtidos quanto à dosagem de citocinas no plasma de ratas prenhes tanto no 12DG quanto no 20DG encontram-se dispostos na Figura 16 com sua respectiva análise estatística disposta na Tabela 11, a seguir.

Tabela.11 - Análise de variância de duas vias sob a concentração plasmática de citocinas após 2 horas de administração do LPS ou salina em ratas prenhes no 12º DG e 20º DG

	Fator Tratamento	Fator Dias de gestação	Interação
TNF-α	F (1, 35) = 4,671; P=0,0376	F (1, 35) = 3,145; P=0,0848	F (1, 35) = 6,20; P=0,0176
IL-1β	F (1, 36) = 0,0128; P=0,9103	F (1, 36) = 1,306; P=0,2607	F (1, 36) = 3,28; P=0,0784
IL-6	F (1, 35) = 0,00034; P=0,985	F (1, 35) = 0,2787; P=0,6009	F (1, 35) = 0,00078; P=0,977

Fonte: Do autor.

Figura 16. Efeito do desafio imunológico através da administração de LPS (200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) em ratas prenhes no 12^o DG e 20^oDG sobre a concentração plasmática de citocinas



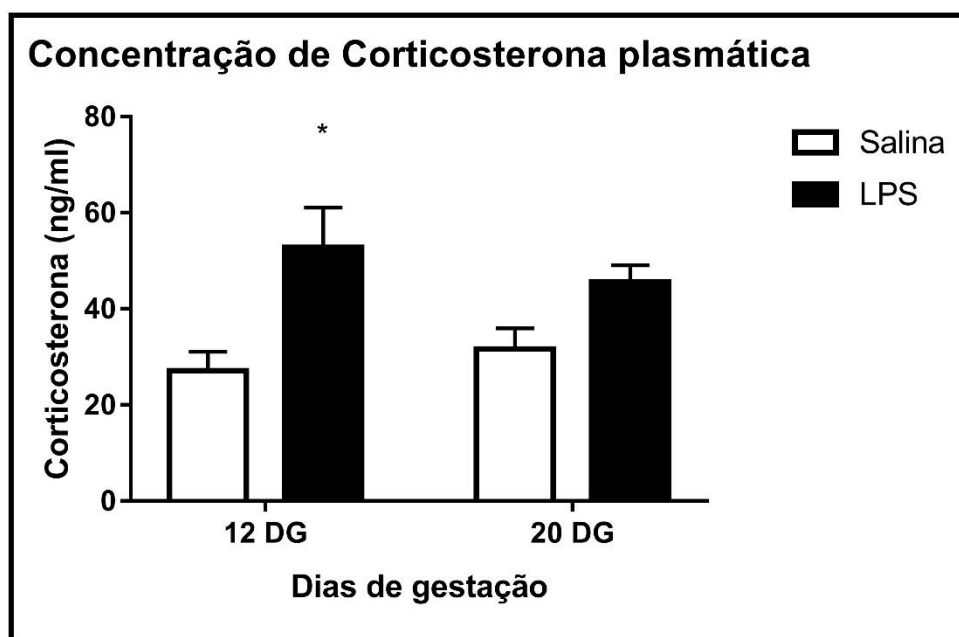
Fonte: do autor

Nota: Dados apresentados com média \pm erro padrão da média (EPM) da dosagem de citocinas plasmáticas para TNF- α , IL-1 β e IL-6. (*) refere-se à diferença estatística onde $p < 0.05$ quando comparado ao respectivo grupo controle. N = 12 animais por grupo.

6.8 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA

Após coleta e obtenção do plasma e extração do mesmo, os níveis plasmáticos de corticosterona de animais prenhes submetidos ao desafio imunológico com LPS no 12º DG e 20º DG foram mensurados através da técnica de radioimunoensaio. Os dados obtidos ao realizar tal técnica encontram-se na Figura 17.

Figura 17 Efeito do LPS administrado em ratas prenhes no 12ºDG e 20ºDG sob a concentração plasmática de corticosterona analisada após 2 horas os tratamentos



Fonte: do autor

Nota: Dados apresentados com média \pm erro padrão da média (EPM) da dosagem de corticosterona plasmática após 2 horas o tratamento. (*) refere-se à diferença estatística onde $p < 0.05$ quando comparado ao respectivo grupo controle. N = 12 animais por grupo

A análise estatística referente à concentração plasmática de corticosterona estão apresentados na tabela 12.

É possível observar que o tratamento com LPS no 12ºDG aumentou a concentração plasmática de corticosterona mensurada após 2 horas à aplicação da endotoxina. Não foram encontradas alterações no 20ºDG.

Tabela.12. Análise de variância Two-way sobre a concentração plasmática de corticosterona após 2 horas de aplicação do LPS ou salina em animais prenhes no 12ºDG ou 20º DG

	Fator Tratamento	Fator Dias de gestação	Interação
Concentração de Corticosterona	F (1, 30) = 15,13; P=0,0005	F (1, 30) = 0,07284; P=0,789	F (1, 30) = 1,32; P=0,258

Fonte: Do autor.

6.9 WESTERN BLOT

Em relação à mensuração proteica de IBA-1 e GFAP do hipotálamo de animais prenhes submetidos à endotoxemia, os dados obtidos por meio da técnica de Western Blot encontram-se dispostos na Figura 18.

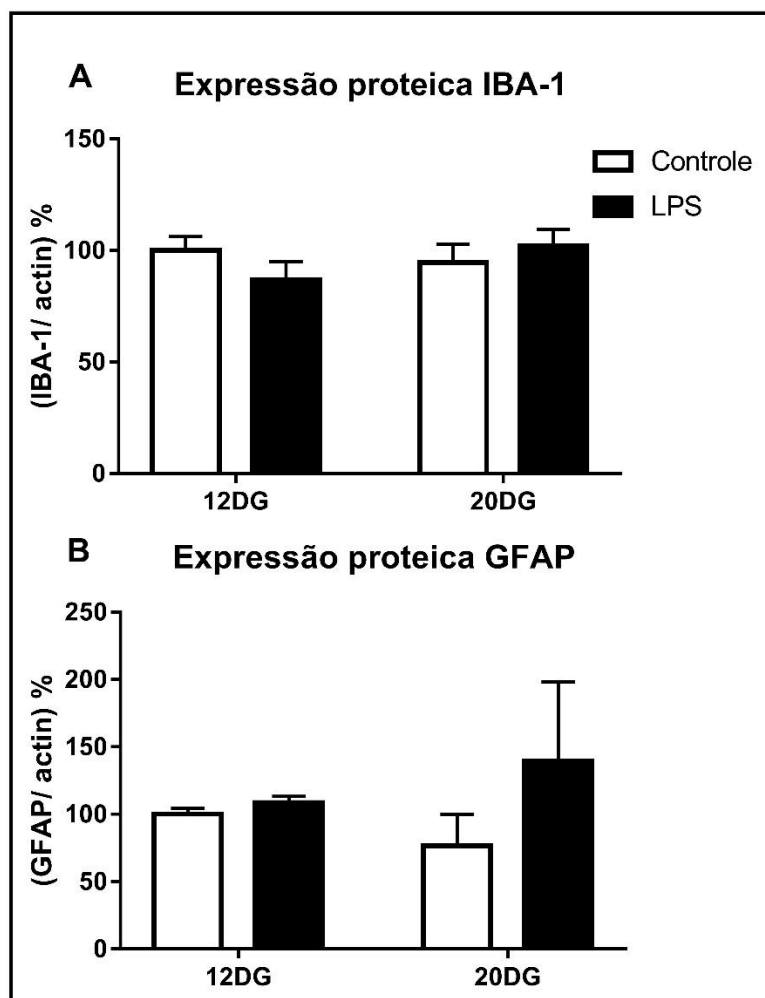
Já a análise estatística empregada nos dados obtidos quanto à mensuração proteica encontram-se dispostos na Tabela 13.

Por meio da execução dos testes estatísticos é possível concluir que o tratamento com LPS não foi capaz de alterar o nível de expressão de proteínas em qualquer um dia dos de gestação analisados no hipotálamo das ratas prenhes.

Tabela.13 - Análise de variância Two-way seguido do pós teste de Tukey sobre a quantidade de proteínas no hipotálamo de ratas prenhes após 2 horas a administração do LPS no 12ºDG ou 20º DG

	Fator Tratamento	Fator Dias de gestação	Interação
IBA-1	F (1, 16) = 0,149; P=0,7042	F (1, 16) = 0,433; P=0,5196	F (1, 16) = 1,901; P=0,1870
GFAP	F (1, 12) = 1,27; P=0,2816	F (1, 12) = 0,013; P=0,9085	F (1, 12) = 0,7311; P=0,4093

Figura 18. Efeito da administração do LPS sobre a quantidade de proteínas (IBA-1 e GFAP) no hipotálamo de fêmeas prenhes



Fonte: do autor

Nota: Dados apresentados com média \pm erro padrão da média (EPM) da quantidade de proteínas no hipotálamo de fêmeas prenhes após 2 horas o tratamento com LPS. A- Quantidade de IBA-1 em diferentes dias de gestação após 2 horas da aplicação do LPS. B- Quantidade da proteína GFAP no hipotálamo de ratas prenhes após 2 horas o tratamento com LPS. (*) refere-se à diferença estatística onde $p < 0.05$ quando comparado ao respectivo grupo controle. N = 5 animais por grupo

7 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a endotoxemia durante o período gestacional de ratas avaliando o comportamento doentio e a responsividade mediante ao estresse imunológico. Para isso, empregou-se diferentes testes comportamentais tidos como clássicos e padrão-ouro a fim de verificarmos, de fato, o comportamento doentio. Para uma análise fidedigna da gestação como um todo, optou-se por trabalhar com diferentes dias de gestação, sendo estes: 6º, 9º, 12º, 15º, 18º e 20º de gestação.

Os testes comportamentais empregados foram: teste do campo aberto, teste da ingestão alimentar, teste de interação social e teste de preferência à sacarose.

7.1 CAMPO ABERTO

O presente estudo demonstrou que a aplicação de LPS é capaz de reduzir a distância total percorrida nos animais prenhes no 6º dia de gestação. A indução da endotoxemia através da administração do LPS provocou ainda aumento no tempo de imobilidade em animais prenhes no 9º DG. Já no 12º dia de gestação, transcorridas 2 horas a aplicação do LPS, os animais apresentaram diminuição da distância percorrida além de apresentarem aumento no tempo de imobilidade quando estes animais foram expostos ao teste do campo aberto.

Nosso estudo ainda apresenta que os animais no 15º dia de gestação, ao receberam LPS na dose de 200 µg/kg, apresentam diminuição na distância percorrida com concomitante aumento no tempo de imobilidade no campo aberto.

Com base nos resultados apresentados, pode-se afirmar que os animais prenhes no 12º DG e no 15º DG apresentaram uma queda na capacidade exploratória/locomotora sendo um quadro clássico envolvido nos sintomas do comportamento doentio. Destaca-se que os animais prenhes no 12ºDG apresentaram queda acentuada na capacidade exploratória/locomotora, sendo o dia gestacional mais susceptível à endotoxemia por meio da aplicação do LPS.

Através da realização do teste do campo aberto e sua análise, é possível mensurar a atividade locomotora dos ratos expostos ao referido teste, bem como analisar também o comportamento preditivo de ansiedade ou ainda o efeito anti-tigmotático (PRUT; BELZUNG 2003; VILELA; SONCINI; GIUSTI-PAIVA, 2009). Sabe-se que os roedores tendem a preferir a periferia ao centro do aparelho quando expostos pela primeira vez ao campo aberto (CAROLA et al, 2002; LISTER, 1990; PRUT; BELZUNG, 2003). A locomoção normalmente é medida pelo número de linhas cruzadas pelo animal, tempo para realizar o primeiro cruzamento e também verificando o tempo de permanência na periferia e no centro (LACERDA; 2006). A locomoção pode ser averiguada ainda pela mensuração da distância percorrida durante a exposição ao aparato. Pode ser inferida também o tempo de imobilidade sendo um parâmetro relacionado à capacidade locomotora, pois se o animal apresentou aumento no tempo de imobilidade quando exposto no campo aberto, deixou de se locomover e explorar a arena.

O tratamento com LPS foi capaz de reduzir a exploração dos animais no campo aberto em todos os dias de gestação, exceto no 20º dia de gestação, uma vez que diminuiu a distância total percorrida. Nossos dados convergem com os demais dados já descritos na literatura científica ao afirmar a redução da locomoção após administração do LPS, verificado após a execução do teste do campo aberto, sendo que esta redução da atividade locomotora está associada ao comportamento doentio, um dos sintomas cardiais (SONCINI et al, 2012).

Orlandi e colaboradores utilizando LPS, porém na dose de 1000 µg/kg, também encontraram redução da exploração mediante à exposição dos animais ao teste do campo aberto. Além disso, o trabalho Swiergiel e Dunn (2007) encontraram resultados semelhantes no que concerne a redução da capacidade exploratória e locomotora dos animais submetidos à endotoxemia. No entanto, os autores utilizaram camundongos como modelo experimental e o LPS foi aplicado em doses de 1 e 5 µg/ camundongo.

Sabe-se que a locomoção na parte central do aparato de campo aberto está relacionada ao medo. No entanto, a locomoção na parte periférica está relacionada com a atividade locomotora de maneira geral (BELZUNG; GRIEBEL, 2001; PRUT; BELZUNG, 2003). Estudos de Swiergiel e Dunn (2007) e Otterness et al (1988) já demonstram que administração de LPS e IL-1 causam diminuição da atividade locomotora em roedores expostos ao campo aberto.

KINOSHITA e colaboradores (2009) demonstraram que camundongos tratados com LPS na dose de 200µg/Kg também apresentaram diminuição na locomoção quando expostos ao campo

aberto. Além disso, o trabalho de RIBEIRO et al (2013) também evidenciou que camundongos tratados com LPS apresentaram redução nos cruzamentos periféricos, centrais além de uma diminuição no número total de cruzamentos.

FONSECA e colaboradores (2015) demonstraram que a aplicação de LPS na dose de 100 µg/kg no 10º da gestação de camundongos foi capaz de diminuir o número de cruzamentos entre os quadrantes centrais, periféricos, além de acentuada redução no número de cruzamentos entre centro e periferia e significativa redução também no número de cruzamentos totais. Nesse sentido, os pesquisadores afirmam que o LPS foi capaz de diminuir, de fato, a capacidade exploratória/locomotora do animal, caracterizando um quadro de comportamento doentio durante a gestação. Além disso, o trabalho de Vieira (2017) demonstrou que ratas prenhas no 16º dia de gestação apresentam capacidade exploratória/locomotora reduzida ao serem submetidos à endotoxemia, porém quando utilizando a dose de 500 µg/kg.

Nosso trabalho, é inédito uma vez que demonstra a ação do LPS ao longo de toda gestação e evidencia, pela primeira vez, a inexistência da queda locomotora ao final da gestação.

A resposta à endotoxemia cursa com letargia e redução de mobilidade, sendo estes consequência da mobilização de citocinas e outros mediadores no SNC (GRANGER et al., 2013; SILVA, 2015). É importante ressaltar que a magnitude da resposta frente a endotoxemia se relaciona com a gravidade da resposta inflamatória sistêmica desencadeada por meio do agente infecciosos (TARR et al, 2012; LAWSON; MCCUSKER; KELLEY, 2013; GRANGER et al, 2013; SILVA, 2015). Portanto, tanto a dose quanto também a forma de administração do patógeno são preponderantes para a manifestação do comportamento doentio e sua magnitude de manifestação.

Diante do exposto e de posse dos resultados obtidos, afirma-se, portanto, que o LPS no 12º DG apresentou queda na capacidade locomotora/exploratório com elevada magnitude desta resposta, sendo este dia, por conseguinte, o dia no qual o comportamento doentio está mais acentuado.

7.2 ANÁLISE DA INGESTÃO ALIMENTAR

O presente estudo demonstrou que o LPS provoca redução da ingestão alimentar em todos os dias de gestação, com exceção ao 20º dia de gestação, após 24 horas da administração da droga. Ademais, foi demonstrado também que no 15º dia de gestação, no tempo de 6 horas, há significativa redução na ingestão alimentar, quando comparado ao grupo controle.

A diminuição da ingestão alimentar caracteriza um quadro de anorexia, também característico como um dos sintomas do comportamento doentio. O LPS é capaz de induzir a diminuição do comportamento de ingestão causando anorexia, sendo um dos efeitos mais marcantes da resposta de fase aguda do LPS (KOPF et al, 2011). A diminuição da ingestão alimentar devido à aplicação de LPS é clássica, sendo o efeito anorexígeno tão intenso que até mesmo o jejum por 39h e 30 min era comprometido pelo tratamento com LPS (GAYLE et al, 1999).

Já está elucidado na literatura científica que a anorexia induzida por meio da inflação é dependente de prostaglandina (PG), uma vez que estudos já demonstraram a melhoria da ingestão alimentar após a administração de inibidores de ciclooxigenase (COX) (BAILE et al, 1981; LUGARINI et al, 2002; SWIERGIEL; DUNN, 2002; NILSSON et al, 2017). No entanto, é importante ressaltar que a origem celular das prostaglandinas, que induzem a anorexia, ainda não foi totalmente identificada (NILSSON et al, 2017).

Pesquisas têm demonstrado que tanto a inibição farmacológica quanto a deleção genética da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2), mas não da COX-1, atenua a anorexia induzida pelo LPS. Nesse ponto, é importante destacar que a COX-2 não está envolvida apenas na mediação da anorexia após a endotoxemia, sendo que esta referida enzima é importante também para a elevação do *setpoint* termorregulatório e, conseqüentemente, da febre. Porém, deve-se atentar que há rotas distintas pelas quais as prostaglandinas promovem os efeitos da anorexia e também da febre. Prova disso é que a deleção gênica de COX-2 seletivamente em células endoteliais do cérebro não foi capaz de atenuar ou inibir a anorexia frente à administração de LPS periféricamente na dose de 10 µg/Kg, embora a febre tenha sido atenuada. No entanto, a injeção intracerebroventricular de um inibidor da COX reduziu drasticamente a anorexia após a exposição do LPS. Ou seja, embora tanto as prostaglandinas e a COX estejam envolvidas com febre e anorexia, as rotas são diferentes e a fonte celular que medeiam esses processos são importantes para a geração das respostas decorrente da endotoxemia.

É digno de nota, também, que a deleção de COX-2 seletivamente em células mieloides ou em células endoteliais e neurais não teve qualquer efeito sobre a anorexia induzida por LPS. A COX-2 em células mieloides e neurais foi dispensável para a resposta de febre em animais que receberam LPS. No entanto, a deleção em células mieloides do gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (MyD88), o qual é uma proteína adaptadora para Toll Like e sinalização do receptor de interleucina-1, inibe completamente a anorexia induzida por LPS (RUUD et al, 2013). Nesse sentido, Nilsson e colaboradores demonstram que a produção de COX-2 em células neurais como neurônios, astrócitos e oligodendrócitos não é fundamental para a anorexia induzida pelo LPS.

Nesse sentido, quadros como a falta de apetite, a perda de peso corporal e a diminuição da ingestão alimentar se manifestam de maneira evidente durante a resposta frente à agentes infecciosos, como o LPS (DE PAIVA et al, 2010). O controle da ingestão alimentar é exercido através de várias regiões do sistema nervoso, como o núcleo arqueado, o hipotálamo lateral e núcleos da rafe, regiões importantes uma vez que integram sinais do estado energético e ingestão calórica (DHILLO, 2007; SCHWARTZ et al, 2000)

Portanto, o presente estudo apresenta dados que corroboram com a literatura científica ao demonstrar que o LPS é capaz de diminuir a ingestão alimentar (SILVA; GIUSTI-PAIVA, 2015). Exceto no 20º dia de gestação, o LPS promoveu anorexia. Pode-se, portanto, afirmar que no 20º dia de gestação o LPS não provocou nenhuma resposta na ingestão alimentar dos animais.

7.3 TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL

O presente estudo demonstrou que a endotoxemia é capaz de reduzir o tempo de interação social em animais prenhes no 12º dia de gestação após 2 horas a aplicação do LPS.

Nossos dados vão de encontro com a literatura científica, uma vez que trabalhos como de TOWNSEND e colaboradores (2014) evidenciaram a redução na interação social após 2 horas a aplicação do LPS, utilizando-se, porém, ratos em diferentes idades. Nossos dados diferenciam pelo fato de utilizarmos ratas prenhes em diferentes períodos gestacionais, evidenciando um ineditismo

no presente estudo, verificando que em torno da metade da gestação há uma queda da sociabilidade dos animais frente à endotoxemia por meio do LPS.

O teste de interação social foi inicialmente descrito por File e Hyde (1978) com finalidade para avaliação da ansiedade. Porém, o teste é utilizado também para o estudo do comportamento doentio. O teste consiste em inserir um animal considerado como “intruso” ao animal teste chamado de “residente”, o qual é uma fêmea prenha que fora habituada no apartado por 3 dias antes da execução do teste. Ao proceder-se o teste, comportamentos próprios da espécie são identificados no animal tido como “residente”, teste este que consiste em confrontar o animal a ser avaliado com outro desconhecido da mesma espécie (“intruso”), porém menor. Os comportamentos próprios identificados podem ser de limpar, cheirar, morder, imitar, explorar a região anogenital, seguir o visitante ou colocar as patas dianteiras sobre ele, o que caracteriza a monta (COHN; DE SÁ-ROCHA, 2006; GRANT; MACKINTOSH, 1963).

Os comportamentos observados pelo animal “residente” no teste de interação social foram verificados analisando os vídeos, mensurando o tempo de interação entre o residente e o intruso (DER-AVAKIAN; MARKOU, 2014). Foi considerada como sendo exploração anogenital quando o animal residente cheirava a região perianal do animal intruso. Além disso, foi considerado um parâmetro de interação social também quando o animal residente cheirava a região do focinho e regiões laterais à cabeça do animal intruso.

Estudos na literatura afirmam que o LPS é capaz de reduzir a interação social entre roedores. Desse modo, o tempo despendido na interação do animal submetido à endotoxemia frente à exposição com outro animal é tido como uma medida do comportamento doentio tanto em ratos quanto também em camundongos (ARAKAWA; BLANDINO; DEAK, 2009; FISHKIN; WINSLOW, 1997; JÚNIOR, 2015). Os parâmetros comportamentais observados no teste de interação social podem ser: sniffing (quando o animal residente cheira qualquer parte do animal considerado intruso), grooming (tempo gasto quando o animal teste lambe outro animal) e following (tempo despendido do animal residente seguindo o animal intruso) (OVERSTREET; KNAPP; BREESE, 2002; MANDUCA et. al., 2015; BATISTA, 2018)

Nesse sentido, Townsend e colaboradores (2014) demonstraram que a injeção intraperitoneal de LPS na dose de 0,33 mg/Kg tanto em camundongos adultos quanto idosos provocou a redução das interações sociais quando testados após 2 horas das aplicações. De modo

similar, o LPS administrado na dose de 15 µg/Kg por via i.p. também foi capaz de reduzir o tempo gasto nas interações sociais entre camundongos (FISHKIN; WINSLOW, 1997).

A citocina IL-1β é apontada por diversos estudos como sendo a principal mediadora na redução das interações sociais observadas entre roedores após a administração do LPS, uma vez que a administração de antagonistas de receptores de IL-1 (IL-1 ra) foram capazes de atenuar o efeito depressivo induzido pelo LPS na exploração e interação social (BLUTHÉ; DANTZER; KELLEY; 1992; ARAKAWA; BLANDINO; DEAK, 2009; BATISTA, 2018).

No entanto, é importante ressaltar que o aumento da interação social sem o aumento da atividade locomotora, tal como nós observamos em animais prenhes controle (os quais receberam apenas salina) no 12º dia de gestação, caracteriza como sendo um efeito ansiolítico enquanto que a diminuição da interação social também pode ser considerado como efeito ansiogênico (FILE; SETH, 2003). No comportamento doentio, como um todo, estas duas respostas podem ser observadas, já que Hennessy e colaboradores (2014) afirmaram que a diminuição da interação social não é um comportamento invariável nesta situação (ORLANDI, 2015).

Sendo assim, por meio da execução do teste de interação social, pode-se afirmar que o LPS administrado no 12ºDG provocou significativa redução na interação social, demonstrando que neste ponto o animal prenhe encontra-se hiperresponsivo ao desafio imunológico, acentuando o quadro de comportamento doentio.

7.4 PREFERÊNCIA À SACAROSE

Com exceção aos grupos de 6º dia de gestação e 20º dia de gestação, o presente estudo afirma que o tratamento com LPS foi capaz de diminuir a preferência dos animais por sacarose em todos os demais grupos experimentais. Diante do resultado exposto, a endotoxemia durante a gestação provoca um quadro de anedonia devido a hipoingestão de sacarose.

Nossos dados corroboram com a literatura científica, uma vez que trabalhos anteriores como de SONCINI et. al (2012) evidenciaram que animais em estado doentio exibem uma menor preferência à sacarose 2 e 24h após a administração de LPS.

A anedonia ou a falta de interesse em estímulos que outrora eram agradáveis é bastante estudada por pesquisadores da área. Em situações como a infecção, roedores podem exibir um estado anedônico.

O termo anedonia foi cunhado pela primeira vez pelo psicólogo francês Théodule-Armand Ribot em 1896 para designar uma completa ausência de prazer. Atualmente, o conceito de anedonia refere-se a uma incapacidade e/ou vontade reduzida para realização de tarefas que anteriormente eram consideradas prazerosas (D'HAENEN, 1996). Há alguns métodos propícios e válidos na ciência para averiguar a anedonia como a motivação para a alimentação e o teste de preferência à sacarose. Animais anedônicos reduzem tanto a ingestão de alimento quanto a preferência à sacarose (MARTYNHAK et al., 2011; SONCINI et al., 2012).

O modelo de preferência à sacarose é tido como clássico e válido, uma vez que os roedores apresentem preferência por bebidas adoçadas. A busca pelo estímulo agradável se deve não apenas por regiões cerebrais envolvidas no sistema de recompensa, mas também por regiões que controlam a ingestão alimentar e o controle da homeostase energética, como o hipotálamo e o tronco cerebral (AHIMA et al, 2008; DE ARAUJO et al, 2008; PIZZAGALLI et al, 2009). Pode-se caracterizar a anedonia como sendo também a falta do prazer somada à incapacidade aparente de percebê-lo ou apreciá-lo, segundo definição de KENT e colaboradores (1992).

Nossos dados convergem com a literatura, uma vez que experimentos como os de Larson em 2006 utilizando LPS e também IL-1 β observou uma significativa redução no consumo de sacarose. No entanto, nossos dados são inéditos uma vez que utilizamos ratas prenhes frente à exposição ao LPS para averiguar o possível estado anedônico. Diante disso, observamos que nos dias 6 e 20 de gestação, não há diminuição significativa da preferência à sacarose, embora quando analisado de maneira isolada o 6º dia de gestação apresenta diferença estatística de preferência à sacarose em animais LPS comparado aos animais controle.

Em roedores, tanto a IL-1 quanto a administração da endotoxina promovem também a diminuição da exploração em ambientes novos, além da diminuição do comportamento social (LARSON et al, 2001), demonstrando, desse modo, que estímulos que ativam o sistema imunológico são capazes de promover a anedonia em roedores (DELLAGIOIA; HANNESTAD, 2010). Animais pré-tratados com endotoxina apresentam uma menor atividade neuronal em regiões cerebrais envolvidas no sistema de recompensa quando estes animais eram apresentados a ambientes novos (STONE et al, 2006). Em nosso estudo, o consumo tanto de água quanto de

sacarose foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final das substâncias oferecidas (WILLNER et al, 1991; PESTANA, 2010).

As citocinas pró-inflamatórias, quando no SNC, são responsáveis pelos comportamento semelhantes à depressão e também por quadros de anorexia, isolamento social e pela anedonia (KELLEY et al, 2003; COMBRINCK; PERRY; CUNNINGHAM, 2002; ABRAHAM et al, 2006; GODBOUT et al, 2005; HUANG et al, 2007) as quais alteram a plasticidade sináptica em animais (TANCREDI et al, 1992; MURRAY; LYNCH, 1998). A resposta inflamatória de citocinas de forma exacerbada no cérebro está associada a uma variedade de complicações, como a disfunção cognitiva (HEYSER et al, 1997; VALLIERES et al, 2002, BARRIENTOS et al, 2006; GODBOUT et al, 2005; MELLO, 2012).

Portanto, juntamente com dados obtidos a partir da realização do teste do campo aberto no qual foi observado uma diminuição na capacidade exploratória ao expor o animal num novo ambiente, além da observada redução da ingestão alimentar em ratas prenhas após exposição ao LPS, percebemos agora uma diminuição na preferência à sacarose, em decorrência a aplicação do LPS. Mais ainda, procedeu a execução do teste de interação social a fim de verificar o estímulo ao comportamento social de animais prenhas com LPS, a fim de caracterizar plenamente o comportamento doentio em animais prenhas.

Deste modo, coletivamente, nossos dados permitem afirmam que o LPS foi capaz de evocar o comportamento doentio em animais prenhas nos dias de gestação 6, 9, 12, 15 e 18, uma vez que estes apresentaram diferenças quanto à capacidade exploratória e locomotora quando testados no campo aberto, além de apresentarem também um comportamento anoréxico e um comportamento semelhante à anedonia quando submetidos ao teste de preferência à sacarose. Porém, apenas os animais prenhas no 12º dia de gestação apresentaram diminuição na interação social quando confrontados com outra rata. Diante de tais achados, pode-se afirmar que o comportamento doentio é mais exacerbado no 12º dia de gestação, já que apresenta alterações significativas em todos os testes comportamentais, sendo este o ponto de mais resposta ao LPS ao longo da gestação. No entanto, é importante observar que o 20º dia de gestação não apresentou diferença comportamental em nenhum dos testes realizados. Os animais prenhas pertencentes ao 20º dia de gestação, quando submetidos ao desafio imunológico com LPS, não apresentaram alterações quanto à mobilidade, ingestão alimentar, anedonia e interação social. Portanto, no 20º dia de gestação os animais estão hiporresponsivos ao LPS.

O comportamento doentio, exceto no 20º dia de gestação, foi observado em ratas prenhes no presente estudo, sendo este, o primeiro estudo a observar o *sickness behavior* ao longo de toda gestação, caracterizando, portanto, como um estudo inovador e fundamental para a compreensão da interferência da gestação e suas variações hormonais sobre os parâmetros comportamentais.

Estudos indicam que o comportamento doentio está relacionado com uma estratégia motivacional para que o organismo lide com a doença (KINOSHITA, 2007). Segundo Bolles (1974) a motivação pode ser entendida como um estado central que reorganiza a percepção e a ação. A motivação permite que o indivíduo selecione a melhor estratégia em prol da sobrevivência, sendo a estratégia passível de mudanças de acordo com a situação enfrentada pelo organismo, ainda segundo Bolles.

Portanto, o comportamento doentio pode ser entendido a partir de duas óticas diferentes: uma que compreende o comportamento doentio como resultado de uma debilitação e fraqueza física resultantes da doença que os acomete, fazendo com que o organismo apresente comportamentos alterados uma vez que a grande maioria dos recursos está envolvida com a luta contra o patógeno. Outra perspectiva de se analisar o comportamento doentio é a partir da ótica motivacional, observando o comportamento de se estar doente como uma expressão estratégica altamente organizada que se torna crítica para a sobrevivência do organismo frente esta situação de vida ou morte (DANTZER, 2001).

A perspectiva motivacional surgiu muito depois da definição e caracterização acerca do comportamento doentio, tanto é que um dos precursores do estudo sobre o comportamento de se estar doente, Hart, não abordou esta visão. Para ele, o comportamento doentio evoluiu a partir de uma situação de tudo ou nada, onde o animal foi obrigado a apresentar tais respostas mediante ao iminente risco de vida (COHN, 2003). Segundo Aubert, a maioria dos experimentos sobre o comportamento doentio utiliza a temática comportamental apenas como uma variável para se estudar os mecanismos envolvidos no processo da doença em si. Sendo assim, o comportamento doentio não recebeu a atenção merecida, uma vez que é necessário que o comportamento doentio seja visto como uma variável independente (AUBERT, 1999; COHN, 2003).

Portanto, o comportamento doentio não é somente uma resposta evolutiva adaptativa, mas também uma expressão hierárquica e organizada a qual depende das mudanças contextuais em que o animal se encontra (COHN, 2003). O animal, mesmo estando doente, é capaz de perceber e

responder a estímulos ambientais. Caso esses estímulos sejam mais prioritários, o animal pode interromper o comportamento doentio a fim de responder tais estímulos (AUBERT, 1999).

Portanto, pode-se afirmar que a aplicação via i.p de LPS nos animais prenhes provocou uma resposta acentuada no 12º DG enquanto que animais no período final da gestação 20º DG apresentaram hiporresponsividade frente ao estresse imunológico. A escolha pela administração intraperitoneal se deu pelo fato de que esta pode influenciar tanto na comunicação neuroimune quanto também na questão de termorregulação (BASSI et al, 2012), além também de induzir importantes mudanças nos quadros comportamentais típicos como hipofagia, redução do comportamento social e também sexual, além de redução na preferência à sacarose, mudanças comportamentais estas que foram demonstradas neste presente trabalho. É sabido que por meio da aplicação via i.p. o LPS pode entrar rapidamente na corrente sanguínea (MUNFORD, 2010). No entanto, a capacidade da aplicação do LPS via i.p. em alterar parâmetros térmicos, sobretudo em animais prenhes, merece ser analisada profundamente, e isso propusemos no presente trabalho.

Diante da importante observação de que ao longo da gestação os animais prenhes respondem ao LPS de maneiras diferentes, caracterizando o 12º dia de gestação como ponto de hiperresponsividade e o 20º dia de gestação como ponto de hiporresponsividade, é necessário elucidar os mecanismos que promovem essa resposta diferencial. À partir de tais constatações, o 12º dia de gestação e o 20º dia de gestação foram escolhidos para estudos quanto à resposta térmica diante da aplicação do LPS, além de observar também respostas quanto à ativação neuronal, produção de citocinas e produção de corticosterona, além da quantificação de proteínas.

7.5 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA

De posse dos resultados obtidos, nosso estudo foi capaz de demonstrar uma resposta bifásica dos animais prenhes submetidos a administração do LPS no 12º dia de gestação, havendo, inicialmente, um hipotermia nas primeiras duas horas pós-LPS, seguida da elevação da temperatura e hipertermia nos momentos posteriores. No entanto, a resposta de variação da temperatura no 20º dia de gestação foi diferente, uma vez que não foi encontrada tal resposta bifásica e nem geração de um estado hipertérmico e/ou febril decorrente à exposição ao LPS.

No 12º dia de gestação foi verificado uma hipotermia inicial seguida de febre após 2 horas, demonstrando um efeito decorrente do LPS, que converge com os dados comportamentais neste dia de gestação, uma vez que foi o dia que mais apresentou debilidades comportamentais.

A febre é uma consequência do balanço de pirógenos e criógenos endógenos ao mudar o “*set point*” hipotalâmico de termorregulação. Com essa alteração, o animal passa a sentir frio em ambientes onde isso não ocorria anteriormente. Um novo equilíbrio térmico é conseguido à medida que o animal apresente alterações comportamentais e fisiológicas que produzem e conservem mais calor para o organismo. Por isso ocorrem as alterações acima citadas (COHN, 2003; HART, 1988). Além disso, estudos afirmam que a febre é desencadeada pelo aumento regulado da temperatura corporal, aumento este que se sobrepõe sobre as flutuações diárias normais (MACKOWIAK, 2005). A regulação da resposta febril depende de um balanço entre substâncias pirogênicas (podendo ser endógenas ou exógenas) e antipiréticas ou também chamadas de criógenos (LEON, 2002; TATRO, 2000). Os pirógenos são substâncias capazes de aumentar a temperatura. Os pirógenos exógenos são substâncias produzidas fora do hospedeiro e incluem microrganismos podendo ser inteiros ou partes destes microrganismos. Um dos pirógenos exógenos mais conhecidos na ciência e amplamente utilizado é o LPS. Os pirógenos endógenos, por sua vez, são citocinas pirogênicas podendo incluir a IL-1, IL-6 e também TNF- α , produzidas pelas células imunes como macrófagos e neutrófilos do hospedeiro, em resposta a infecção (MACKOWIAK, 2005). Tanto as substâncias pirógenas endógenas quanto exógenas são potentes indutores da resposta febril (ROTH;SOUZA, 2001). As substâncias criógenas, por sua vez, incluem citocinas tais como a IL-10, e também outras substâncias como o CRH (LEON, 2002; TATRO, 2000). Tais substâncias exercem seus efeitos por meio da inibição da síntese de citocinas pirogênicas ou também por meio do aumento da perda de calor (MACKOWIAK, 2005). A elevação e a duração da resposta febril depende de um fino equilíbrio entre os pirógenos e os criógenos, sendo que a elevação das substâncias pirogênicas induz a febre enquanto que os criógenos se opõem a esta resposta impedindo a excessiva elevação da temperatura corporal (OGOINA, 2011).

Segundo Hart, a febre associada com as alterações comportamentais características do comportamento doentio conferem um valor adaptativo e favorecem a recuperação do animal (HART, 1988; COHN, 2003; KINOSHITA, 2007). Hart (1988) afirma que embora a febre apresente um alto gasto metabólico, seu desenvolvimento foi fundamental para a sobrevivência dos animais. A febre promove a destruição de bactérias por neutrófilos, aumenta a síntese de

anticorpos e a produção de anticorpos além de diminuir a produção de agentes termossensíveis (HART, 1988; COHN, 2003). Blatteis (2006) afirma ainda que a febre aumenta a mobilidade e a migração de neutrófilos, aumenta a produção de radicais livres de oxigênio por fagócitos, aumenta a produção de interferon (IFN), aumenta a atividade de linfócitos do tipo Th-1 e outros (KINOSHITA, 2007).

Além disso, Hart (1988) propõe que comportamentos associados à doença são fundamentais para que o organismo desenvolva quadros de elevação fisiológica da temperatura. Por exemplo, a anorexia diminui a ingestão, além de diminuir a motivação do animal em procurar alimento e evitando, desse modo, a exposição do animal, preservando a temperatura e ajudando a debelar-se contra a infecção. Além disso, a redução do comportamento de auto limpeza reduz a exposição corpórea do animal além de diminuir o gasto de saliva e a perda de calor proporcionado pela evaporação da mesma (HART, 1988; COHN, 2003; KINOSHITA, 2007). Nesse sentido, há ainda a ocorrência de piloereção a fim de aumentar a camada de ar servindo como isolante térmico sobre a superfície do corpo, o encurvamento do corpo para reduzir a superfície corporal exposta ao ambiente e a busca por parte do animal por ambientes mais quentes (HART, 1988; COHN, 2003).

Em relação à ação do LPS provocando aumento da temperatura, sabe-se que a endotoxina de origem bacteriana promove seus efeitos através de mecanismos neurais e humorais. Na via neural, a ação ocorre por meio dos nervos sensoriais cutâneo e também através do nervo vago. Essa via é caracterizada como sendo de resposta febril rápida (ROTH; SOUZA, 2001; HOPKINS, 2007). O LPS estimula o sistema complemento num curto intervalo de tempo, ativando as células Kupfer do fígado, as quais passam a produzir PGE₂ além de outros pirógenos endógenos. Estes alcançaram o ramo hepático do nervo vago, ativando-o. Os sinais aferentes são levados, então, ao NTS onde o sinal é transmitido para a POA através de um feixe noradrenérgico, causando aumento da temperatura. Já a via humoral, por sua vez, permite que as citocinas pirogênicas, produzidas pelas células imunológicas frente à ação do LPS, cheguem até regiões encefálicas onde a barreira hemato-encefálica inexistem ou são mais porosas como o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e interagem com receptores localizados em terminais das células da glia, levando a produção de PGE₂. Há de se considerar ainda que a PGE₂ também pode ser produzida por meio do contato das citocinas com receptores presentes na superfície de células endoteliais cerebrais. A

PGE2 então produzida difunde-se pela barreira até alcançar a POA, provocando aumento do *setpoint* termorregulatório (CONTI et al, 2004; BATISTA, 2019).

Ainda a respeito da mudança de temperatura provocada através da administração de LPS, sabe-se que um fator primordial para tais alterações é o estado fisiológico do animal. De acordo com Fewell e colegas, embora a resposta mais comumente encontrada diante da endotoxemia experimental seja a hipertermia, mudanças fisiológicas que ocorrem durante o período gestacional podem alterar o padrão da resposta na temperatura provocando hipotermia (FEWELL et al, 2010). Estes mesmos autores afirmam ainda que durante da gestação, sobretudo próximo do período do parto, há uma mudança significativa em áreas de regulação da temperatura, provocando a hipotensão e perda de calor.

Entretanto, não é possível generalizar afirmando que a aplicação de LPS resulte necessariamente em hipertermia, haja vista que o sorotipo da bactéria gram negativa utilizada é fundamental para o estabelecimento do tipo de resposta termorregulatória podendo ser hipertérmica, seguida ou não de febre ou até mesmo hipotérmica (DOGAN et al,2000).

Corroborando com tal perspectiva, o trabalho de Akarsu e Mamuk (2007) encontrou que a utilização do sorotipo 055:B5 provocou uma resposta hipotérmica inicial na dosagem de 250 µg/kg seguida de um quadro de febre. Entretanto, o sorotipo 0111:B4 provocou uma resposta monofásica mais potente onde foi constada apenas a hipotermia (DOGAN; ATAUGLU; AKARSU, 2000). Ainda dentro dessa temática, estudos indicam que a administração de LPS é capaz de provocar hipotermia seguida ou não de quadros de febre tanto em ratos (NASCIMENTO et al, 2013; FILKINS; DI LUZIO, 1968; UENO et al, 1982), quanto em camundongos (WANG et al, 1997; KOZAK, 1997; PAUL, FRAIFELD, KAPLANSKI, 1999). A respeito da concentração utilizada e da resposta a nível de temperatura, estudos indicam que quando se utilizam concentrações altas, acima de 0.5 mg/kg de LPS, a resposta é predominantemente de hipotermia (DOGAN; ATAUGLU; AKARSU, 2000).

A respeito da resposta hipotérmica encontrada diante da aplicação do LPS, o trabalho de Nascimento e colaboradores (2013) demonstrou que a injeção intraperitoneal de LPS de sorotipo 0127:B8, provocou tanto em fêmeas virgens quanto em fêmeas lactantes, um quadro de hipotermia após 2 horas da aplicação. Resultados similares são encontrados nos trabalhos de Aguila e colaboradores (2006) e Toyama (2012), os quais mostraram também a diminuição da temperatura corpórea após 2 e até 3 horas após o tratamento com LPS.

De acordo com Romanovsky e Szekely (1998), a hipotermia após a administração do LPS é uma maneira adaptativa do organismo se defender contra o desafio imunológico. Nessa perspectiva, Toyama (2012) afirmou que a hipotermia encontrada em fêmeas prenhes que receberam LPS foi resultado de um mecanismo neuroprotetor materno contra isquemia provocada pelo LPS e isso deve-se à ao aumento da concentração de TNF- α em fêmeas prenhes que foram administradas com LPS. Prova disso é que o bloqueio da referida citocina, experimentalmente realizado por meio de anticorpo, foi capaz de reduzir esses efeitos quanto à resposta da temperatura (TOLLNER et al, 2000). Sabe-se ainda que o TNF- α desempenha um papel criogênico endógeno na modulação da resposta febril (LONG et al, 1990, 1992; LEON et al, 1997). Desse modo, pode-se afirmar que o TNF- α medeia a hipotermia através de um papel antipirético que previne o aumento da temperatura a níveis danosos causada pela exposição ao LPS.

A respeito do estado fisiológico do animal, a gestação é tida como uma fase que altera de o balanço entre citocinas pirogênicas e antipiréticas/criogênicas após a exposição de um composto pirogênico exógeno (FOFIE; FEWELL. MOORE, 2005; ASHDOWN et al, 2007). Fewell e colaboradores (2010) demonstraram que a administração de 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de *E. coli* LPS aumentou as concentrações plasmáticas de IL-1 β , IL-6, IL-1ra e TNF- α em ratas não prenhes. Já em ratas prenhes, a administração de LPS, aumento apenas as concentrações plasmáticas de IL-1ra e TNF- α sem alterar os níveis de citocinas pirogênicas, como IL-6 e IL-1 β .

O uso de agentes anti-TNF atenua a diminuição da temperatura provocada a partir da administração de altas dosagens de LPS (TOLLNER et al, 2000). Além disso, estudos demonstram que o pico da concentração plasmática de TNF- α ocorre entre uma ou duas horas após aplicação do LPS (BUENO et al, 1999; PEIRÓ et al, 1999).

Rosa e colaboradores (2003), usando equinos, demonstraram que a aplicação de LPS foi capaz de promover a elevação da temperatura retal e o aumento de TNF- α com concomitante redução da motilidade intestinal entre 1h15min e 6 h após aplicação da endotoxina. Porém, nos animais que foram pré-tratados com dexametasona, um glicocorticoide exógeno, 30 minutos antes da injeção de LPS, houve ausência de febre. De acordo com os autores proponentes do trabalho, a ausência de febre nestes animais pode estar relacionada pela diminuição ou mesmo inibição da produção de prostaglandina e ainda pela inibição da síntese de TNF- α (MORRIS et al, 1991). A dexametasona reduz a transcrição do gene para TNF e também diminui a tradução do RNAm de TNF (BEYAERT; FIERIS, 1998).

Giusti-Paiva e colaboradores (2003), demonstraram a correlação positiva entre o aumento dos níveis de vasopressina e a diminuição da temperatura corporal, trabalhando com ratos machos. Os autores afirmam ainda que a observação da temperatura corporal assume um comportamento bifásico, uma vez que há, nas primeiras duas horas, queda na temperatura corpórea, seguida de elevação da mesma após duas horas com concomitante decaimento dos níveis de vasopressina. Entretanto, outros autores (ROMANOVSKY et al, 1998) demonstraram que a injeção intravenosa de 10 µg/Kg em ratos induziu resposta trifásica, causando posteriormente febre, revelando que o tempo necessário para que a resposta febril seja desencadeada em ratos da linhagem Wistar é de até 300 minutos.

Nossos dados, ao demonstrar que no 12º dia de gestação há alteração drástica da temperatura e não sendo encontrado parâmetros similares no 20º dia de gestação frente à exposição ao LPS evidenciam que no 12º DG há uma hiperresponsividade ao desafio imunológico enquanto que no 20º DG há uma hiporresponsividade, devido à alterações neurais e endócrinas. Para averiguar a ativação de neurônios em áreas relacionadas ao comportamento doentio, procedeu-se ao estudo imunohistoquímico para c-fos em animais prenhes nos dias 12 e 20 de gestação.

7.6 IMUNOHISTOQUÍMICA

Estudos pioneiros executados por Hunt e colaboradores (1987) demonstram que neurônios espinhais de ratos expressavam c-Fos logo após receberem estímulo sensorial. Desde então, essa referida proteína tem sido estudada como parte integrante da resposta nuclear frente à estímulos e induções, como estímulos sensoriais, fatores de crescimento e neurotransmissores, sendo considerada como um marcador da atividade neuronal (CAPUTTO; CARDOZO GIZZI; GIL, 2014).

Porém, é necessário afirmar que a rede neural envolvida no processamento do estresse e de sinalização para regiões consideradas como chave para a resposta ao estresse, como o PVN, são complexas e envolvem um conjunto de regiões e sub-regiões, como o BNST, amígdala e hipocampo. Além disso, tais regiões participam também integrando informações sobre o estressor e regulando respostas do eixo HPA frente ao estresse. (ZIEGLER; HERMAN, 2002; PLANT;

ZELEZNIK, 2015) Neurotransmissores tais como glutamato e GABA são elementos fundamentais para a regulação de neurônios CRH frente ao estresse, porém pouco se entende a respeito dessa regulação da resposta frente ao estresse durante a gestação (HERMAN et al, 2002; PLANT; ZELEZNIK, 2015).

Estudos que mapeiam a expressão da proteína Fos ou RNAm de c-fos como indicativo de ativação neuronal evidenciaram que a indução de fos em regiões como hipocampo e amígdala é semelhante em ratos virgens e prenhes após um estresse agudo (da COSTA et al, 1996; BRUNTON; BALES; RUSSELL, 2012). Porém, ao analisar regiões como SON e PVN notou-se que a resposta é diferencial, uma vez que há diminuição na expressão de fos nestas referidas regiões em períodos finais da gestação (da COSTA et al, 1996; BRUNTON; BALES; RUSSELL, 2012; PLANT; ZELEZNIK, 2015). No entanto, é necessário estudar a respeito da ativação neuronal em fêmeas prenhes em diferentes períodos gestacionais frente a administração ao LPS.

Um estímulo amplamente utilizado para avaliar a ativação neuronal é a administração do LPS, uma vez que sua administração aumenta o número de células positivas para c-fos em diversas regiões do cérebro, como o núcleo paraventricular (PVN), o núcleo pré-optico medial (MPOA) e o núcleo pré-óptico mediano (MnPO) (DU PLESSIS et al, 2006), o núcleo leito da estria terminal (BNST) e também o núcleo central da amígdala (CeA) (DALLAPORTA et al, 2007; HABA et al, 2012), no núcleo supraóptico (SON) e córtex piriforme (CPx) (MA et al, 2014). Nossos dados são similares aos referidos trabalhos, uma vez que a administração do LPS em ratas prenhes no 12º dia de gestação aumentou a expressão de c-Fos em todas as áreas estudadas. No entanto, verificamos também que no 20º dia de gestação não há aumento no número de neurônios positivos para a expressão de c-Fos em nenhuma das áreas estudadas. Portanto, mais uma vez, verifica-se a elevada magnitude da resposta ao LPS no 12º dia de gestação e uma resposta inexpressiva ao LPS dos animais prenhes no 20º dia de gestação.

A administração periférica de LPS induz a ativação neural em diversas regiões encefálicas, como demonstrado em estudos envolvendo camundongos machos adultos que receberam a administração de LPS e apresentaram aumento significativo em áreas como a região dorsomedial, dorso lateral e núcleo pré-optico anterior do hipotálamo, o núcleo do leito da estria terminal, a área postrema, o núcleo do trato solitário e também o núcleo paraventricular do hipotálamo (WANNER; YOSHIDA; KULCHITSKY, 2013; CABRAL, 2016).

Nosso estudo verificou o aumento da expressão de neurônios marcados positivamente para c-Fos em animais prenhes no 12º DG administrados com LPS no BNST, uma pequena área localizada na porção basomedial do cérebro anterior. O BNST faz parte do sistema límbico e atua como centro de retransmissão de sinais neurais relacionados com a modulação comportamental (AVERY et al, 2014; KLAMPFL et al, 2015; ORLANDI, 2015) Esse núcleo é conhecido por ser responsivo diante de situações de estresse, como, por exemplo, o estresse imunológico. Frenois et al (2007) demonstraram um aumento no número de neurônios reativos à c-Fos no BNST em animais que receberam uma alta dosagem (830 µg/Kg por via i.p) de LPS

Já a área pré-óptica mediana é um núcleo hipotalâmico composta por neurônios termossensíveis que recebem aferências térmicas tanto centrais quanto periféricas, importantes para o desenvolvimento da febre diante de situações de inflamação, sendo considerada a principal área termorregulatória do cérebro (BOULANT, 1998; STEINER; BRANCO, 2003). Sabe-se que durante o estabelecimento da resposta inflamatória de fase aguda, como por exemplo, a resposta evocada logo após a administração do LPS, células imunológicas como os macrófagos, fazem aumentar os níveis de PGE2 no plasma. O PGE2, por sua vez, alcançará o SNC, podendo ser por vias diretas ou indiretas, promovendo alterações comportamentais e também térmicas (BLATTEIS, 2006; LI et al, 2006; STEINER et al, 2006). Sabe-se que presença de PGE2 na MPOA, seja aquela oriunda da periferia chegando através do órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), seja aquela produzida centralmente por meio da ativação de COX-2, irá promover um aumento do setpoint termorregulatório, levando, por exemplo, a um aumento da produção de calor através do desacoplamento da cadeia respiratória no tecido adiposo marrom, instalando, desse modo, um estado febril nos animais (BLATTEIS, 2006; JEZEK, 2002; SIMM, 2016).

No presente estudo nós encontramos um aumento de células marcadas positivamente para c-Fos na área MPOA nos animais prenhes que receberam LPS no 12º DG, sendo condizente com os dados da literatura científica, ainda mais quando associamos o aumento de c-Fos com as alterações térmicas encontradas por meio da análise via telemetria no mesmo dia de tratamento. É importante ressaltar que não encontramos diferenças no número de células marcadas positivamente para c-Fos nos animais pertencentes ao 20º dia de gestação.

Já o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o núcleo supraóptico (SON) são núcleo hipotalâmicos envolvidos em diversas funções neuroendócrinas e também comportamentais, como resposta ao estresse e manutenção do comportamento materno (PEREIRA et al, 2015; VAN DE

KAR; BLAIR, 1999). O PVN abriga, na verdade, duas grandes populações de neurônios: os magnocelulares e os parvocelulares. Os neurônios magnocelulares sintetizam vasopressina e ocitocina. Já os neurônios parvocelulares, por sua vez, sintetizam o hormônio liberador de corticotrofina. O SON é composto exclusivamente por neurônios magnocelulares, produtores de ocitocina (PIRNIK; MRAVEC; KISS, 2004; VAN DE KAR; BLAIR, 1999). A ocitocina desempenha papel crucial no parto e também na lactação, sendo estas atuações clássicas e bem elucidadas na literatura. No entanto, estudos atuais demonstram que a ocitocina também está envolvida com a modulação da resposta imunológica, haja vista que células do sistema imune expressam receptores para este determinado hormônio (YANG et al, 2013; ORLANDI, 2015).

Nossos dados demonstraram que os animais prenhes que receberam a administração intraperitoneal de LPS no 12º DG apresentaram um elevado número de células marcadas positivamente para c-Fos tanto no PVN quanto no SON quando comparado aos animais controle. Já no 20ºDG não há qualquer alteração em relação ao número de células que expressam c-Fos comparando-se os animais controle e LPS. Desse modo, podemos afirmar que a administração de LPS no 12º DG promove aumento do número de neurônios ativos em ambas regiões analisadas. Já é de conhecimento clássico na literatura que a administração, seja intravenosa ou intraperitoneal de LPS, é capaz de aumentar as concentrações plasmáticas de ocitocina e vasopressina, além de ser capaz também de aumentar a imunorreatividade para c-Fos tanto no PVN quanto no SON (KASTING, 1986; MATSUNAGA et al, 2000).

Nossos dados são inéditos, uma vez que mostram o uso do LPS em ratas prenhes em diferentes estágios gestacionais e, mais ainda, demonstra haver uma resposta diferencial à nível central, quando estudado a imunomarcção para c-Fos.

A área septal lateral (LS) é uma área pertencente ao sistema límbico e está associada a resposta cardiovasculares evocadas por situações de estresse, podendo citar o estresse por contenção, por exemplo. É sabido que a LS quando ativada promove aumento da pressão arterial (KANAYA et al, 2003; KUBO et al, 1996).

Tanto o hipocampo quanto a área septal podem ser consideradas como sendo uma estrutura em conjunto, uma vez que apresentam uma estreita conexão anatômica, além de compartilharem um papel de grande importância nas funções cognitivas, particulares em relação às informações espaciais na consolidação da memória e integração do comportamento emocional. A área septal e

o hipocampo constituem no substrato neural do sistema de inibição comportamental que é ativado por situações de estresse emocional ou ansiedade, segundo Jeffrey Gray.

Nossos resultados demonstram que o LPS no 12º DG promoveu um aumento expressivo no número de células marcadas positivamente para c-Fos na LS, não sendo observado esse aumento quando analisado no 20º DG.

Ao proceder a análise estereológica do córtex piriforme, notamos um aumento de células marcadas positivamente para c-fos após o tratamento com LPS no 12DG, não observando diferenças no 20ºDG. Nossos dados estão de acordo com os estudos de Ma e colaboradores (2014), os quais encontraram aumento na expressão de c-fos após 120 minutos a aplicação de LPS em áreas como córtex piriforme e também em outras regiões tais como o PVN, SON e amígdala. No entanto, cabe ressaltar que Ma e demais colaboradores utilizaram a dose de 100µg/Kg de LPS. Em nosso estudo, usamos a dose de 200µg/Kg e as ratas encontravam-se no 12º DG.

Após a verificação da marcação diferencial por meio do estudo imunohistoquímico, nossos achados levam a crer que há uma resistência central que ocorre no 20º dia de gestação, não permitindo que haja ativação neuronal em áreas preponderantes para a manifestação do comportamento doentio. A fim de verificar a produção de citocinas após a administração do LPS em animais prenhes, procedeu-se a coleta do plasma e dosagem de citocinas por meio da técnica ELISA

7.7 DOSAGEM DE CITOCINAS

Nossos dados demonstram que no 12º DG há aumento de TNF- α em animais prenhes que receberam a administração do LPS, sendo que a coleta do plasma foi realizada 2 horas após a aplicação. O mesmo não é observado nos animais desafiados imunologicamente por meio do LPS no 20º DG. Além disso, não foi observada alterações nas concentrações plasmáticas de outras citocinas analisadas, como a IL-1 β e IL-6, após 2 horas da aplicação do LPS.

É sabido que o TNF- α é um componente pirogênico endógeno que atua no eixo hipotálamo-hipófise e possui ações imunoestimulatórias importantes no que concerne ao combate de infecções, provocando a liberação de neutrófilos, produção de superóxidos, lisozimas e também ativação de

macrófagos (DINARELLO, 2004). No entanto, estudos afirmam que o TNF- α apresenta um importante papel criogênico endógeno na modulação da resposta febril (LONG; MORIMOTO; NAKAMORI, 1992; LEON et al, 1997) sendo que a concentração plasmática desta referida citocina encontra-se aumentada após a indução da endotoxemia, sendo que o pico da concentração é atingido em cerca de uma ou duas horas após a aplicação do LPS (BUENO et al, 1999; CABRAL, 2016), dados estes que convergem com os resultados apresentados neste presente trabalho. Além do mais, demonstramos outrora, ao analisarmos a temperatura dos animais prenhes, que há uma queda acentuada da temperatura corpórea nas primeiras duas horas após a administração do LPS em animais no 12º DG.

Como dito anteriormente, sabe-se que a gestação é uma fase na qual há uma alteração no balanço entre as citocinas pirogênicas e criogênicas após a exposição de um composto pirogênico exógeno (FOFIE; FEWELL. MOORE, 2005; ASHDOWN et al, 2007). A aplicação de 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS em ratas prenhes aumentou apenas as concentrações plasmáticas de IL-1ra e TNF- α sem alterar os níveis de citocinas pirogênicas, como IL-6 e IL-1 β (FEWELL et al, 2010).

Portanto, nossos dados corroboram para as informações já descritas na literatura científica, uma vez que a concentração de TNF- α encontra-se elevada após 2 horas da aplicação do LPS em animais prenhes no 12ºDG.

Já a IL-1 β , por sua vez, está ligada às alterações comportamentais do quadro do comportamento doentio. Estudos demonstram que a administração seja central ou até mesmo periférica de IL-1 β é capaz de induzir os efeitos do comportamento de fase aguda, incluindo febre e ativação do eixo HHA, além de evocar o comportamento semelhante à depressão em animais. Já animais deficientes em caspase-1 (enzima conversora da forma inativa na forma madura do IL-1 β) são menos sensíveis aos efeitos tipo-depressivos do LPS, como na ingestão alimentar quando há a administração através de via i.c.v. (DANTZER, 2009).

A produção de IL-1 β , estimulada pelo LPS, atua na barreira hemato-encefálica estimulando a síntese de prostaglandinas que difundem pelo parênquima e estimulam células que apresentam receptores para tal mediado, sendo encontradas tais células em regiões encefálicas como a área pré-óptica (POA), PVN e SON, conhecidas regiões que controlam as alterações térmicas e respostas neuroendócrinas frente à ativação imune periférica (KONSMAN; VIGUES; MACKERLOVA, 2004; CABRAL, 2016).

É importante destacar que a ação das citocinas ocorre de maneira conjunta, sendo que a deficiência em uma delas pode ser compensada por outra (DANTZER, 2009). Desse modo, nosso estudo propõe que embora não haja a elevação significativamente de IL-1 β e nem de IL-6 em animais endotóxicos no 12^o DG, isso é compensando pela atuação da TNF- α .

Em relação à dose de LPS utilizada no presente trabalho, nossos dados convergem com resultados já descritos na literatura científica. Bison e colegas, em 2008, evidenciaram que diferentes doses de LPS (1, 5, 15, 50, 125, ou 250 μ g/kg) em ratos da linhagem *Sprague Dawley* induziu elevação dos níveis plasmáticos da citocina pró-inflamatória TNF- α , além de IL-1 β e IL-6 em 2 horas após a administração do LPS.

As citocinas são produzidas por meio das células imunológicas a fim de combater diversos patógenos invasores. No sistema imune, as citocinas agem reconhecendo as partículas invasoras, bem como participando também das respostas adaptativas ou ainda das reações homeostáticas (AVITSUR; YIRMIYA, 1999; ADEREM; ULEVITCH, 2000; KIRSTEN, 2008).

Já no SNC, as citocinas atuam influenciando os neurotransmissores centrais, tais como a dopamina, serotonina, noradrenalina, GABA, acetilcolina, neuropeptídeos e diversos outros. Ademais, as citocinas também atuando promovendo a diferenciação e o crescimento neuronal, na migração de neurônios em direção a seus alvos e também atuam na modificação da plasticidade sináptica (DANTZER, 2005; DUNN, 2006; HAVA et al, 2006).

As citocinas podem ainda ativar o eixo HPA ou HHA através da liberação do fator liberador de corticotrofina oriunda do hipotálamo, o qual, por sua vez, secreta o hormônio adrenocorticotrófico da pituitária, ocasionando num aumento na concentração de glicocorticoides na corrente sanguínea. Sabe-se que durante o processo inflamatório, essas citocinas são capazes de estimular e manter a produção de glicocorticoides em níveis elevados (CHROUSOS, 1995; TURNBULL; RIVIER, 1999; MASTORAKOS; CHROUSOS; WEBER, 1993. ARAFAH, 2010). Porém, as citocinas também podem inibir o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, ao reduzir a secreção de hormônios sexuais, como o hormônio gonadotrófico, hormônio luteinizante, hormônio folículo estimulante e esteroides ovarianos, interferindo na modulação do comportamento reprodutivo e sexual (AVITSUR; POLLAK; YIRMIYA, 1997; MEYER et al, 2005; KIRSTEN, 2010).

A regulação da atividade do eixo HHA, secreção hormonal, resposta comportamental e proliferação celular é feita, sobretudo, pelas citocinas, as quais são responsáveis pela comunicação

entre o sistema imunológico e o sistema neuroendócrino (DANTZER, 2009). As citocinas são fundamentais para que o organismo responda de forma precisa, eficaz e apropriada frente à exposição ao agente infecciosos, não apenas modulando a resposta febril, mas também induzindo importantes alterações comportamentais como descrito previamente (KIRSTEN, 2009). A produção de citocinas, em especial as pró-inflamatórias, associada como uma maior síntese de prostaglandinas leva ao comportamento doente através da estimulação da atividade do eixo HHA e considerável aumento nos níveis de ACTH e glicocorticoides (BANKS; ERICKSON, 2010; MCCUSKER; KELLEY, 2013).

A fim de verificar a responsividade do eixo HPA e a produção de corticosterona, que é um glicocorticoide em ratos, procedeu-se a coleta do plasma e dosagem de corticosterona através da técnica de radioimunoensaio.

7.8 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA

Em nossos achados verificamos que tanto os animais submetidos à endotoxemia no 12º DG apresentaram elevada concentração plasmática de corticosterona, demonstrando, desse modo, que o eixo está respondendo ao estímulo estressor. Não foram encontradas alterações entre o grupo controle e o grupo LPS no 20ºDG.

Sabe-se que durante a gestação e a lactação de mulheres e fêmeas de roedores, há modificações do eixo HPA podendo ocasionar em respostas comportamentais alteradas, provocando ainda, uma hiporresponsividade perante às situações de estresse, uma vez que o eixo se encontra significativamente diminuído (BRUNTON; RUSSELL; DOUGLAS, 2008; HILLERER et al, 2011; NEUMANN, 2003; SLATTERY; NEUMANN, 2007). No início da gestação a concentração de glicocorticoides encontra-se reduzida significativamente e somente começarão a se elevar por volta do 10º dia de gestação em camundongos (BARLOW; MORRISON; SULLIVAN, 1975), bem como em ratos (ATKINSON; WADDELL, 1995).

É sabido que o LPS é um potente agente inflamatório e também é considerado um estressor fisiológico (REYES et al, 2003). As citocinas produzidas por essa endotoxina ativam o eixo HPA e conseqüentemente produzem um aumento nos níveis de glicocorticoides (PRUETT, 2003). A

ativação do eixo HPA se dá através da ativação de neurônios parvocelulares no PVN que expressão CRH. Desse modo, diante de situações de estresse agudo ou mesmo crônico, há liberação de CRH com conseqüente síntese e secreção de ACTH e corticosterona (CONN; FREEMAN, 2000).

Tais dados corroboram com os nossos achados, uma vez que encontramos aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona após a administração de LPS em animais prenhes no 12^oDG além de encontrarmos também ativação de neurônios no PVN, observados por meio de estudo imunohistoquímico. No entanto, não é possível afirmar que haja ativação de neurônios parvocelulares desta referida região.

O sistema catecolaminérgico, proveniente do tronco encefálico, inerva importantes regiões do cérebro que estão envolvidas com as respostas ao estresse e exerce um importante papel na ativação do eixo HPA. É sabido que neurônios noradrenérgicos localizados no NTS e também na região da medula ventrolateral A1 (VLM) projetam neurônios tanto direta quanto indiretamente para a região parvocelular medial do PVN e fornecem informações excitatórias para neurônios CRH desta localidade (ERICSSON; KOVACS; SAWCHENKO, 1994; BULLER et al, 2004), neurônios estes que expressam receptores adrenérgicos α . É demonstrado que tanto noradrenalina quanto agonistas seletivos de receptores $\alpha 1$ excitam neurônios CRH e auxiliam a promover a transcrição gênica para CRH (PLOTSKY, 1997; ITOKI et al, 1994; DOUGLAS et al, 2005). Além do mais, estudos demonstram que o uso de antagonistas de receptores $\alpha 1$ bloqueiam a atividade do eixo HPA (PLOTSKY, 1997). A administração de IL-1 β , por exemplo, é capaz de promover a ativação do eixo HPA pela ativação de neurônios noradrenérgicos A2 no NTS, provocando a liberação de noradrenalina em direção ao PVN (DOUGLAS et al, 2005; MOHANKUMAR, P.S.; QUADRI, 1993; TERRAZZINO; PEREGO; DE SIMONI, 1995). Porém, é importante ressaltar que a ativação do eixo HPA em situações tais como a administração de IL-1 β é contrastante e diferencial entre ratas não prenhes e ratas prenhas, sobretudo em períodos finais da gestação (340). A resposta do eixo HPA é suprimida no final da gestação, refletida pela secreção atenuada de ACTH e corticosterona além da redução da estimulação da expressão de RNAm para Crh no PVN (BRUNTON et al, 2005; PLANT; ZELEZNIK, 2015). Isso parece ser resultado da redução da atividade ou mesmo da eficácia da entrada de noradrenalina nos neurônios CRH na região parvocelular do PVN, sendo que o desafio imunológico através do uso de IL-1 β não foi capaz de evocar a liberação de noradrenalina no final da gestação (BRUNTON et al, 2005; PLANT; ZELEZNIK, 2015). Além disso, no período final da gestação, o nível de expressão de RNAm para

o receptor adrenérgico $\alpha 1A$ está diminuído no PVN (DOUGLAS et al, 2005). Portanto, o conhecimento acerca da redução do impulso noradrenérgico em neurônios CRH do PVN é fundamental para a compreensão das respostas sobre a ativação do eixo HPA frente a estímulos estressores (PLANT; ZELEZNIK, 2015).

Nossos dados levam à crer que há uma resistência central que impede as manifestações do comportamento doentio no período final da gestação, uma vez que não há alterações comportamentais, térmicas e de produção de citocinas e nem tampouco alterações hormonais após a administração do LPS no 20º DG. Propõe, nesse ponto, que há uma resistência a nível central possivelmente inibindo a ativação microglial, impedindo, desse modo, os sintomas cardeais do comportamento doentio. Isso é plausível uma vez que ao analisarmos a ativação neuronal por meio do estudo imunohistoquímico com c-Fos observamos que no 20º DG não há diferença de células marcadas positivamente para c-fos nas regiões encefálicas estudadas. Para aprofundar nossos estudos, procedeu-se à mensuração de proteínas no hipotálamo de animais prenhes quanto à ativação de micróglia e astrócitos.

7.9. WESTERN BLOT

O LPS, administrado periféricamente, é capaz de ativar a micróglia, que são as principais células imunes do sistema nervoso central (HOOGLAND et al, 2015). A micróglia pode estar em um estado de repouso, sendo inativa, no qual nota-se um estado morfológico onde a célula encontra-se ramificada. Porém, diante de situações como infecções, a micróglia pode ser ativada, alterando-se sua morfologia, apresentando um formato morfológico ameboide (KETTENMANN et al, 2011). A micróglia em estado de repouso funciona de modo a supervisionar o ambiente neural em busca de danos ou sinais perigosos, estando pronta para oferecer suporte à neurônios potencialmente ameaçados ou até mesmo para interferir diante da ameaça potencial à integridade do tecido (HOOGLAND et al, 2015). Sinais de perigo podem promover a ativação da micróglia, causando uma transformação de estado a fim de ativar tais células, mudando, também, seu fenótipo. O fenótipo conhecido como M1 da micróglia ativada é caracterizado por produzir citocinas pró-inflamatórias e exercem um papel neurotóxico (TANG; LE, 2015, MOEHLE;

WEST, 2014). Já o fenótipo M2, por sua vez, é ativado através de sinais a partir de células apoptóticas e atuam exercendo papéis importantes na remodelação e reparo tecidual (TANG; LE, 2015; MOEHLE; WEST, 2014 HANISCH, KETTENMANN, 2007).

Estudos experimentais têm demonstrado que a ativação periférica do sistema imunológico usando-se, para isso, o LPS, causa uma resposta no cérebro causando ativação microglial. Pesquisas utilizando apenas uma única injeção de LPS evidenciam que a micróglia foi moderadamente ativada após 3 horas de aplicação da endotoxina bacteriana, atingindo o ápice da ativação após 8 horas e até 2 dias, sendo que o retorno ao estado normal ocorre após 7 dias à endotoxemia (HOOGLAND et al, 2015; BUTTINI; LIMONTA; BODDEKE, 1996).

O mecanismo exato que relaciona o desafio imunológico sistêmico à ativação microglial ainda não está plenamente elucidado pela ciência. Diversos mecanismos fisiopatológicos influenciam este processo. A micróglia pode ser ativada através de aferências autonômicas, sendo que em particular, destaca-se o nervo vago, pela ativação da barreira hematoencefálica e também através do transporte de citocinas e/ou quimiocinas pró-inflamatórias através dos órgãos circumventriculares ou ainda através de células epiteliais que se localizam próximas à barreira (QUAN; BANKS, 2007). Em estudos nos quais a ativação microglial não foi observada, a expressão de TLR não estava expressa de maneira diferente quando se comparada com o grupo controle (NGUYEN et al, 2004; BILBO et al, 2010).

Em nosso estudo, não evidenciamos a ativação microglial através da técnica de Western Blot, quando comparamos os níveis de expressão de IBA-1, receptor classicamente envolvido com a ativação microglial, em nenhum dos dias de gestação estudados após a administração do LPS. Acreditamos, no entanto, que o tempo analisado não foi suficiente para observar a ativação da micróglia, uma vez que os estudos já demonstraram que houve mudança para um estado ativado da micróglia no tempo mínimo à partir de 3 horas. Qin e colaboradores (2007) encontrou que a micróglia estava ativada após 2 horas, porém utilizou camundongos pertencentes à linhagem B6 como modelo experimental e usou LPS do sorotipo O111:B4 administrado na dose de 5 mg/Kg, sendo que o nosso estudo é inédito uma vez que utilizamos o LPS na dose de 200 µg/Kg e os animais encontravam-se prenhes no momento do desafio imunológico. Sendo assim, não foi possível observar a ativação microglial neste caso.

O LPS é capaz de promover a ativação dos astrócitos, sendo este, um dos principais eventos da neuroinflamação. Uma vez ativados, os astrócitos auxiliam na expressão de citocinas pró-inflamatórias além de iNOS, tal como reportado por Lu e colaboradores (2010).

Além do mais, é demonstrado que a administração central de LPS na dose de 4µg/Kg diretamente no estriado de camundongos pertencentes à linhagem C57/BL6 é capaz de promover o aumento na expressão de GFAP após 24 horas. Desse modo, é possível afirmar que há uma ativação astrocitária em resposta ao LPS (BRAHMACHARI; FUNG; PAHAN, 2006).

Demais estudos utilizando como modelo experimental ratos WISTAR demonstraram um aumento na expressão de GFAP em regiões como o córtex, hipocampo e mesencéfalo após a administração intraperitoneal de LPS. Porém, a dose utilizada foi de 10 mg/Kg. Tal evidencia permite afirmar que também a inflamação periférica é capaz de ativar as células astrocitárias (SEMMLER et al, 2005).

O GFAP foi inicialmente isolado à partir de estudos com placas de esclerose múltipla e tem sido reconhecido como sendo um importante marcador de diferenciação de astrócitos, constituindo um dos principais filamentos intermediários de astrócitos adultos (ENG et al, 1971; GOMES et al, 1999).

É sabido que o TNF- α , uma citocina pluripotente, exerce efeitos tido como mitogênicos em astrócitos. O tratamento de TNF- α foi capaz de diminuir o conteúdo de GFAP além de diminuir também o nível de RNAm em astrócitos secundários bovinos maduros (SELMAJ et al, 1991). Além do mais, é notado uma redução nos níveis de RNAm de GFAP em culturas de astrócitos tratadas com TNF- α , sem no entanto, observar alterações no conteúdo do GFAP nestas células (OH; MARKELONIS; OH, 1993; GOMES et al, 1999). Murphy e colaboradores (1995) observaram também uma diminuição no conteúdo de GFAP em células de glioblastoma humanas U373 mediante o tratamento com TNF- α . Tais evidências demonstram a influência da citocina TNF- α na expressão de GFAP em astrócitos. Portanto, em nossos achados, como fora demonstrado anteriormente que a há aumento na concentração plasmática de TNF- α em animais que receberam LPS no 12DG, tal aumento impediu que houvesse alta expressão de GFAP no hipotálamo.

Além do mais, é sabido que a expressão de GFAP em astrócitos é influenciada por diversos fatores tais como a idade, o dano neuronal e também por hormônios esteroides (DAY et al, 1993). Estudos como conduzidos por Arias e colaboradores notaram que há um aumento da imunopositividade ao GFAP em regiões como CA1 e CA3 no hipocampo de ratas na fase de

proestro, fase esta onde encontram-se elevados níveis de progesterona e também de estradiol. É demonstrado ainda na literatura científica que a progesterona é capaz de induzir a expressão de agrina, uma proteína astrocitária envolvida com a formação de sinapses, enquanto que o estradiol acelera o processo de diferenciação de células indiferenciadas em neurônios ou astrócitos e também promove o aumento do conteúdo de GFAP (ARIAS et al, 2009; TOURNELL; BERGSTROM; FERREIRA, 2006; MERLO et al, 2007; GÓMORA-ARRATI, 2010). O estradiol é capaz de modular a forma dos astrócitos e sua função no hipotálamo durante o desenvolvimento, além de regular a expressão de GFAP em modelos tanto *in vivo* quanto também *in vitro* no hipotálamo e também no hipocampo de ratos (DAY et al, 1993; STONE et al, 1998; GARCIA-SEGURA; Mc CARTHY, 2004). Ademais, é sabido que ratas em períodos finais da gestação apresentam aumento da imunorreatividade ao GFAP na MPOA e também no hipocampo, quando se comparado com animais virgens (KINSLEY; LAMBERT, 2008).

Não obstante, destaca-se ainda que há um padrão de expressão diferencial de GFAP no cérebro durante a gestação e o início da lactação. Há aumento de GFAP no hipocampo ao longo da gestação, enquanto que uma diminuição na expressão deste importante marcador é observado no cerebelo. Estudos demonstram que o conteúdo de GFAP está aumentado no córtex frontal e também no hipotálamo nos dias 14 e 18 de gestação, respectivamente. Porém, nota-se que o conteúdo de GFAP está diminuído no 21º dia de gestação. Já na área pré-óptica foi observado uma diminuição o conteúdo de GFAP no dia 14 de gestação com aumento nos níveis entre os dias 18 e 21 de gestação. Os pesquisadores afirmam que a expressão diferencial de GFAP ao longo da gestação é devido a alterações no funcionamento do cérebro durante este importante estágio reprodutivo (GÓMORA-ARRATI, 2010).

Em nossos estudos, não observamos alteração na expressão de GFAP hipotalâmico mesmo em fêmeas que receberam administração de salina no 20ºDG, embora haja uma queda de 23,3988% da expressão de GFAP / actina quando se comparado com os animais no 12DG. Há de se considerar que no nosso estudo investigamos a expressão de GFAP hipotalâmico no 20DG, enquanto que o estudo conduzido por Gómora-Arrati e colaboradores (2010) trabalhou com ratas no 21DG Há uma tendência ao aumento do GFAP nos animais do 20DG que receberam LPS, porém não foi encontrada diferença significativa neste referido grupo, possivelmente devido à baixa dosagem de LPS utilizada.

8 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que o 12º dia de gestação é o dia mais vulnerável à ação do LPS, uma vez que os animais encontram-se em comportamento doentio acentuado, além de exibirem alterações térmicas, hormonais e imunes decorrentes da ação do LPS. Portanto, ao final do presente estudo, evidencia-se que no 12DG a fêmea está em seu estado hiperresponsivo ao desafio imunológico.

Por outro lado, o 20º dia de gestação não apresentou qualquer alteração comportamental, hormonal, termorregulatória e imunológica frente ao LPS, sendo este dia, portanto, caracterizado como o dia de gestação no qual a fêmea encontra-se hiporresponsiva ao desafio imunológico. A hiporresponsividade deve-se à não ativação de áreas centrais envolvidas com a manifestação do comportamento doentio, além da incapacidade do LPS em ativar o eixo HPA e também de promover a neuroinflamação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, J. et al. Aging sensitizes mice to behavioral deficits induced by central HIV-1 gp120. **Neurobiol. Aging**, v. 29, p. 614-621, 2006.
- 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.
- AGUILA F.A., BRANCO L.G.S, ROCHA M. J. da. Hipotermia após choque endotóxico induzido por LPS não é abolida por lesão da região AV3V. **SIIC. USP** 2006.
- AHIMA, R.S.; ANTWI, D.A. Brain regulation of appetite and satiety. **Endocrinol Metab Clin North Am.** 37:811–823, 2008.
- AKARSU E.S., MAMUK S. Escherichia coli lipopolysaccharides produce serotype-specific hypothermic response in biotelemetered rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, p. R1846–R1850, 2007.
- AL-AMIN, M. M. et al. Astaxanthin ameliorates prenatal LPS-exposed behavioral deficits and oxidative stress in adult offspring. **BMC Neuroscience**, v.17, n.1. 2016.
- ARAFAH, B. M. Hypothalamic Pituitary Adrenal Function during Critical Illness: Limitations of Current Assessment Methods. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(10), 3725–3745.2010
- ARAKAWA, H.; BLANDINO, P.J.R.; DEAK, T. Central infusion of interleukin-1 receptor antagonist blocks the reduction in social behavior produced by prior stressor exposure. **Physiol Behav.** v. 98, n. 1-2, p. 139-146, 2009.
- ARIAS, C. et al. Sex and estrous cycle-dependent differences in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the adult rat hippocampus, **Horm. Behav.** V.55, p. 257–263. 2009
- ARSENAULT, D. et al. The different effects of LPS and poly I: C prenatal immune challenges on the behavior, development and inflammatory responses in pregnant mice and their offspring. **Brain Behav Immun.** V.38, p.77–90. 2014
- ASHDOWN et al. Interleukin-1 receptor antagonist as a modulator of gender differences in the febrile response to lipopolysaccharide in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 292, p. R1667–R1674, 2007.
- ASHDOWN, H. et al. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. **Molecular psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 47-55, 2006.
- ASIAEI, M.; SOLATI, J.; SALARI, A.A. Prenatal exposure to LPS leads to long- lasting physiological consequences in male offspring. *Dev Psychobiol.* 53(8):828–38. 2011

- ATKINSON H. C., WADDELL B. J. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rat pregnancy and lactation: circadian variation and interrelationship of plasma adrenocorticotropin and corticosterone. **Endocrinology**, v. 136, p. 512-520, 1995.
- AUBERT, A. Sickness and behavior in animals: a motivational perspective, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 23, p. 1029–1036, 1999.
- AVERY, S.N. et al. BNST neurocircuitry in humans. **Neuroimage**. 91:311-23, 2014.
- AVITSUR, R.; COHEN, E.; YIRMIYA, R. Effects of interleukin-1 on sexual attractivity in a model of sickness behavior. **Physiology & Behavior**, v. 63, p. 25-30, 1997
- AVITSUR, R.; POLLAK, Y.; YIRMIYA, R. Different receptor mechanisms mediate the effects of endotoxin and interleukin-1 on female sexual behavior. **Brain research**, v. 773, n. 1-2, p. 149-161, 1997.
- AVITSUR, R.; YIRMIYA, R. The immunobiology of sexual behavior: gender differences in the suppression of sexual activity during illness. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 64, n. 4, p. 787-796. 1999.
- BAILE, C.A. et al. Endotoxin-elicited fever and anorexia and elfazepam-stimulated feeding in sheep. **Physiol. Behav.** V.27, P. 271–277. 1981
- BANKS, W.A.; ERICKSON, M.A. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. **Neurobiol Dis.** v. 37, p. 26–32, 2010.
- BARKER, D.J. et al. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. **BMJ**. V. 301: 259–62. 1990
- BARKER, D.J. Fetal programming of coronary heart disease. **Trends Endocrinol Metab** v.13. P.364–8. 2002
- BARKER, D.J.P. et al. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. **Int J Epidemiol** v.31. P.1235–9. 2002
- BARLOW, S. M.; MORRISON, P. J.; SULLIVAN, F. M. Effects of acute and chronic stress on plasma corticosterone levels in the pregnant and non-pregnant mouse. **Journal of Endocrinology**. v. 66, p. 90-9. 1975.
- BARRIENTOS, R. M. et al. Peripheral infection and aging interact to impair hippocampal memory consolidation. **Neurobiol. Aging.**, v. 27, n. 5, p. 723-732, 2006.
- BASSI, G.S et al. Lipopolysaccharide-induced sickness behaviour evaluated in different models of anxiety and innate fear in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. v. 110, n. 4, 359- 369, 2012.
- BASSO, A. S. et al. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. *Journal of Neuroimmunology*, v. 140, n. 1-2, p. 69-77, 2003

- BATISTA, T.H. **Influência da desnutrição proteica materna sobre as respostas comportamentais e após estresse imunológico na prole.** Tese. (Doutorado) Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Alfenas-MG. Alfenas. 2019.
- BELOOSESKY, R. et al. Maternal lipopolysaccharide - induced inflammation during pregnancy programs impaired offspring innate immune responses. **Am J Obstet Gynecol.** V.203, n. 2, p.181-185. 2010
- BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behav Brain Res.** 125:141-9, 2001.
- BENEDIKTSSON, R. et al. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. **Clinical Endocrinology (Oxf)**, v. 46, p. 161-166, 1997.
- BEN-JONATHAN, N.; HNASKO, R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. **Endocr Rev.** v.22. p:724-63. 2001
- BESEDOVSKY, H. O. et al. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, v. 233, p. 652- 654, 1986.
- BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A. Immune-neuroendocrine circuits: integrative role of cytokines. **Front Neuroendocrinol** v.13. P.61-94. 1992
- BEYAERT, R.; FIERS, W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. In: MIRE-SLUIJS, A., THORPE, R. (Eds). **Citokines**. California: Academic, 1998. p.335-360.
- BIGNAMI, A.; DAHL, D. Gliosis. In: Kettenmann H & Ransom BR (Editors), **Neuroglia**. Oxford University Press, New York, 843-858. 1995
- BILBO, S.D. Neonatal bacterial infection alters fever to live and simulated infections in adulthood. **Psychoneuroendocrinology.** V.35, n.(3), p.:369-81. 2010
- BISON, S. et al.. Differential behavioral, physiological, and hormonal sensitivity to LPS challenge in rats. **Int J Interferon Cytokine Mediator Res.** v. 1, p.1-13, 2009.
- BLATTEIS, C.M. Body temperaure. In: Blatteis, C.M. (Ed.) **Physiology and Pathophysiology of Temperature Regulation.** New Jersey, World Scientific, p.14-21, 1998.
- BLATTEIS, C.M. Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacology & Therapeutics** v.111, p.194 - 223, 2006
- BLUTHÉ, R.M.; DANTZER, R.; KELLEY, K.W. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. **Brain Res.** v. 537, n. 2, p. 318-320, 1992.

BOLLES, R. C. Cognition and motivation: Some historical trends. In B. Weiner (Ed.), *Cognitive views of human motivation* (pp. 1–20). **New York: Academic Press.** 1974

BOULANT, J. A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. **Annals of the New York Academy of Sciences.** V.29, n.856, p.108-15, 1998.

BRAHMACHARI, S.; FUNG, Y.K.; PAHAN, K. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. **J Neurosci.** v. 26, n. 18, p. 4930-4939, 2006.

BRAIN, P.F. Mammalian behavior and the adrenal cortex. A review. **Behav Biol** v.7. P.453–77. 1972

BRIDGES, R.S. et al. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. **Proc Natl Acad Sci USA** v87. P.8003–7. 1990

BRIDGES, R.S.; ROSENBLATT, J.S.; FEDER, H.H. Serum progesterone concentrations and maternal behavior in rats after pregnancy termination: behavioral stimulation after progesterone withdrawal and inhibition by progesterone maintenance. **Endocrinology** v. 102. P.258–67. 1978

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Estrutura celular. In: BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. (Ed.). *Jawetz, Melnick & Adelberg: microbiologia médica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan p. 6-30. 2000.

BROWN, R. W. et al. The ontogeny of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action in development. **Endocrinology**, v. 137, p. 794-797, 1996.

BRUNTON, P. J.; RUSSELL, J. A.; DOUGLAS, A. J. Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. **Journal of Neuroendocrinology.** v. 20, p. 764–776, 2008.

BRUNTON, P.J. et al. Central opioid inhibition of neuroendocrine stress responses in pregnancy in the rat is induced by the neurosteroid allopregnanolone. **J Neurosci** v. 29. P.6449–60. 2009
BRUNTON, P.J.; BALES, J.; RUSSELL, J.A. Allopregnanolone and induction of endogenous opioid inhibition of oxytocin responses to immune stress in pregnant rats. **J Neuroendocrinol.** V.24, p.690–700, 2012.

BRUNTON; P.J. et al. Endogenous opioids and attenuated hypothalamic-pituitary- adrenal axis responses to immune challenge in pregnant rats. **J Neurosci** v.25, p.5117–26. 2005

BUENO, A.C. et al. Plasma and urine nitric oxide concentrations in horses given below a low dose of endotoxin. **Am. J. Vet. Res.**, v.60, p.969-976, 1999.

BULLER, K. M. A critical role for the parabrachial nucleus in generating central nervous system responses elicited by a systemic immune challenge. **J Neuroimmunol** v.152, p.20–32, 2004

BURRELL, R. Human responses to bacterial endotoxin. **Circ Shock**. V.43 (3), p.137-53. 1994.

BURTON, G.J.; KAUFMANN, P.; HUPPERTZ, B. Anatomy and Genesis of the Placenta. In: JD Neill. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3 ed. San Diego: Elsevier. pp. 189-243. 2006

BUSS, C. et al. Maternal cortisol over the course of pregnancy and subsequent child amygdala and hippocampus volumes and affective problems. **Proc Natl Acad Sci USA** V.109:E1312-9. 2012

BUTTINI, M.; LIMONTA, S.; BODDEKE, H.W. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain. **Neurochem Int**. v..29, n(1), p.25-35 1996

CABANAC, M.; MASSONNET, B. Pathology of thermoregulation. **Rev Neurol**.V.136, N.(4) p.285-302. 1980

CABRAL, L. D. M. Influência do receptor vanilóide tipo 1 (trpv1) na endotoxemia. Tese (Ciências Fisiológicas). Universidade Federal de Alfenas. Alfenas-MG. 2016

CALDER, P. C. n-3 fatty acids, inflammation, and immunity--relevance to postsurgical and critically ill patients. **Lipids**, v. 39, n. 12, p. 1147-1161. 2004.

CAMBONIE, G. et al. Prenatal infection obliterates glutamate-related protection against free hydroxyl radicals in neonatal rat brain. **J Neurosci Res**. V.75, n.1, p.:125-32. 2004

CAMPBELL D.M. et al. Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v.103, n.3, p.273-80, 1996.

CAPUTTO, B.L.; CARDOZO GIZZI, A.M.; GIL, G.A. c-Fos: an AP-1 transcription factor with an additional cytoplasmic, non-genomic lipid synthesis activation capacity. **Biochim Biophys Acta**. V.1841, n.9, p.1241-6, 2014.

CAROLA, V. et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behavior in inbred mice. **Behavioral Brain Research** 134: 49-57. 2002.

CARR, B.R. et al. Maternal plasma ACTH and cortisol relationships throughout human pregnancy. **Am J Obstet Gynecol** v.139. P.416-21. 1981

CASTRO E. O. et al. Sepsis and septic shock during pregnancy: clinical management. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 30, n. 12, p. 631-638, 2008.

CHROUSOS,G.P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the immune-mediated inflammation. **N Engl J Med** v.332, p.1351-1362. 1995

CHUA, J. S. C.; ROFE, A. M.; COYLE, P. Dietary zinc supplementation ameliorates LPS-induced teratogenicity in mice. **Pediatric Research**, v. 59, n. 3, p. 355–358, 2006

CHURCHILL, S. et al. Role of aldosterone in sodium retention of pregnancy in the rat. **American Journal of Physiology**, v. 240, p. R175-181, 1981.

CINTRA, A. et al. Prenatal development of glucocorticoid receptor gene expression and immunoreactivity in the rat brain and pituitary gland: a combined in situ hybridization and immunocytochemical analysis. **Neuroendocrinology**, v. 57, p. 1133- 1147, 1993.

CLARK, D. A. et al. Ecology of danger-dependent cytokine-boosted spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model. I. Synergistic effect of LPS (TNF- α + IFN- γ) on pregnancy loss. **American Journal of Reproductive Immunology**. v.52 (6), p.370–378, 2004.

CLEMENT, J.G.; MILLS, P.; BROCKWAY, B. Use of telemetry to record body temperature and activity in mice. **J Pharmacol Methods**. v.21, n. 2, p. 129-140, 1989

COHN, D. W. H. Efeitos da administração de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* sobre o comportamento de camundongos dominantes e submissos: uma abordagem etofarmacológica ao estudo do comportamento doentio. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2003.

COHN, D.W.H.; DE SÁ-ROCHA, L.C. Differential effects of lipopolysaccharide in the social behavior of dominant and submissive mice. **Physiology & Behavior**. 87:932– 937, 2006.

COLEMAN, M. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. **Nat Rev Neurosci**. v6, n 11, p.:889–98. 2005

COLLINS, J.G. et al. Effects of *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on pregnancy outcome in the golden hamster. **Infection and immunity**, v. 62, n. 10, p. 4652-4655, 1994.

COMBRINCK, M. I.; PERRY, V. H.; CUNNINGHAM, C. Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. **Neuroscience**, v. 112, n. 1, p. 7 –11, 2002.

CONCAS, A. et al. Role of brain allopregnanolone in the plasticity of gamma-aminobutyric acid type A receptor in rat brain during pregnancy and after delivery. **Proc Natl Acad Sci USA** v.95 P.13284–9 1998

CONN, P.M.; FREEMAN, M.E. **Neuroendocrinology in Physiology and Medicine**. Human Press. New Jersey, USA, 2000.

CONTI, B. et al. Cytokines and fever. **Front Biosci**. v. 1, n. 9, p. 1433-1449, 2004.

CORPECHOT, C. et al. Neurosteroids: 3 α - Hydroxy-5 α -pregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma, and steroidogenic glands of male and female rats. **Endocrinology** v.133. P.1003–9. 1993

- COTTRELL, E.C.; SECKL, J.R. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. **Front. Behav. Neurosci.** V.3, P-19. 2009
- CRUNFLI, F. VILELA, F.C., GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of dipyrone. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 2014.
- CUSCHIERI, J., BILLIGREN, J., MAIER, R.V. Endotoxin tolerance attenuates LPS-induced TLR4 mobilization to lipid rafts: a condition reversed by PKC activation. *J Leukoc Biol.* v.80 (6), p.1289-97, 2006.
- D'HAENEN, H. Measurement of anhedonia. **EurPsychiatry** v. 11, p. 335-343, 1996.
- DA COSTA, A. P. et al. Hypothalamic and amygdaloid corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH receptor-1 mRNA expression in the stress-hyporesponsive late pregnant and early lactating rat. **Molecular Brain Research.** V. 91, p. 119-130. 2001
- DA COSTA, A.P.C., et al. Region-specific reduction in stress-induced c-Fos mRNA expression during pregnancy and lactation. **Brain Res** v.742. P.177–84. 1996
- DAHER, S. et al. Cytokines in recurrent pregnancy loss. **Journal of Reproductive Immunology.** v.62 (1-2), p.151–157, 2004.
- DALLAPORTA, M. et al. c-Fos immunoreactivity induced by intraperitoneal LPS administration is reduced in the brain of mice lacking the microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1). **Brain Behav Immun.** V.21, n.8, p.1109-21. 2007.
- DALLMAN, M.F. et al. Stress, feedback and facilitation in the hypothalamo-pituitary adrenal axis. **J Neuroendocrinol** v.4. P.517–26. 1992
- DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. **Immun Allerg Clin North Am.** v. 29, n. 2, p. 247–264, 2009.
- DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? **Brain, Behavior, and Immunity** 15, 7–24. 2001.
- DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. **Eur J Pharmacol** v.500, p.399–411. 2004
- DANTZER, R. et al. Cytokines and sickness behavior. **Ann N Y Acad Sci.** 840:586-90. 1998.
- DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nat Rev Neurosci** 9:46–56. 2008.
- DANTZER, R. et al. Molecular basis of sickness behavior. **Ann N Y Acad Sci.** Sep 29; 856:132-8. 1998.

DANTZER, R. et al. Molecular basis of sickness behavior. **Ann N Y Acad Sci.** v.856. P. 132-8, 1998.

DANTZER, R. EuroConference on cytokines in the brain: Expression and action of cytokines in the brain and pathophysiological implications. **Brain, behavior, and immunity**, v. 19, n. 3, p. 263-267, 2005.

DAY, J. R. Gonadal steroids regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the adult male rat hippocampus, **Neuroscience.** V.55, p. 435–443. 1993

DE ARAUJO, I.E. et al. Food reward in the absence of taste receptor signaling. **Neuron.** 57:930–941, 2008.

DE PAIVA, V. N. et al. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. **Brain, Behavior and Immunity** v. 215, p. 146-151, 2010.

DE PAIVA, V.N. et al. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. **Behavioural Brain Research.** V.215, p.146–151, 2010.

DELLAGIOIA, N.; HANNESTAD, J. A critical review of human endotoxin administration as an experimental paradigm of depression. **Neurosci Biobehav Rev.** 2010 January ; 34(1): 130–143.

DER-AVAKIAN, A.; MARKOU, A. Withdrawal from chronic exposure to amphetamine, but not nicotine, leads to an immediate and enduring deficit in motivated behavior without affecting social interaction in rats. **Behav Pharmacol.** v. 21, n. 4, p. 359–368, 2014.

DHILLO, W.S. Appetite regulation: an overview. **Thyroid.** 17:433–445, 2007.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. **Blood**, v. 77, p. 1627- 1652, 1991.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 51 – 95, 1984.

DINARELLO, C.A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. **J Endotoxin Res**; v.10 (4), p.201-22. 2004.

DOGAN, M., ATAOGU, H., EYUP, S. AKARSU. Effects of different serotypes of Escherichia coli lipopolysaccharides on body temperature in rats. **Life Sci.**67:2319-29. 2000.

DOUGLAS, A. et al. Reduced activity of the noradrenergic system in the paraventricular nucleus at the end of pregnancy: implications for stress hyporesponsiveness. **J Neuroendocrinol** v.17, p.40–8, 2005.

DOUGLAS, A.J. et al. Neuroendocrine responses to stress in mice: hyporesponsiveness in pregnancy and parturition. **Endocrinology** v.144. P.5268–76. 2003

- DU PLESSIS, I. et al. c-Fos immunoreactivity in selected brain regions of rats after heat exposure and pyrogen administration. **Brain Research**. V.1120, p.124–130, 2006.
- DUNN, A. J. Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone. **Life Sci**;43:429–35. 1988.
- DURR, J.A.; STAMOUTSOS, B.; LINDHEIMER, M.D. Osmoregulation during pregnancy in the rat. Evidence for resetting of the threshold for vasopressin secretion during gestation. **J Clin Invest** v. 68. P.337–46. 1981
- EDWARDS, C. E. et al. Dysfunction of the placental glucocorticoid barrier: a link between the foetal environment and adult hypertension? **Lancet**. V.341, p.355—357. 1993
- ELIAS, L.L.K. et. al. Effect of Plasma Osmolality on Pituitary-Adrenal Responses to Corticotropin-Releasing Hormone and Atrial Natriuretic Peptide Changes in Central Diabetes Insipidus. **The journal of clinical endocrinology & metabolism** v. 82(4), p.1243-1247, 1997
- ELIAS, P.C.L.et. al. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis up-regulation in rats submitted to pituitary stalk compression. **Journal of Endocrinology** v.180, p.297–302, 2004.
- ELOVITZ, M. A.; MRINALINI, C. Animal models of preterm birth. **Trends Endocrinol. Metab.** 15:479–487. 2004.
- ENANGA, B. et al. Sleeping sickness and the brain. **Cell Mol Life Sci**. May; 59(5):845-58. 2002.
- ENAYATI, M. et al. Maternal infection during late pregnancy increases anxiety- and depression- like behaviors with increasing age in male offspring. **Brain Res Bull**. V.87(2–3):295–302. 2012
- ENG, L.F. et al. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. **Brain Research**, v.28, p. 351-354. 1971
- ENGBLOM, D. et al. Microsomal prostaglandin E synthase1 is the central switch during immuneinduced pyresis. **Nat Neurosci**; v.6, p.1137–8. 2003.
- ENGBLOM, D., et al. Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood–brain barrier. **J Mol Med**; v.80,p5–15. 2002.
- ENGSTRÖM, L. et al. Lipopolysaccharide- induced fever depends on prostaglandin E2 production specifically in brain endothelial cells. **Endocrinology**. V.153. p.4849-61. 2012.
- ENGSTRÖM, L. et al. Lipopolysaccharide- induced fever depends on prostaglandin E2 production specifically in brain endothelial cells. **Endocrinology**. V.153, n.10, p.4849-61. 2012.
- ERICSSON, A.; KOVACS, K.J.; SAWCHENKO, P.E. A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of inter- leukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. **J Neurosci** v.14, p.897–913, 1994.

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

FEWELL, J. E, LIU-TERTIL, L., ALEXANDER, B.N., A. Bacterial endotoxin induce hypothermia in pregnant rats: Role of tumor necrosis factor alpha. **J Thermal Biol** ; v.35, p.360–5. 2010.

FEWELL, J. et al. Bacterial endotoxin induced hypothermia in pregnant rats: Role of tumor necrosis factor- α . **Journal of Thermal Biology** Volume 35, Issue 7, Pages 360–365. 2010

FIGUEIREDO, H.F. et al. Estrogen potentiates adrenocortical responses to stress in female rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. V.292:E1173–82. 2007

FILE, S. E.; HYDE, J. R. G. Can social interaction be used to measure anxiety? **Br J Pharmac**. 62:19-24, 1978.

FILE, S. E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **European Journal of Pharmacology**. V.463, p.35-53, 2003.

FILKINS, J.P., DI LUZIO, N.R. Endotoxin induced hypothermia and tolerance in the rat. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.29, p.724–6. 1968.

FISHKIN, R.J.; WINSLOW, J.T. Endotoxin-induced reduction of social investigation by mice: interaction with amphetamine and anti-inflammatory drugs. **Psychopharmacology**. v. 132, n. 4, p. 335-41, 1997.

FOFIE A.E., FEWELL J. E., MOORE S. L. Pregnancy influences the plasma cytokine response to intraperitoneal administration of bacterial endotoxin in rats **Exp. Physiol.**, v. 90, p. 95–101, 2005.

FONSECA, E. **Participação do sistema opioideérgico e dos glicocorticóides nas alterações comportamentais e da imunidade inata induzidas na prole pelo estresse pré-natal**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graudação em Patologia Experimental e Comparada. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005.

FONSECA, W. F. **Influência dos glicocorticóides no comportamento doentio induzido pelo LPS de E. coli em camundongos prenhes**. Dissertação (Mestrado). Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de Alfenas-MG. Alfenas. 2015

FORTIER, M. E.; LUHESHI, G. N.; BOKSA, P. Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. **Behavioral brain research**, v. 181, n. 2, p. 270-277, 2007.

FRANCESCHELLI S, et al.. Astaxanthin treatment confers protection against oxidative stress in U937 cells stimulated with lipopolysaccharide reducing O₂ production. **PLos One**. V. 9, n. 2. 2014

FREEMAN, M.E. Et al. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. **Physiol Rev** v.80. p. 1523–631. 2000

FRENOIS, F. et al. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**. V.32, n.5, p.516-31, 2007.

GARCIA-SEGURA, L.M.; MCCARTHY, M. M, Minireview: role of glia in neuroendocrine function, **Endocrinology**. V.145, p; 1082–1086. 2004

GAYLE, D. et al. Lipopolysaccharide (LPS). – and muramyl dipeptide (MDP)-induced anorexia during refeeding following acute fasting: characterization of brain cytokine and neuropeptide systems mRNAs. **Brain Research** v. 795, p. 77–86, 1998.

GIUSTI-PAIVA, A. et al. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v.447, p.175–180. 2003.

GODBOUT, J. P. et al. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. **Faseb J.**, v. 19, n. 10, p. 1329-1331, 2005.

GOEHLER, L.E. et al. Interleukin-1 β in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? **J. Neurosci.** v19. P.2799–2806. 1999.

GOLAN, H. M. et al. Specific neurodevelopmental damage in offspring following maternal inflammation during pregnancy. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 6, p. 903–917, 2005.

GOLDENBERG, R. L.; HAUTH, J. C.; ANDREWS, W. W. Intrauterine infection and preterm delivery. **N. Engl. J. Med.** v.342, p.1500–1507. 2000.

GOMES, F.C.A et. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): Modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**.,V.32, N(5), 619–631. 1999

GOMES, K.R.O. et al. Prevalência do uso de medicamentos na gravidez e relações com as características maternas. Ver. **Saúde Pública**, v.33 (3), p. 5-54. 1999

GÓMORA-ARRATI, P., et al. Changes in the content of GFAP in the rat brain during pregnancy and the beginning of lactation. **Neuroscience Letters**, v.484, n(3), 2010

GOUJON, E. et al. Stress downregulates lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines in the spleen, pituitary, and brain of mice. **Brain. Behav. Immun.** V.9(4), p. 292–303. 1995

GRANGER et al. Sepsis-induced morbidity in mice: effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain. **Psychoneuroendocrinology**. V.38, n.7., p.1047–1057, 2013.

GRANT, E.C.; MACKINTOSH, J.H. A comparison of the social postures of some common laboratory rodents. **Behavior**. 21:247–59, 1963.

GUTHRIE, H.A., PICCIANO, M.F. Human nutrition. Saint Louis : MOSBY, 1995. 654p

HABA, R. et al. Lipopolysaccharide affects exploratory behaviors toward novel objects by impairing cognition and/or motivation in mice: Possible role of activation of the central amygdala. **Behav Brain Res**. V.228, n.2, p.423-31, 2012.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **J. Comp. Psychol**. V.18, P.:385–403. 1934.

HANISCH, U.K.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nat Neurosci**. V.10, n.(11):1387–94. 2007

HARDEN, L.M. et al. Fever and sickness behavior: Friend or foe? **Brain, Behavior, and Immunity**. V.50. p.322-33. 2015

HARJU, K. et al. Expression of toll-like receptor 4 and endotoxin responsiveness in mice during perinatal period. **Pediatric research**, v. 57, n. 5, p. 644-648, 2005

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 12, n. 2, p. 123-37, 1988.

HARVILLE, E.W. et al. Patterns of salivary cortisol secretion in pregnancy and implications for assessment protocols. **Biol Psychol** v.74. p.85–91. 2007

HAUGER, R.L. et al. Role of CRF receptor signaling in stress vulnerability, anxiety, and depression. **Ann N Y Acad Sci**,v.1179, p.120–43, 2009.

HAVA, G. et al. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. **Developmental psychobiology**, v. 48, n. 2, p. 162-168, 2006.

HENNESSY, M. B. et al. Sociality and sickness: have cytokines evolved to serve social functions beyond times of pathogen exposure? **Brain Behav Immun**. 0:15-20, 2014.

HERMAN, J.P et al. Local circuit regulation of paraventricular nucleus stress integration: glutamate-GABA connections. **Pharmacol Biochem Behav**.V.71, p.457-468. 2002

HERRERA, E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. **Eur J Clin Nutr** v54:S47–51. 2000

HEYSEYER, C. J. et al. Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 94, n. 4, p. 1500- 1505, 1997.

HILLERER, K. M. et al. Exposure to chronic pregnancy stress reverses peripartum- associated adaptations: implications for postpartum anxiety and mood disorders. **Endocrinology**. v. 152, p. 3930 –3940, 2011.

HOOGLAND, I. et al. Systemic inflammation and microglial activation: Systematic review of animal experiments. **Journal of Neuroinflammation**, v.12, n. (1), p.1–13. 2015

HOPKINS, S.J. Central nervous system recognition of peripheral inflammation: a neural hormonal collaboration. **Acta Biomed**. v. 78, p. 1231-1241, 2007.

HUANG, Y et al. Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. **Neurobiol. Aging**, v. 29, n. 11, 1744-1753, 2007.

HUNT, S.P.; PINI, A.; EVAN G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. **Nature**. V.328, n.6131, p.632-4. 1987.

HWANG, P.; GUYDA, H.; FRIESEN, H. A radioimmunoassay for human prolactin. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 68:1902–6. 1971

ITOI, K et al. Microinjection of norepinephrine into the paraventricular nucleus of the hypothalamus stimulates corticotropin-releasing factor gene expression in conscious rats. **Endocrinology** v135, p.2177–82, 1994.

JEZEK, P. Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins-UCPn. **Int J Biochem Cell Biol**. V.34, n.10, p.1190-206, 2002.

JOHNSTONE, H.A. et al., Attenuation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: changes in feedforward and feedback mechanisms. **J Neuroendocrinol** v.12. P.811–22. 2000.

JÚNIOR, D. E. D. P. **Influência dos receptores ghs-r1a nas respostas comportamentais e térmicas diante da endotoxemia**. Dissertação (Mestrado). Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Alfenas-MG. Alfenas, 2015

KANAYA, T. et al. Projections from the caudal part to the rostral part of the lateral septal area mediate blood pressure increase. **Brain Res Bull**. V.61, n.5, p.505-10, 2003.

KANOSUE, K. et al. —Set point revisited. In: **Thermal Physiology 1997** (Eds: Nielsen Johanssen B. & R. Nielsen), August Krogh Institute, Copenhagen, Denmark, p. 39-43, 1997.

KASTING, N.W. Characterization of body temperature, vasopressin, and oxytocin responses to endotoxin in the rat. **Can. J. Physiol. Pharmacol**. V.64, P.1575–1578, 1986.

KELLEY, K.W. et al. Cytokine-induced sickness behavior. **Brain Behav. Immun.**, v. 17, n. 1, Suppl., p. 112-118, 2003.

KENT S, et al. Sickness behavior as a new target for drug development. **Trends Pharmacol Sci.** v.13, p.:24-8. 1992

KENT, S. et al. Mechanisms of sickness-induced decreases in food-motivated behavior. **Neurosci Biobehav Rev**, v.20 (1), p.171-5, 1996.

KENT, S. et al. Sickness behavior as a new target for drug development. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, p. 24- 28, 1992.

KENT, S.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Effects of lipopolysaccharide on food-motivated behavior in the rat are not blocked by an interleukin-1 receptor antagonist. **Neuroscience Letters**, v. 145, n. 1, p. 83-6, 1992.

KETTENMANN, H, et al. A. Physiology of microglia. **Physiol Rev.** v.91, n.(2):461–553. 2011

KIM, E.J., et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists on LPS-induced neuronal death in mixed cortical neurons: associated with iNOS and COX-2. **Brain Res.** V.941(1–2):1–10. 2002

KIM, J.Y. et al. HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage. **Nat Neurosci.** V.13, n2. P.180–9. 2010.

KING, J.C., WEININGER, J. Embarazo y lactancia. Washington DC : Organización Panamericana de la Salud, 1991. p.362-368. (OPAS - Publicación Científica, 532

KINOSHITA, D. Avaliação dos efeitos do LPS sobre parâmetros comportamentais e imunológicos em camundongos idosos. São Paulo. 2007.

KINSLEY, C.H.; LAMBERT, K.G Reproduction-induced neuroplasticity: natural behavioural and neuronal alterations associated with the production and care of offspring, **J. Neuroendocrinol.** 20, P. 515–525. 2008

KIRSTEN, T. B. et al. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. **J Neurosci Res**, São Paulo, v. 90, n. 10, p. 1903-12, Oct 2012.

KIRSTEN, T. B. et al. Prenatal lipopolysaccharide reduces motor activity after an immune challenge in adult male offspring. **Behav Brain Res**, São Paulo, v. 211, n. 1, p. 77-82, Jul 29 2010.

KIRSTEN, T. B. et al. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. **Neuroimmunomodulation**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 240-51, 2010.

KIRSTEN, T. B. et al. Prenatal LPS exposure reduces olfactory perception in neonatal and adult rats. **Physiol Behav**, São Paulo, v. 104, n. 3, p. 417-22, Sep 01 2011.

KIRSTEN, T.B. **Avaliação Comportamental e Neuroquímica da prole masculina de ratas expostas pré-natalmente ao lipopolissacarídeo**. Dissertação (Mestrado). 123f. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental e Comparada. São Paulo: USP; 2008.

KIRSTEN, T.B. et al. Prenatal lipopolysaccharide reduces motor activity after an immune challenge in adult male offspring. **Behavioural Brain Research**. v.211, n. 1, p.77–82, 2010.

KLAMPFL, S.M. et al. CRF-R1 activation in the anterior- dorsal BNST induces maternal neglect in lactating rats via an HPA axis- independent central mechanism. **Psychoneuroendocrinology**. V.26, n.64, p.89-98, 2015.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiol Rev**. Jan; 71(1), p.93-127. 1991.

KONSMAN, J.P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends Neurosci**. v. 25, n. 3, p. 154-159. 2002.

KONSMAN, J.P.; VIGUES, S.; MACKERLOVA, L. et al. Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: Relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. **J Comp Neurol**. v. 472, n. 1, p. 113–129, 2004

KOPF, B. S. et al. Evidence that PGE2 in the dorsal and median raphe nuclei is involved in LPS-induced anorexia in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 99, p. 437-443, 2011.

KOZAK, W. Regulated decrease in body temperature. In: Mackowiak PA, editor. Fever: basic mechanisms and management. **Philadelphia: Lippincott-Raven**, pp. 467–78, 1997.

KUBO, T. et al. Central nicotinic receptor blockade inhibits emotionally conditioned pressor responses in rats. **Experientia**. V.52, p.348–352, 1996.

LACERDA, G.F.M.L de. **Ansiedade em modelos animais: efeitos de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial**. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 2006.

LARSON, S. J. Lipopolysaccharide and interleukin-1 β decrease sucrose intake but do not affect expression of place preference in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 84, p. 429–435, 2006.

LARSON, S.J.; DUNN, A.J. Behavioral effects of cytokines. **Brain Behav Immun** v.15, p.371–387, 2001.

- LAWSON, M.A.; MCCUSKER, R.H.; KELLEY, K. Interleukin-1 beta converting enzyme is necessary for development of depression-like behavior following intracerebroventricular administration of lipopolysaccharide to mice. **Journal of Neuroinflammation**. V.10:54. 2013.
- LAZARUS, M. et al. EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. **Nat Neurosci**. V.10. p.1131–1133. 2007.
- LENT, R. As unidades do sistema nervoso. In: LENT, R. (Ed.). Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 65-95.
- LEON, L.R. et al. Exacerbated febrile responses to LPS, but not turpentine, in TNF double receptor-knockout mice. **Am J Physiol**, v.272, p.R563–9 (Regul Integr Comp Physiol 41), 1997.
- LEON, L.R. Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. **J Appl Physiol**. v. 92, n. 6, p. 2648-2655, 2002.
- LEONARD, B.E. The immune system, depression and the action of antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. May; 25(4):767-80, 2001.
- LEVITON, A.; DAMMANN, O.; DURUM, S. K. The adaptive immune response in neonatal cerebral white matter damage. **Annals of Neurology**. v. 58, n. 6, p. 821-828. 2005.
- LEVITT, N.S. et al. Impaired glucose tolerance and elevated blood pressure in low birth weight, nonobese, young South African adults: early programming of cortisol axis. **J Clin Endocrinol Metab** v.85. P.4611–8. 2000.
- LI, Z. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation and fusion of skeletal muscle. **Journal of Cell Biology**. V.139, p. 1-16. 1997
- LI, J et. al. Increased sucrose intake and corresponding c-Fos in amygdala and parabrachial nucleus of dietary obese rats. **Neuroscience Letters** v.525, p. 111– 116, 2012.
- LIMA, F.R.S. Thyroid hormone action on astroglial cells from distinct brain regions during development. **International Journal of Developmental Neuroscience**. V.16, p.19-27. 1998
- LIN YL, LIN SY, WANG S. Prenatal lipopolysaccharide exposure increases anxiety-like behaviors and enhances stress-induced corticosterone responses in adult rats. **Brain Behav Immun**. V.26, n.3, p.459–68. 2012.
- LIN, Y.L.; WANG, S. Prenatal lipopolysaccharide exposure increases depression-like behaviors and reduces hippocampal neurogenesis in adult rats. **Behav Brain Res**. 259:24–34. 2014
- LINDSAY, J. R.; NIEMAN, L. K. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy: challenges in disease detection and treatment. **Endocri. Rev**. Volume 16, p. 775-799. 2005

LING, Z, et al. In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain. **Mov Disord Off J Mov Disord Soc.** V.17, n.1, p.:116–24. 2002.

LISTER, G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmac. Ther**, v.46, p.321-340, 1990.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology.** V.92, p.180–185, 1987.

LOHRENZ, F.N.; SEAL, U.S.; DOE. R.P. Adrenal function and serum protein concentrations in a kindred with decreased corticosteroid-binding globulin (CBG) concentration. **J Clin Endocrinol Metab** v.27. P.966–72. 1967

LONG, N.C. et al. Antiserum against tumor necrosis factor enhances lipopolysaccharide fever in rats. **Am J Physiol** v.258, p.332–7, 1990.

LONG, N.C., et al. Systemic injection of TNF- α attenuates fever due to IL-1b and LPS in rats. **Am J Physiol** v.263, p.987–9, 1992.

LONG, N.C.; MORIMOTO, A.; NAKAMORI, T. et al. Systemic injection of TNF-alpha attenuates fever due to IL-1 beta and LPS in rats. *Am J Physiol.* v. 263, p. R987-R991, 1992.

LU, X. et al Resveratrol differentially modulates inflammatory responses of microglia and astrocytes. **J Neuroinflammation.** v. 17. n. 7, 2010.

LUGARINI, F., et al. A role for cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced anorexia in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 283, R862–R868. 2002

MA, S. et al. Reduced Hypothalamic Vasopressin Secretion Underlies Attenuated Adrenocorticotropin Stress Responses in Pregnant Rats. **Endocrinology**, Volume 146, Issue 3, 1, P. 1626–1637. 2005

MA, Y. et al. Differential roles of cyclooxygenase-2-related signaling in regulating hypothalamic neuronal activity under various acute stresses. **J Vet Med Sci.** V.76, n.2, p.219- 27, 2014.

MA, Y. et al. Differential roles of cyclooxygenase-2-related signaling in regulating hypothalamic neuronal activity under various acute stresses. **J Vet Med Sci.** V.76, n.2.p.:219- 27, 2014.

MACKOWIAK, P.A. Temperature regulation and pathogenesis of fever. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practise of infectious disease, vol. 1, 6th edition Elsevier Churchill Livingstone. v. 1, 6^{ed}, p. 703-718, 2005.

MANDUCA, A. et al. Distinct roles of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol in social behavior and emotionality at diferente developmental ages in rats. **European Neuropsychopharmacology**, n.25, v. 8, p. 1362-1374, 2015.

MARTYNHAK, B. J. et al. Neonatal exposure to Constant light prevents anhedonia-like behavior induced by Constant light exposure in adulthood. **Behavioural Brain Research** v. 22, p. 10-14, 2011.

MASTORAKOS, G.; CHROUSOS, G.P.; WEBER, J.S Recombinant inteleukin-6 activates the hypothalamic pituitary adrenal axis in humans. **J Clin Endocrinol Metab** v.77, p.1690–1694. 1993

MATSUMURA, K.; KOBAYASHI, S. Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. **Front Biosci**, Sep. 1; 9, p.2819-26, 2004.

MATSUNAGA, W. et al. LPS induced Fos expression in oxytocin and vasopressin neurons of the rat hypothalamus. **Brain Res**. V.858, n.1, p.9-18. 2000.

MAXWELL, GD. Glial cell line derived neurotrophic factor promotes the development of adrenergic neurons in mouse neural crest cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 93, p. 13274-13279. 1996

MAYER, A.M. Therapeutic implications of microglia activation by lipopolysaccharide and reactive oxygen species generation in septic shock and central nervous system pathologies: a review. **Medicina**. V.58(4):377–85. 1998.

McCUSKER, R.H.; KELLEY, K.W. Imune-neural connections: how the immune system's response to infections agents influences behavior. **J Exp Biol**. v. 216, p. 84-98, 2013.

MELLO, B. S. F. **Determinação dos efeitos da doxiciclina em um modelo de depressão induzido por lipopolissacarídeo em camundongos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2012.

MERLO, S. et al. Astrocyte-like cells as a main target for estrogen action during neuronal differentiation. **Mol. Cell. Neurosci**. V.34, p; 562–570. 2007

MEYER, U. et al. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. **J Neurosci**. V.26, n.18, p.4752–62. 2006

MEYER, U. et al. Towards an immuno- precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 29, n. 6, p. 913-947, 2005.

MILKOVIC, K. et al. Maintenance of the plasma corticosterone concentration of adrenalectomized rat by the fetal adrenal glands. **Endocrinology**, v. 93, p. 115-118, 1973.

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.

MOEHLE, M.S.; WEST, A.B. M1 and M2 immune activation in Parkinson's disease: foe and ally? **Neuroscience**. V.302, p.359-373, 2014

MOHANKUMAR, P.S.; QUADRI, S.K. Systemic administration of inter-leukin-1 stimulates norepinephrine release in the paraventricular nucleus. **Life Sci** v.52, p:1961–7, 1993

MOLTZ, H. et al. Hormonal induction of maternal behavior in the ovariectomized nulliparous rat. **Physiol Behav** v.5. P.1373–7. 1970

MOORE, K. L; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica**. 8ª edição, Rio de Janeiro: Elvieser. 2008

MORRIS, D. et al. Dexamethasone reduces endotoxin-induced tumor necrosis factor activity production in vitro by equine peritoneal macrophages. **Cornell Vet.**, v.81, p.267-276, 1991.

MORRISON, S.F.; NAKAMURA, K.; MADDEN, C.J. Central control of thermogenesis in mammals. **Exp Physiol**. 93:773–797. 2008.

MUKADDAM-DAHER, S. et al. Regulation of cardiac oxytocin system and natriuretic peptide during rat gestation and postpartum. **J Endocrinol** v.175. P.211–6. 2002

MUNCK, A.; KORITZ, S.B. Studies on the mode of action of glucocorticoids in rats. I. Early effects of cortisol on blood glucose and on glucose entry into muscle, liver and adipose tissue. **Biochim Biophys Acta** v.57. P.310–7. 1962

MUNFORD, R.S. Murine responses to endotoxin: another dirty little secret? **The Journal of infectious diseases**. v. 201, n. 2, p. 175-177, 2010.

MURATORE, C. S. et al. Endotoxin alters early fetal lung morphogenesis. **Journal of Surgical Research**, v. 155, n. 2, p. 225-230, 2009.

MURPHY, G.M. Tumor necrosis factor- α and basic fibroblast growth factor decrease glial fibrillary acidic protein and its encoding mRNA in astrocyte cultures and glioblastoma cells. **Journal of Neurochemistry**. V.65, p. 2716-2724. 1995

MURRAY, C. A.; LYNCH, M A. Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 2974–2981, 1998.

NAKAMURA H, et al. Inhibitory effect of pregnancy on stress-induced immunosuppression through corticotropin releasing hormone (CRH) and dopaminergic systems. **J Neuroimmunol** v.75. p.1–8. 1997.

NASCIMENTO, A. et al. Temporal Analysis of Lipopolysaccharide-Induced Sickness Behavior in Virgin and Lactating Female Rats. **Neuroimmunomodulation** v.20:305–312, 2013.

- NEPOMNASCHY, P.A. et al. Cortisol levels and very early pregnancy loss in humans. **Proc Natl Acad Sci USA** v.103. P.3938–42. 2006
- NEUMANN, I. D. Brain mechanisms underlying emotional alterations in the peripartum period in rats. **Depress Anxiety**, v. 17, p. 111-121, 2003.
- NEUMANN, I.D. et al. Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adenohipophysial changes. **J PHYSIOL**. V.508. P.289–300. 1998
- NGUYEN, M.D. Et al. Exacerbation of motor neuron disease by chronic stimulation of innate immunity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurosci**. V.24, n.(6):1340–9.2004
- NILSSON, A., et al. Inflammation-induced anorexia and fever are elicited by distinct prostaglandin dependent mechanisms, whereas conditioned taste aversion is prostaglandin independent. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.61, p.236–243. 2016.
- NOLAN, Y. et al. Evidence that lipopolysaccharide-induced cell death is mediated by accumulation of reactive oxygen species and activation of p38 in rat cortex and hippocampus. **Exp Neurol**. V.184, n(2):794–804. 2003
- NUMAN, M. Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. **J Comp Physiol Psychol** v.87:746–59. 1974
- OBEL, C. et al. Stress and salivary cortisol during pregnancy. **Psycho- neuroendocrinology** v.30. P.647–56. 2005
- OGOINA, D. Fever, fever patterns and diseases called 'fever'a review. **J Infect Public Health**. v. 4, n. 3, 108-124, 2011.
- OH, Y.J.; MARKELONIS, G.J.; OH, T.H. Effects of interleukin-1b and tumor necrosis factor-a on the expression of glial fibrillary acidic protein and transferrin in cultured astrocytes. **Glia**. V.8, p.77-86. 1993
- OHKAWA, T. et al. Effect of an acute maternal stress on the fetal hypothalamo-pituitary-adrenal system in late gestational life of the rat. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 98, p. 123-129, 1991.
- OHMURA, Y.; YOSHIOKA, M. The roles of corticotropin releasing factor (CRF) in responses to emotional stress: is CRF release a cause or result of fear/anxiety? **CNS Neurol Disord Drug Targets**; v.8, p.459–69, 2009.
- ORLANDI, L. Influência da dieta rica em frutose sobre a hiperalgesia e o comportamento doentio em ratos. Universidade Federal de Alfenas. Alfenas-MG. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). 111f. 2016

OSKVIG, D. 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**. V.26, n4, p.623–634. 2012

OSKVIG, 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 Behav Immun**. V.26, n. 4, p.623-634. 2012

OTTERNESS, I.G. et al. The effects of continuous administration of murine interleukin-1 α in the rat. **Physiol Behav**. 43:797–804, 1988.

OVERSTREET, D.H.; KNAPP, D.J.; BREESE, G.R. Accentuated decrease in social interaction in rats subjected to repeated ethanol withdrawals. **Alcohol Clin Exp Res**. v.26, p. 1259–1268, 2002.

OZAWA, K. et al. Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia. **Biol Psychiatry**. V.59, n.6, p.546–54. 2006

PARKER, V.J.; MENZIES, J.R.; DOUGLAS, A.J. Differential changes in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and prolactin responses to stress in early pregnant mice. **J Neuroendocrinol** V.23. P.1066–78. 2011.

PAUL, L., FRAIFELD, V., KAPLANSKI, J. Evidence supporting involvement of leukotrienes in LPS-induced hypothermia in mice. **Am J Physiol**. 276:R52–8 (Regul Integr Comp Physiol 45) 1999.

PAWLUSKI, J. L. et al. Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging. **Frontiers in Neuroendocrinology**. V.30, n.3, p.343–357. 2009

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

PEIRÓ, J.R. et al. Clinical and laboratory evaluation after intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS). **J. Equine Vet. Sci.**, v.19, p.185-189, 1999.

PEREIRA, A.S.; GIUSTI-PAIVA, A.; VILELA, F.C. Central corticosterone disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. **Neurosci Lett**. V.606, n.88-93, 2015.

PESTANA, F. M. **Avaliação Comportamental e dos Níveis Séricos e Metabolismo Periférico dos Hormônios Tireoidianos em Ratos Submetidos ao Estresse Social Seriado**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Patologia e Ciências Clínicas. 2010

- PIRNIK, Z.; MRAVEC, B.; KISS, A. Fos protein expression in mouse hypothalamic paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei upon osmotic stimulus: colocalization with vasopressin, oxytocin, and tyrosine hydroxylase. **Neurochem Int.** V.45, N.5, P.597-607, 2004.
- PIXLEY, S.K.; DE VELLIS J. Transition between radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. **Developmental Brain Research**, 15: 201-209. 1984
- PIZZAGALLI, D.A. et al. Reduced Caudate and Nucleus Accumbens Response to Rewards in Unmedicated Individuals With Major Depressive Disorder. **Am J Psychiatry.** 166(6):702-10, 2009.
- PLANT, T. M.; ZELEZNIK, A. J. KNOBIL AND NEILL'S PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. **Academic Press.** Volume 2. 4th Edition. 2015
- PLOTSKY, P.M. Facilitation of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion into the hypophysial-portal circulation after activation of catecholaminergic pathways or central norepinephrine injection. **Endocrinology** v.121, p.924-30, 1997
- PRUETT, S.B. Stress and the immune system. **Pathophysiology.** v. 9, n. 3, p.133-153, 2003
- PRUT, L; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology** v. 60061:1- 31, 2003.
- QIN, L. et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. **Glia.**v.55, n.(5):453-62 2007
- QUAN, N.; BANKS, W.A. Brain-immune communication pathways. **Brain Behav Immun.**v.21, n.(6), p.:727-35. 2007
- RAMACHANDRA, R.N., SEHON, A.H., BERCZI, I. Neuro-hormonal host defence in endotoxin shock. **Brain Behav Immun.** V.6 (2), p.157-69. 1992.
- RAMOS, A. et al. A multiple-test study of anxiety-related behaviors in six inbred rat strains. **Behavioral Brain Research** v.85, p.57-69, 1997.
- REQUINTINA, P.J.; OXENKRUG, G.F. Differential effects of lipopolysaccharide on lipid peroxidation in F344 N, SHR rats and BALB/c mice, and protection of melatonin and NAS against its toxicity. **Ann NY Acad Sci.** v. 993:325-33 (discussion 345-329). 2003
- REYES, T.M.; et al. Categorically distinct acute stressors elicit dissimilar transcriptional profiles in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **J Neurosci.** v. 23, n. 13, p. 5607-5616, 2003.
- RIBEIRO, D. E. et al. Inhibition of nitric oxide synthase accentuates endotoxin-induced sickness behavior in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** 103:535-540, 2013.

RICHARDS, I.S. Biotransformation. In: IS Richards. Principles and practice of toxicology in public health. London: Jones and Bartlett. pp. 139-154.2008

RIOUX-DARRIEULAT F., PARANT M., CHEDID L. Prevention of endotoxin induced abortion by treatment of mice with antisera. **Journal of Infectious Diseases**. v.137, n. 1, p.7–13, 1978.

ROCHE, M.; et al. 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.

ROJAS, V.C.T. **Administración intranasal de oxitocina en un modelo de autismo inducido por activación inmune materna con lipopolisacárido durante la gestación**. Dissertação (Mestrado). Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Alfenas-MG. UNIFAL-MG. Alfenas, 2019

ROMANOVSKY, A.A. Signaling the brain in the early sickness syndrome: are sensory nerves involved? **Front Biosci**. V.1; p.9:494-504. 2004.

ROMANOVSKY, A.A., SZEKELY, M. Fever and hyperthermia: two adaptive thermoregulatory responses to systemic inflammation. **Med Hypotheses** v.50, p.219–26, 1998.

ROMERO, R., H. et al. Two-thirds of spontaneous abortion/fetal deaths after genetic midtrimester amniocentesis are the result of a pre-existing subclinical inflammatory process of the amniotic cavity. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 172: 261. 1995.

ROMERO, R.; et al. The role of inflammation and infection in preterm birth. **Seminars in Reproductive Medicine**. v. 25, n. 1, p. 21-39. 2007.

ROSA, P. C. S. et al. Effects of diclofenac and dexamethasone on horse experimental endotoxemia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* vol.55 no.3 Belo Horizonte June 2003.

ROSENSPIRE, A.J.; KINDZELSKII, A.L.; PETTY, H.R. Cutting edge: fever- associated temperatures enhance neutrophil responses to lipopolysaccharide: a potential mechanism involving cell metabolism. **J Immunol**. V.169, N(10). P.:5396-400, 2002.

ROTH, J.; SOUZA, G.E. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Braz J Med Biol Res**. v. 34, n. 3, p. 301-314, 2001.

ROTHWELL, N. J.; HOPKINS, S. J. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. **Trends Neuroscience**, v. 18, p. 130-136, 1995.

RUSSELL, J.A. et al. Pregnancy and opioid interactions with the anterior perithird ventricular input to magnocellular oxytocin neurones. **Prog Brain Res** v.91. P.41–53. 1992

RUUD, J. et al. Inflammation- and tumor-induced anorexia and weight loss require MyD88 in hematopoietic/myeloid cells but not in brain endothelial or neural cells. **FASEB J.** 27, 1973–1980 2013

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

SAMAAN, N. et al. Serum placental lactogen levels during pregnancy and in trophoblastic disease. **J Clin Endocrinol Metab** v.26:1303–8. 1966

SANDMAN, C. A.; KASTIN, A. J. The influence of fragments of the LPH chains on learning, memory and attention in animals and man. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 13, p. 39-60, 1981.

SCHEDLOWSKI, M., ENGLER, H., & GRIGOLEIT, J. S. Endotoxin-induced experimental systemic inflammation in humans: A model to disentangle immune-to-brain communication. **Brain, Behavior, and Immunity**. V.35, p.1–8. 2014

SCHMITZ, T. et al. PDE4 Inhibition Prevents Preterm Delivery Induced by an Intrauterine Inflammation. **J. Immunol.** V.178, p.1115–1121. 2007.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**. 404:661-671, 2000.

SECKL, J.R. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. **Eur. J. Endocrinol.** V.151, P.49—62. 2004

SELMAJ, KW. Tumor necrosis factor-induced proliferation of astrocytes from mature brain is associated with down regulation of glial fibrillary acidic protein mRNA. **Journal of Neurochemistry**, v.57, p. 823-830. 1991.

SELYE, H. Syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature** P.138:32. 1936

SEMMLER, A et al. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. **J Chem Neuroanat.** v. 30, n. 2, p.144-157, 2005.

SHERWOOD, O.D. Relaxin's physiological roles and other diverse actions. **Endocr Rev** v.25:205–34. 2004

SHI, L. et al. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. **J Neurosci.** V.23, n.1, p.297–302. 2003.

SILVA, V.C. influência do hipotireoidismo sobre o comportamento doentio e a resposta febril durante o desafio imunológico. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Universidade Federal de Alfenas. Alfenas-MG. 2015

- SILVA, V.C.; GIUSTI-PAIVA, A. sickness behavior is delayed in hypothyroid mice, **Brain Behav and Imm.** v. 45, p. 109-117, 2015.
- SIMM, B. et al. Effects of prostaglandin E2 on cells cultured from the rat organum vasculosum laminae terminalis and medianpreoptic nucleus. **Neuroscience.** 313:23-35, 2016.
- SLATTERY, D. A.; NEUMANN, I. D. No stress please! Mechanisms of stress hyporesponsiveness of the maternal brain. **Journal of Physiology.** v. 586, p. 377– 385, 2007.
- SLATTERY, M. M.; MORRISON, E J. J. Preterm delivery. **Lancet.** V. 360, p.1489–1497. 2002.
- SMITH, S.E.P. et al. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. **J Neurosci Off J Soc Neurosci.** V.27, n.40, p.10695–702. 2007
- SONCINI et al. Dipyrrone attenuates acute sickness response to lipopolysaccharide in mice. **Neuroscience Letters** v.516, p. 114-118, 2012.
- STEINER, A.A. et al. Cellular and molecular bases of the initiation of fever. **PLoS Biol.** V.4, n.9, p.284, 2006.
- STEINER, A.A.; BRANCO, L.G. Fever and anapyrexia in systemic inflammation: intracellular signaling by cyclic nucleotides. **Front Biosci.** 8:s1398-408, 2003.
- STONE, D. J. Bidirectional transcription regulation of glial fibrillary acidic protein by estradiol in vivo and in vitro, **Endocrinology** v.139, p.3202–3209. 1998
- STONE, E.A. et al. Depressive behavior in mice due to immune stimulation is accompanied by reduced neural activity in brain regions involved in positively motivated behavior. **Biol Psychiatry** v.60, p.803–811, 2006.
- STUSS, M.; WIKTORSKA, J.A.; SEWERYNEK, E. N-acetylserotonin reduces lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro more effectively than melatonin. **Neuroendocrinol Lett.** V.31, n.4, 489–96. 2010
- SUNN, N. et al. Circulating relaxin acts on subfornical organ neurons to stimulate water drinking in the rat. **Proc Natl Acad Sci USA** v.99. P.1701–6. 2002
- SWIERGIEL, A.H., DUNN, A.J. Distinct roles for cyclooxygenases 1 and 2 in interleukin-1-induced behavioral changes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** V.302, 1031– 1036. 2002
- SWIERGIEL, A.H.; DUNN, A.J. Effects of interleukin-1 β and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** 86:651–659, 2007.
- TANCREDI, V. et al. Tumor necrosis factor alters synaptic transmission in rat hippocampal slices. **Neurosci. Lett.**, v. 146, p. 176–178, 1992.

TANG, Y; LE, W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. **Mol Neurobiol.** V.20. 2015

TARR, A.J. et al. Neural and behavioral responses to low-grade inflammation. **Behavioural Brain Research.** V.235, p.334–41, 2012.

TATRO, J.B. Endogenous antipyretics. **Clin Infect Dis.** v. 5, p. 190-201, 2000.

TEIXEIRA, R.C.; ZANGROSSI H.; H.; GRAEFF, F.G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav,** v. 65, p. 571-576, 2000.

TERRAZZINO, S.; PEREGO, C.; DE SIMONI, M.G. Noradrenaline release in hypothalamus and ACTH secretion induced by central interleukin-1beta. **Neuroreport;** v.6, p.2465–8. 1995

TOLLNER, B. The role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and metabolic responses of rats to intraperitoneal injection of a high dose of lipopolysaccharide. **Pflugers Arch.,** v.440, p. 925–932, 2000.

TOURNELL, C.E.; BERGSTROM, R.A.; FERREIRA, A. Progesterone-induced agrin expression in astrocytes modulates glia-neuron interactions leading to synapse formation, **Neuroscience** v.141, p.1327–1338. 2006

TOWNSEND, B. E. et al. Dietary broccoli mildly improves neuroinflammation in aged mice but does not reduce lipopolysaccharide-induced sickness behavior. **Nutrition Research.** V.34, n.11,p. 990–999. 2014

TOYAMA, R. P. **Avaliação comportamental e bioquímica de camundongos submetidos a um modelo experimental de inflamação associada a criolesão.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Universidade Federal de Santa Catarina. UFSC. 2012.

TURNBULL, A.V., LEE, S., RIVIER, C. Mechanisms of hypothalamic–pituitary–adrenal axis stimulation by immune signals in the adult rat. **Ann N Y Acad Sci;** v.840, p.434–43. 1998.

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

UENO, R. et al. Role of prostaglandin D2 in the hypothermia of rats caused by bacterial lipopolysaccharide. **Proc Natl Acad Sci USA** v.79:6093–7, 1982

URAKUBO, A. et al. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. **Schizophrenia Research.** v. 47, n. 1, p. 27-36. 2001.

USHIKUBI, F. et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Nature.** v.395, p.281–284, 1998.

- VALLIERES, L. et al. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin6. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 2, p. 486-492, 2002.
- VAN DE KAR, L.D.; BLAIR, M.L. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. **Front Neuroendocrinol.** V.20, n.1, p.1-48, 1999.
- VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49 (3), 549-554. 1994.
- VIEIRA, F. V. **Exposição pré-natal ao lipopolissacarídeo como modelo translacional de transtorno do espectro autista.** Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Federal de Alfenas. Alfenas-MG. 2017.
- VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid receptor agonist disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. **Behavioural Brain Research** v.263, p.190-197, 2014.
- VILELA, F.C.; SONCINI, R.; GIUSTI-PAIVA, A. Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **J Ethnopharmacol.** v. 124, n. 2, p. 325-327. 2009.
- WADDELL, B.J.; ATKINSON, H.C. Production rate, metabolic clearance rate and uterine extraction of corticosterone during rat pregnancy. **J Endocrinol** V.143. p.183–90. 1994
- WANG, J. et al. Effects of homologous interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha on the core body temperature of mice. *Neuroimmunomodulation* 1997; 4:230–6.
- WANG, J., ANDO, T., DUNN, A.J. Effects of homologous interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha on the core body temperature of mice. **Neuroimmunomodulation** v.4, p.230–6, 1997.
- WANG, X. et al. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. **Seminars in fetal & neonatal medicine**, v. 11, n. 5, p. 343-353, 2006
- WANNER, S.P.; YOSHIDA, K.; KULCHITSKY, V.A. et al. Lipopolysaccharide-induced neuronal activation in the paraventricular and dorsomedial hypothalamus depends on ambient temperature. **PLoS One.** v. 8, p. e75733, 2013.
- WELBERG, L.A.M.; SECKL, J.R. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. **J Neuroendocrinol** v.13:113–28 2001
- WELBERG, L.A.M.; SECKL, J.R.; HOLMES, M.C. Inhibition of 11beta- hydroxysteroid dehydrogenase, the foetoplacental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. **Eur J Neurosci** V.12. p.1047–54 2000

WICK, G.; HU, Y.; SCHWARZ, S.; KROEMER, G. Immunoendocrine communication via the hypothalamo–pituitary–adrenal axis in autoimmune diseases. **Endocrine Reviews**, v. 14, p. 539–563, 1993.

WILLIAMS, M. T. et al. Changes in the hormonal concentrations of pregnant rats and their fetuses following multiple exposures to a stressor during the third trimester. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 21, p. 403-414, 1999.

WILLNER, P. et al. Animals models of anhedonia. In: **Anxiety, Depression, and Mania. Animal Models of Psychiatric Disorders**, edited by Soubrié P. Basel, Switzerland: Karger p. 71-99. 1991

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. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. V.57, p.17–30. 2015

WISCHHOF, L. et al. Maternal lipopolysaccharide treatment differentially affects 5-HT_{2A} and mGlu_{2/3} receptor function in the adult male and female rat offspring. **Neuropharmacology**. V.97, 275–288. 2015.

WOFCHUK, S.T.; RODNIGHT, R. Age- dependent changes in the regulation by external calcium ions of the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in slices of rat hippocampus. **Developmental Brain Research**. V.85, p. 181-186. 1995

XU, D.X. et al. Tumor necrosis factor alpha partially contributes to lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal growth restriction and skeletal development retardation in mice. **Toxicol Lett** v.163, p. 20-29. doi:10.1016/j.toxlet. 2005.09.009. PubMed: 16263228. 2006

YANG, H.P. et al. Nonsocial functions of hypothalamic oxytocin. **Neurosci**. 2013:179272, 2013.

YOON, B. H.; PARK, C. W.; CHAIWORAPONGSA ,T. Intrauterine infection and the development of cerebral palsy. **BJOG**. V.110, p.124–127. 2003.

ZANGROSSI, H.J.R.; GRAEFF, F.G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, 2014.

ZARROW, M. X.; PHILPOTT, J. E.; DENENBERG, V. H. Passage of ¹⁴C-4- corticosterone from the rat mother to the foetus and neonate. **Nature**, v. 226, p. 1058- 1059, 1970.

ZARROW. S. et al. Maternal behaviour in the rabbit: evidence for an endocrine basis of maternal nest building and additional data on maternal nest building in the Dutch-belted race. **J Reprod Fertil** v.2. P.152–62. 1961

ZAVAN, B. **Aspectos morfofisiológicos e comportamentais após inflamação induzida por LPS durante a gestação de camundongos**. Dissertação (Mestrado). Programa Multicêntrico de

Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG. Alfenas- MG, 2011.

ZAVAN, B. et al. Immunohistochemical demonstration of blood vessels alpha-actin down-regulation in LPS-treated pregnant mice. **Physiol Res.** Dec 14;61(5):551-3. Epub 2012 Aug 8. 2012

ZAVAN, B., AMARANTE-PAFFARO, A.M., JOAZEIRO, P.P, YAMADAT, A.T. PAFFARO JR, V.A. Adhesion Molecules in mouse pregnant uterus. **The Anatomical Record.** 293: 1081-1088, 2010.

ZHAO L. et al. Reactive oxygen species contribute to lipopolysaccharide-induced teratogenesis in mice. **Toxicol Sci** v.103, p.149-157. PubMed: 18281254. 2008

ZHU, D.N.; XUE, L.M.; LI, P. Cardiovascular effects of microinjection of corticoids and antagonists into the rostral ventrolateral medulla in rats. **Blood Press** v.4. P.55–62. 1995.

ZIEGLER; D.R.; HERMAN, J.P. Neurocircuitry of stress integration: anatomical pathways regulating the hypothalamo-pituitary-adreno-cortical axis of the rat. **Integr Comp Biol.** V.42, p.541–51. 2002

ANEXO A



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro de Silva, 705. Alfenas/MG. CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1663

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 644/2015, sob responsabilidade de Alexandre Giusti-Paiva, referente ao projeto "Avaliação das respostas psiconeuroendócrinas ao estresse imunológico durante a gestação de ratos", está em conformidade com o disposto na Lei nº 11.794/08 e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIFAL) em 02 de julho de 2015.

Alfenas, 03 de julho de 2015.

Prof.ª Dr.ª Estela Regina de Oliveira
Presidente CEUA/UNIFAL

APÊNDICE A

Tabela 19- Valores referentes à distância total percorrida de animais prenhes expostos ao teste do campo aberto após a indução de endotoxemia por LPS

Dia de gestação/	Média; Controle	LPS
Desvio padrão e N		
6DG	Média= 3187 ±1415; N= 17	Média= 2017±809,3; N= 22
9DG	Média=2803; ±515,7; N=10	Média= 1561± 1092; N= 7
12DG	Média= 3463±676,1; N=19	Média= 1677± 927,1; N=19
15DG	Média= 2255± 601; N=11	Média= 1038± 687,4; N=11
18DG	Média= 2850± 511,3; N=9	Média=2547± 1291; N=11
20DG	Média= 1618± 570,4; N=13	Média= 1269± 583,2; N=13

Fonte: do autor

Tabela 20 - Valores obtidos ao analisar o tempo imóvel de animais prenhes expostos ao teste do campo aberto após a indução de endotoxemia por LPS

Dia de gestação/	Média; Controle	LPS
Desvio padrão e N		
6DG	Média= 48,03± 28,55; N=16	Média= 75,45± 43,04; N=23
9DG	Média=55,88± 15,31; N=10	Média= 136,4± 93,88; N=8
12DG	Média= 38,53± 17,23; N=19	Média= 128± 66,7; N=19
15DG	Média= 76,9± 25; N=11	Média= 156,4± 76,98; N=13
18DG	Média= 62,86± 32,84; N=12	Média=83,45± 38,52; N=11
20DG	Média= 102,1± 44,8; N=13	Média= 123,2± 52,09; N=13

Fonte: do autor

Tabela 21 - Dados referentes ao delta da ingestão alimentar em 24 horas em animais prenhes submetidos ao desafio imunológico

Dia de gestação/	Média; Controle	LPS
Desvio padrão e N		
6DG	Média= 19,27± 5,092; N=19	Média= 11,41± 6,962; N=22
9DG	Média=20,77± 7,697; N=9	Média= 8,467± 10,34; N=11
12DG	Média= 22,75± 4,634; N=19	Média= 4,903± 4,936; N=19
15DG	Média= 25,39± 3,462; N=11	Média= 8,466± 7,638; N=16
18DG	Média= 24,78± 5,816; N=10	Média=9,114± 8,646; N=11
20DG	Média= 19,81± 6,642; N=13	Média= 17,7± 7,646; N=13

Fonte: do autor

Tabela 22- Valores referentes ao efeito do LPS após 2 horas de sua aplicação na interação social de animais prenhes ao longo da gestação

Dia de gestação/	Média; Controle	LPS
Desvio padrão e N		
6DG	Média= 39,63± 9,944; N=8	Média= 34,8± 11,73; N=8
9DG	Média= 52,89± 20,22; N=11	Média= 41,4± 22,95; N=10
12DG	Média= 98,29± 41,27; N=8	Média= 41,25± 33,1; N=11
15DG	Média= 37,88± 24,01; N=10	Média= 50,15± 44,58; N=11
18DG	Média= 70,95± 44,86; N=8	Média= 58,26± 29,45; N=8
20DG	Média= 51,12± 30,84; N=12	Média= 35,29± 18,84; N=12

Fonte: do autor

Tabela 23- Valores referentes à preferência por sacarose em animais prenhes submetidos ao tratamento com LPS em diferentes dias ao longo da gestação

Dia de gestação/ Média; Controle	LPS
Desvio padrão e N	
6DG	Média= 97,76± 2,147; N=15
9DG	Média= 84,82± 17,54; N=15
12DG	Média= 67,58± 32,9; N=9
15DG	Média= 99,02± 0,6503; N=9
18DG	Média= 72,19± 28,87; N=11
20DG	Média= 97,94± 5,117; N=11
	Média= 66,46± 28,66; N=10
	Média= 97,16± 2,11; N=8
	Média= 92,4± 11,53; N=8
	Média= 98,5± 1,875; N=12
	Média= 94,5± 7,921; N=13

Fonte: do autor

Tabela 24- Valores referentes à análise do índice térmico de animais nos 12DG e 20DG submetidos à endotoxemia através da administração de LPS (200 µg/Kg) no tempo entre 30-120 minutos.

Dia de gestação/ Média; Controle	LPS
Desvio padrão e N	
12DG	Média=-0,9363±30,408; N= 11
20DG	Média=-66,868±44,297; N= 9
	Média=-14,208±27,443; N= 9
	Média=-34,272±37,286; N= 10

Fonte: do autor

Tabela 25 - Valores referentes à análise do índice térmico de animais nos 12DG e 20DG submetidos à endotoxemia através da administração de LPS (200 µg/Kg) no tempo entre 150-250 minutos.

Dia de gestação/ Média; Controle	LPS
Desvio padrão e N	
12DG	Média= -0,347±29,595; N= 10
20DG	Média= 45,729±38,012; N= 8
	Média=-33,855±46,558; N= 9
	Média=-45,176±38,175; N= 10

Fonte: do autor

Tabela 26- Efeito do LPS administrado i.p 2 horas antes da perfusão e coleta dos cérebros em animais prenhes no 12° DG e 20° DG sobre a expressão de c-Fos em neurônios de diversas regiões encefálicas

	Controle 12° DG	LPS 12° DG	Controle 20° DG	LPS 20° DG
BNST	172,28±56,91; N=7	393,0±110,09; N=6	169,8± 78,02; N=7	193,57±134,047; N=7
MPOA	166,5±23,95; N=7	290,83±15,69; N=6	148,28±33,26; N=7	155,16±41,14; N=7
LS	209,28±22,34; N=7	384,33±60,22; N=6	172,57±33,47; N=7	245,2±52,23; N=5
PCx	254,83±32,46; N=6	432,4±35,02; N=6	239,33±47,51; N=6	273,57±50,32; N=7
PVN	90,14±39,60; N=7	249,85±78,82; N=7	80,57±39,48; N=7	93,0±52,26; N=7
SON	21,42±6,13; N=7	73,28±30,66; N=7	29,28±15,35; N=7	25,71± 7,91; N=7

Fonte: Do autor.

Tabela 27. Efeito do desafio imunológico através da administração de LPS (200 µg/Kg) em ratas prenhes no 12° DG e 20°DG sobre a concentração plasmática de citocinas

	Controle 12° DG	LPS 12° DG	Controle 20° DG	LPS 20° DG
TNF-α	458,874±417,185; N=8	1434,77±1275,097; N=8	609,427±345,55; N=11	540,159±257; N=12
IL-1β	835,904±365,514; N=9	1141,941±591,379; N=8	1368,351±645,507; N=11	1021,405±581,22; N=12
IL-6	1100,425±1300,92; N=9	1119,653±849,915; N=8	1330,3789±1262,884; =11	1326,461±1509,388; N=11

Fonte: Do autor.

Tabela 28 - Valores referentes ao efeito do LPS administrado em ratas prenhes no 12°DG e 20°DG sob a concentração plasmática de corticosterona analisada após 2 horas os tratamentos

	Controle 12° DG	LPS 12° DG	Controle 20° DG	LPS 20° DG
Corticosterona	27,129±10,434; N=7	52,768±21,978; N=7	31,616±13,771; N=10	45,535±11,207; N=10

Fonte: Do autor.

Tabela 29- Valores sobre a dosagem proteica no hipotálamo de ratas prenhes submetidas ao tratamento com LPS em diferentes dias de gestação

	Controle 12° DG	LPS 12° DG	Controle 20° DG	LPS 20° DG
IBA-1	100,005±13,956; N=5	86,727±18,234; N=5	94,587±18, N=5	102,051±16,416; N=5
GFAP	100±8,445; N=4	108,644±9,107; N=4	76,601±46,477; N=4	139,487±117,403; N=4

Fonte: Do autor.

Tabela 29- Valores referentes à ingestão alimentar em 2, 4, 6 e 24 horas após a aplicação do LPS em diferentes dias de gestação

	Controle 6 DG (N=19)	LPS 6DG (N= 22)	Controle 9 DG (N=10)	LPS 9DG (N=11)	Controle 12DG (N=19)	LPS 12DG (N=19)	Controle 15DG (N=11)	LPS 15DG (N=16)	Controle 18 DG (N=10)	LPS 18 DG (N=11)	Controle 20DG (N=13)	LPS 20 DG (N=13)
2 H	0,742±1,241	0,302±0,731	0,59±0,82	0,034±0,046	0,446±0,661	0,426±1,491	0,978±1,071	0,268±0,761	1,108±0,727	0,445±0,767	0,553±1,035	0,544±0,963
4 H	0,498±1,625	0,4713±0,882	1,166±1,405	0,075±0,079	1,067±1,232	0,501±1,484	2,374±1,794	0,412±1,226	2,129±1,116	0,785±1,263	0,935±1,283	1,506±1,787
6 H	1,544±1,934	1,064±1,452	1,99±1,420	0,050±1,389	1,645±1,571	0,697±1,695	4,704±3,294	0,614±1,255	3,377±1,192	0,852±1,256	1,726±1,858	1,996±1,891
24 H	19,266±5,092	11,77±7,533	20,408±7,346	8,464±10,339	22,751±4,634	4,9±4,936	25,394±3,462	8,466±7,638	24,776±5,816	9,114±8,646	19,809±6,642	17,696±7,646