

UNIVERSIDADE DE FEDERAL DE ALFENAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

FERNANDO VITOR VIEIRA

**EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO LIPOPOLISSACARÍDEO PROMOVE
COMPORTAMENTO TIPO-AUTISTA NA PROLE: PARTICIPAÇÃO DE
MODULADORES INFLAMATÓRIOS**

ALFENAS-MG

2021

FERNANDO VITOR VIEIRA

**EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO LIPOPOLISSACARÍDEO PROMOVE
COMPORTAMENTO TIPO-AUTISTA NA PROLE: PARTICIPAÇÃO DE
MODULADORES INFLAMATÓRIOS**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva.

ALFENAS-MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Vieira, Fernando Vitor
V658e Exposição pré-natal ao lipopolissacarídeo promove comportamento tipotista na prole: participação de moduladores inflamatórios / Fernando Vitor Vieira – Alfenas, MG, 2021.
245 f.: il. –

Orientador: Alexandre Giusti Paiva.
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2022.
Bibliografia.

1. Cortisona Redutase. 2. Resposta Cardiovascular. 3. Nimesulide.
4. Betametasona. I. Paiva, Alexandre Giusti. II. Título.

CDD- 616

Ficha Catalográfica elaborada por Mariom Cesar da Silva
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735

FERNANDO VITOR VIEIRA

LIPOPOLISSACARÍDEO APLICADO EM RATAS DURANTE A PREENHEZ REDUZ A CONCENTRAÇÃO DE 11 β -HSD-2 NA PLACENTA E CAUSA COMPORTAMENTO TIPO-AUTISTA NOS FILHOTES MACHOS

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

Aprovada em: 26 de novembro de 2021

Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Rafael Simone Saia (FMRP)
Instituição: Universidade de São Paulo
FMRP

Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias
Instituição: Universidade de São Paulo
FMRP

Prof. Dr. Thiago Bertan Kirsten
Instituição: Universidade Paulista
UNIP

Profa. Dra. Evelin Capellario Cárnio
Instituição: Universidade de São Paulo
FMRP



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Giusti Paiva, Professor do Magistério Superior**, em 26/11/2021, às 17:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Simone Saia, Usuário Externo**, em 26/11/2021, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Berti Kirsten, Usuário Externo**, em 26/11/2021, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Evelin Capellari Cárnio, Usuário Externo**, em 26/11/2021, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Lucila Leico Kagohara Elias, Usuário Externo**, em 26/11/2021, às 17:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do



[Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0639554** e o código CRC **B538393B**.

“Dedico este trabalho a minha família e a
minha noiva que sempre me apoiaram”

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente a Deus por me agraciar com a oportunidade de trabalhar fazendo ciência.

A minha família por me apoiar neste caminho, sem este alicerce nada poderia ser construído.

A minha noiva Juliana por me apoiar nos momentos em que o fardo era mais pesado.

Ao Professor Dr. Alexandre Giusti Paiva por abrir as portas de do laboratório e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

A Professora Dr^a. Fabiana Vilela Giusti por toda ajuda prestada durante a execução deste trabalho.

Professor Alexandre e a Professora Fabiana, agradeço pela amizade construída durante estes quase 6 anos de convivência dentro e fora do laboratório, confiando a mim e minha noiva o apadrinhamento do pequeno Henrique o qual nos faz muito felizes.

A todos os colegas, alunos de IC, TCC que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho, por todos os momentos de descontração, churrascos, cafés...

Ao técnico José Reis pelos cuidados com nossos animais.

Ao Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, a UNIFAL.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto”

(CARL SAGAN, 1979)

RESUMO

O transtorno do espectro autista (TEA) é um transtorno do neurodesenvolvimento de etiologia desconhecida que feta 1% da população sendo mais comum em homens. Caracterizado por, déficit na comunicação, interação social, avaliação de risco, além de comportamentos repetitivos e estereotipados, e interesse restrito a objetos e assuntos. No presente estudo investigamos através do modelo animal se infecções pré-natais possam ser a causa dos comportamentos tipo-autistas. O modelo proposto visou mimetizar infecções em ratas durante a gestação através da aplicação de lipopolissacarídeo (LPS) intraperitonealmente (i.p.). Concomitantemente ao LPS foram aplicados anti-inflamatórios não esteroidais ou esteroidais i.p. para prevenção dos sintomas causados pelo LPS. O presente estudo foi dividido em duas partes, onde primeiramente as ratas foram tratadas com LPS e anti-inflamatório, e 2 e 6h depois passaram por testes comportamentais, e logo depois foram eutanasiadas para coleta do plasma materno, o cérebro fetal e líquido amniótico onde foram quantificadas as citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β e placenta onde foi quantificada a expressão da enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD-2). Em um segundo momento, outro grupo de ratas prenhas foram tratada da mesma maneira que as anteriores e foi aguardado o nascimento dos filhotes. Estes filhotes foram pesados e suas ninhadas padronizadas em 4 machos e 4 fêmeas. Os filhotes machos passaram por testes comportamentais durante a fase pré-púbere, púbere e fase adulta. O LPS aplicado durante a prenhez causou comportamento doentio nas ratas e provocou abortos. Além disso os filhotes machos apresentaram comportamentos tipo-autistas como, déficits na comunicação e interação social, comportamento tipo-ansioso e aumento da resposta autonômica, evidenciado pela elevação da pressão arterial durante teste de estresse por contenção. O anti-inflamatório não esteroidal preveniu alguns dos sintomas de comportamento doentio nas ratas mas não reduziu os abortos, porém preveniu alguns comportamentos tipo-autistas na prole. Já o anti-inflamatório esteroidal preveniu os sintomas de comportamento doentio e os abortos, no entanto provocou comportamento tipo-autista na prole da mesma forma que o LPS.

Palavras chave: 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2; resposta cardiovascular; nimesulide; betametasona.

ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder of unknown etiology that affects 1% of the population and is more common in men. Characterized by deficits in communication, social interaction, risk assessment, in addition to repetitive and stereotyped behaviors, and restricted interest in objects and subjects. In the present study, we investigated through the animal model whether prenatal infections could be the cause of autistic-like behaviors. The proposed model aimed to mimic infections in rats during pregnancy through the application of lipopolysaccharide (LPS) intraperitoneally (i.p.). Concomitantly with LPS, non-steroidal or steroidal anti-inflammatory drugs were applied i.p. to prevent symptoms caused by LPS. The present study was divided into two parts, where first the rats were treated with LPS and anti-inflammatory, and 2 and 6 hours later they underwent behavioral tests, and soon after they were euthanized for collection of maternal plasma, fetal brain and amniotic fluid where cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β and placenta where the expression of the enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β -HSD-2) was quantified. In a second moment, another group of pregnant rats were treated in the same way as the previous ones and the birth of the pups was awaited. These pups were weighed and their litters standardized into 4 males and 4 females. Male pups underwent behavioral testing during pre-pubertal, puberty and adulthood. LPS applied during pregnancy caused sickness behavior in the rats and caused abortions. In addition, male pups showed autistic-like behaviors such as deficits in communication and social interaction, anxious-like behavior and increased autonomic response, as evidenced by the elevation of blood pressure during a restraint stress test. The non-steroidal anti-inflammatory prevented some of the symptoms of unhealthy behavior in the rats but did not reduce abortions, but it did prevent some autistic-like behavior in the offspring. The steroidal anti-inflammatory, on the other hand, prevented the symptoms of sickness behavior and abortions, however it provoked autistic-like behavior in the pups in the same way as LPS.

Keywords: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2; cardiovascular response; nimesulide; betamethasone

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

11 β -HSD-2	11 β -hidroxisteroide desidrogenase tipo 2
AA	ácido aracdônico livre
Alim	alimentando
AVP	ácido valpróico
AS	aceite de solicitações
BET	Betametasona
bpm	batimentos por minuto
CA	campo aberto
CB	comportamento de brincar
CBA	cumulado no buraco alvo
CBO	cumulado no buraco oposto
Ch	choque
Cif	cifose
CMT	comportamento materno total
CN	construindo o ninho
CNMT	comportamento não materno total
Cong	congelamento
COX-2	cicloxigenase tipo 2
CQA	cumulado no quadrante alvo
CQO	cumulado no quadrante oposto

d	d de Cohen
Dist	distância
DG	dia de gestação
DNP	dia pós-nascimento
DSM	manual de diagnostico estatístico
FBA	frequência no buraco alvo
FBO	frequência no buraco oposto
FQA	frequência no quadrante alvo
FQO	frequência no quadrante oposto
E2	eucazinaóide tipo 2
EAT	exploração anti-tigmotática
EC	exploração do centro
EFN	explorando fora do ninho
EOF	exploração do objeto familiar
EON	exploração do objeto novo
EPC	estresse por contenção
Expl	exploração
FC	frequência cardíaca
FCC	frequência de cruzamentos para o centro
FNNE	fora do ninho não explorando
GFAP	proteína ácida fibrilar glial

h	horas
HHA	eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HEP	heparinizada
EPM	erro padrão da média
Erros	número de buracos errados
Est LEC	esticadas no labirinto em cruz
IA	ingestão alimentar
IBA-1	molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado tipo 1
IC	índice de confiança
IL-1 β	interleucina tipo 1 β
IL-6	interleucina tipo 6
IN	intranasal
IP	intraperitoneal
IR	índice de reconhecimento
IS	interação social
IV	intravenoso
Lamb	lambidas
Lat	latência
LatBO	latência para o buraco oposto
LC	locus coeruleus
LEB	labirinto espacial de Barnes

LEC	labirinto em cruz elevado
Limp	limpando
LOX	lipoxigenase
LPS	lipopolissacarídeo
Min	minutos
N Ch	não choque
NFKB	fator nuclear kappa B
NFN	número de filhotes nascidos
NIM	nimesulide
NTS	núcleo do trato solitário
OR	odds rattoo (chance de um evento ocorrer)
PAM	pressão arterial média
Pass	passiva
Pers	perseguido
PFA	paraformol aldeído
PFN	peso do filhote ao nascer
P/G	perda ou ganho de peso
PGE	prostaglandina
Pg/mg	picograma miligrama
Pg/ml	picograma mililitros
PLA2	fosfolipase A tipo 2

POLY:IC	polinossílico: ácido policitídílico
PPI	inibição pre-pulso
PTN	peso total da ninhada
RO	reconhecimento de objeto
SAL	solução salina a 0,9%
SC	subcutânea
SNA	sistema nervoso autonômico
SNC	sistema nervoso central
Sob	sobre os filhotes
Solic	solicitações
TEA	transtorno do espectro autista
TB	tábua de buracos
TBE	tribromoetanol
TLR-2	receptor tipo toll 2
TLR-4	receptor tipo toll 4
TNF- α	fator de necrose tumoral α
Vus	vocalização ultrassônica
Vus av	vocalização ultrassônica aversiva
χ^2	chi-quadrado
ω^2	ômega quadrado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comportamentos tipo autista	39
Figura 2 - Ação do LPS na mãe e no feto	46
Figura 3 - Delineamento experimental com as ratas prenhas	52
Figura 4 - Delineamento experimental com os filhotes durante pré-púberes e púberes	53
Figura 5 - Delineamento experimental com os filhotes durante a vida adulta ...	53
Figura 6 - Prejuízos causados pelo LPS nas ratas prenhas e na prole.....	215
Figura 7 - Ratas que abortaram	215
Figura 8 - Comparação entre os grupos pré-tratados e tratados quanto a prevenção dos comportamentos nas ratas prenhas e na prole.....	216
Figura 9 - Expressão da enzima 11- β HSD-2 na placenta de ratas que receberam LPS e que receberam BET+LPS.....	216

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1 - Campo aberto	54
Fotografia 2 - Estação de gravação de vocalizações	57
Fotografia 3 - Caixa montada para o homing	58
Fotografia 4 - Tábua de buracos	59
Fotografia 5 - Labirinto em cruz elevado	60
Fotografia 6 - Caixa montada para o teste de comportamento de brincar	61
Fotografia 7 - Labirinto de Barnes	62
Fotografia 8 - Aparato montado para o teste de reconhecimento de objeto....	63
Fotografia 9 - Campo montado para o teste de interação social	64
Fotografia 10 - Aparato para contenção	65
Fotografia 11 - Aparato de choque para o teste de medo condicionado ao contexto	68
Fotografia 12 - Mostrando a área do locus coeruleus com neurônios imunorreativados para C-fos pós teste de estresse por contenção em filhotes adultos de ratas que receberam LPS ou SAL no GD16.....	111
Fotografia 12 - Mostrando a área do trato solitário com neurônios imunorreativados para C-fos pós teste de estresse por contenção em filhotes adultos de ratas que receberam LPS ou SAL no GD16.....	111

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Resultado quanto ao desenvolvimento do comportamento doentio das ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	71
Gráfico 2 - Resultados quanto as concentrações de citocinas plasmáticas das ratas prenhas e do cérebro fetal 2h após receberem tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	73
Gráfico 3 - Expressão da enzima 11 β -HSD-2 na placenta 6h após o tratamento com LPS ou SAL.....	75
Gráfico 4 - Resultado a razão quanto ao número de aborto ou não abortos causados pelo LPS em comparação ao grupo SAL.....	76
Gráfico 5 - Resultados quanto aos abortos causados pelo LPS.	78
Gráfico 6 - Resultados quanto as ninhadas das ratas tratadas com LPS ou SAL durante a prenhez.	80
Gráfico 7 - Resultados quanto aos cuidados maternos e não maternos de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	82
Gráfico 8 - Resultados quanto o comportamento dos filhotes machos pré-púberes de ratas que receberam tratamento com LPS ou LPS no DG16.....	85
Gráfico 9 - Resultados quanto ao comportamento de brincar dos filhotes machos de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	88
Gráfico 10 - Resultados quanto a aprendizado durante os treinos no teste de Barnes de filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.	90
Gráfico 11 - Resultados dos parâmetros avaliados no teste de aprendizado no dia 6 no teste de Barnes pelos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPs ou SAL no DG16.	93

Gráfico 12 - Resultados dos parâmetros avaliados no teste de reversão do aprendizado no dia 10 no teste de Barnes pelos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	95
Gráfico 13 - Resultados dos parâmetros avaliados durante o teste de campo aberto de 20 min pelos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	98
Gráfico 14 - Resultados obtidos durante o teste de reconhecimento de objetos dos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.	102
Gráfico 15 - Resultados quanto a interação social dos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.	104
Gráfico 16 - Resultados quanto ao medo condicionado ao contexto dos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	106
Gráfico 17 - Resultados quanto a PAM e FC dos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.	108
Gráfico 18 - Núcleos contados em 3 cortes distintos da dentro da mesma área e no mesmo encéfalo.....	110
Gráfico 19 - Resultado quanto ao desenvolvimento do comportamento doentio das ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	113
Gráfico 20 - Resultados quanto as concentrações de citocinas plasmáticas das ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS no DG16 e do cérebro fetal.....	116
Gráfico 21 - Resultado da razão quanto ao número de aborto ou não, abortos causados pelo pré-tratamento com V ou NIM e pelo tratamento com LPS ou SAL.....	119
Gráfico 22 - Resultados quanto aos abortos causados pelo LPS de ratas pré-tratadas com NIM.....	121

Gráfico 23 - Resultados quanto as ninhadas das ratas pré-tratadas com NIM e tratadas com LPS ou SAL no DG16.	123
Gráfico 24 - Resultados quanto aos cuidados maternos e não maternos de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.	125
Gráfico 25 - Resultados quanto o comportamento dos filhotes machos durante a infância e adolescência, filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou LPS no DG16.	130
Gráfico 26 - Resultados quanto ao comportamento de brincar dos filhotes machos de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	133
Gráfico 27 - Resultados quanto a aprendizado durante os treinos no teste de barnes de filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	136
Gráfico 28 - Resultados dos parâmetros avaliados no teste de aprendizado no dia 6 no teste de Barnes pelos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.	139
Gráfico 29 - Resultados dos parâmetros avaliados no teste de reversão do aprendizado no dia 10 no teste de Barnes pelos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.	142
Gráfico 30 - Resultados dos parâmetros avaliados durante o teste de campo aberto de 20 min pelos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16. ...	147
Gráfico 31 - Resultados obtidos durante o teste de reconhecimento de objetos dos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e LPS ou SAL no DG16.	150

Gráfico 32 - Resultados quanto a interação social dos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.	153
Gráfico 33 - Resultado quanto ao desenvolvimento do comportamento doentio das ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	156
Gráfico 34 - Resultados quanto as concentrações de citocinas plasmáticas das ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS no DG16 e do cérebro fetal.....	159
Gráfico 35 - Quantificação da enzima 11 β -HSD-2 na placenta 6h após o pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com SAL ou LPS.	162
Gráfico 36 - Resultado a razão quanto ao número de aborto ou não abortos causados pelo pré-tratamento com V ou BET e tratamento com LPS ou SAL.....	163
Gráfico 37 - Resultados quanto aos abortos causados pelo LPS de ratas pré-tratadas com BET.....	165
Gráfico 38 - Resultados quanto as ninhadas das ratas pré-tratadas com SAL ou BET e tratadas com LPS ou SAL no DG16.....	167
Gráfico 39 - Resultados quanto aos cuidados maternos e não maternos de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou SAL durante a prenhez.....	169
Gráfico 40 - Resultados quanto o comportamento dos filhotes machos durante a infância e adolescência, filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou LPS no DG16.	174
Gráfico 41 - Resultados quanto ao comportamento de brincar dos filhotes machos de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	178

Gráfico 42 - Resultados quanto a aprendizado durante os treinos no teste de Barnes de filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.	180
Gráfico 43 - Resultados dos parâmetros avaliados no teste de aprendizado no dia 6 no teste de Barnes pelos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.	182
Gráfico 44 - Resultados dos parâmetros avaliados no teste de reversão do aprendizado no dia 10 no teste de Barnes pelos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.	185
Gráfico 45 - Resultados dos parâmetros avaliados durante o teste de campo aberto de 20 min pelos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16. ...	190
Gráfico 46 - Resultados obtidos durante o teste de reconhecimento de objetos dos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e LPS ou SAL no DG16.	193
Gráfico 47 - Resultados quanto a interação social dos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.	196

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao comportamento doentio das ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.	72
Tabela 2 - Análise através do teste t-student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto aos níveis de citocinas plasmáticas das ratas prenhas e do cérebro fetal 2h após receberem tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	74
Tabela 3 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto a quantificação da enzima 11 β -HSD-2 na placenta 6h após o tratamento com LPS ou SAL.....	75
Tabela 4 - Análise dos dados de Qui-quadrado das ratas que abortaram ou não.	77
Tabela 5 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao comportamento doentio das ratas que receberam tratamento com LPS no DG16 e abortaram ou não.	79
Tabela 6 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao nascimento da prole de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.	80
Tabela 7 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto aos cuidados maternos pós-nascimento da prole de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	83

Tabela 8 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao comportamento dos filhotes na infância e adolescência de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	86
Tabela 9 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao crescimento dos filhotes na infância e adolescência, de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	87
Tabela 10 - Análise através da ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao crescimento dos filhotes na infância e adolescência, de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	87
Tabela 11 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto aos parâmetros no comportamento de brincar dos filhotes durante a adolescência, de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG	89
Tabela 12 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao resultado de aquisição e reversão do aprendizado durante os treinos.	91
Tabela 13 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao resultado de aquisição e reversão do aprendizado durante os treinos.	92
Tabela 14 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto aos resultados do aprendizado da localização da caixa destino.....	94
Tabela 15 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto aos resultados da reversão do aprendizado da localização da caixa destino.....	96

Tabela 16 - Análise através do teste t de student das médias dos valores do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto aos resultados do teste de CA durante 20 min para verificação do comportamento tipo-ansios	99
Tabela 17 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado valores quanto ao resultado do teste de CA a cada 5 min para verificação do comportamento tipo-ansioso.....	100
Tabela 18 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto aos resultados do teste de reconhecimento de objetos de 2h e 24h para verificação da memória de curto e longo prazo.....	103
Tabela 19 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto aos resultados do teste de interação social.	105
Tabela 20 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao resultado do teste de medo condicionado ao contexto.	106
Tabela 21 - Análise através do Anova de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto a resposta cardiovascular durante o teste de estresse por contenção.	109
Tabela 22 - Analise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen dos neurônios imunorreativos para C-fos pós teste de estresse por contenção dos filhotes adultos de ratas LPS ou SAL.	110
Tabela 23 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao comportamento doentio das ratas que recebem pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	114

Tabela 24 - Análise através da ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos níveis de citocinas no plasma e cérebro fetal 2h após as ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	117
Tabela 25 - Análise dos dados de Qui-quadrado das ratas que abortaram ou não.	120
Tabela 26 - Análise através do teste t de student dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao comportamento doentio das ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS no DG16 e abortaram ou não.	122
Tabela 27 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao nascimento da prole de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	12223
Tabela 28 - Tabela 28 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos cuidados maternos pós-nascimento da prole de ratas que receberam tratamento pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.	12225
Tabela 29 - Análise através do Anova de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao comportamento dos filhotes na infância e adolescência, de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	130
Tabela 30 - Análise através do Anova de três vias quanto ao crescimento dos filhotes na infância e adolescência, de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	131

Tabela 31 -Análise através do Anova de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos parâmetros no comportamento de brincar dos filhotes durante a adolescência, de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS.....	133
Tabela 32 - Análise através do Anova de três vias quanto a aquisição e reversão do aprendizado durante os treinos	136
Tabela 33 - Análise através da Anova de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao aprendizado da localização da caixa destino.....	138
Tabela 34 - Análise através do Anova de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto a reversão do aprendizado da localização da caixa destino.	140
Tabela 35 - Análise através do Anova de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao teste de CA durante 20 min para verificação do comportamento tipo-ansioso.	148
Tabela 36 - Análise através do Anova de três vias quanto ao resultado do teste de CA a cada 5 min para verificação do comportamento tipo-ansioso.....	14848
Tabela 37 - Análise através do teste ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto os resultados do teste de reconhecimento de objetos de 2h e 24h para verificação da memória de curto e longo prazo.....	151
Tabela 38 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao teste de interação social.	15153
Tabela 39 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao comportamento doentio das ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	15156

Tabela 40 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos níveis de citocinas no plasma e cérebro fetal 2h após as ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	15159
Tabela 41 - Análise através da ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto a quantificação da enzima 11 β -HSD-2 na placenta 6h após o pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com SAL ou LPS	15161
Tabela 42 - Análise dos dados de Qui-quadrado das ratas que abortaram ou não	15163
Tabela 43 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao comportamento doentio das ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS no DG16 e abortaram ou não.	15165
Tabela 44 - Análise através do ANOVA duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao nascimento da prole de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	15167
Tabela 45 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos cuidados maternos pós-nascimento da prole de ratas que receberam tratamento pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	15169
Tabela 46 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao comportamento dos filhotes na infância e adolescência, de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	15174

Tabela 47 - Análise através do ANOVA de três vias dos valores quanto ao crescimento dos filhotes na infância e adolescência, de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	15175
Tabela 48 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos parâmetros no comportamento de brincar dos filhotes durante a adolescência, de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS.....	15178
Tabela 49 - Análise através do ANOVA de três vias quanto a aquisição e reversão do aprendizado durante os treinos	15180
Tabela 50 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao aprendizado da localização da caixa destino.....	15182
Tabela 51 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto a reversão do aprendizado da localização da caixa destino	15185
Tabela 52 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao teste de CA durante 20 min para verificação do comportamento tipo-ansioso	15190
Tabela 53 - Análise através do ANOVA de três vias quanto ao resultado do teste de CA a cada 5 min para verificação do comportamento tipo-ansioso.....	15191
Tabela 54 - Análise através do teste ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto os resultados do teste de reconhecimento de objetos de 2h e 24h para verificação da memória de curto e longo prazo.....	15193

Tabela 55 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao teste de interação social	15196
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	37
2	JUSTIFICATIVA.....	47
3	OBJETIVO	48
3.1	OBJETIVO GERAL.....	48
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	ANIMAIS.....	49
4.2	ACASALAMENTO	49
4.3	DROGAS UTILIZADAS	49
4.3.1	Lipopolissacarídeo.....	49
4.3.2	Nimesulide	50
4.3.3	Betametasona	50
4.3.4	Tramadol	50
4.3.5	Pentabiótico.....	50
4.3.6	Heparina sódica.....	50
4.3.7	Tribromoetanol	50
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	50
4.5	TESTES COMPORTAMENTAIS NAS RATAS PRENHAS	53
4.5.1	Teste de campo aberto	53
4.5.2	Ingestão alimentar e ganho ou perda de peso.....	54
4.5.3	Quantificação das citocinas e realização do Western blot.....	54
4.5.4	Western blot.....	55
4.5.5	Comportamento materno.....	55
4.6	TESTES COMPORTAMENTAIS NA PROLE DURANTE A INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA	56

4.6.1	Teste de vocalização ultrassônica.....	56
4.6.2	Homing.....	57
4.6.3	Tábua de buracos.....	58
4.6.4	Labirinto em cruz elevado	59
4.6.5	Campo aberto	60
4.6.6	Comportamento de brincar	60
4.7	TESTES COMPORTAMENTAIS NA PROLE DURANTE A VIDA ADULTA.....	61
4.7.1	Labirinto espacial de Barnes.....	61
4.7.2	Campo aberto	62
4.7.3	Reconhecimento de objetos.....	62
4.7.4	Interação social	63
4.7.5	Cirurgia para inserção de Cateter na femoral.....	64
4.7.6	Teste de estresse por contenção.....	64
4.7.7	Perfusão e imunoistoquímica	65
4.7.8	Medo condicionado ao contexto.....	66
4.7.8.1	Vocalizações ultrassônicas aversivas	67
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
6	RESULTADOS.....	70
6.1	RESULTADOS DAS RATAS QUE RECEBERAM TRATAMENTO COM LPS OU SAL NO DG16.....	70
6.1.1	Resultados quanto ao desenvolvimento do comportamento doentio.....	70
6.1.2	Resultados quanto as concentrações de citocinas no plasma materno, líquido amniótico e cérebro fetal.....	72

6.1.3	Resultado quanto a expressão enzima 11-β hidroxisteroide desidrogenase tipo 2 (11β-HSD-2) na placenta de ratas 6h após receberem tratamento com LPS ou SAL.....	74
6.1.4	Resultado quanto as ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL e abortaram ou não.	75
6.1.5	Resultado somente das ratas que receberam tratamento com LPS e abortaram ou não.....	77
6.1.7	Resultados quanto aos cuidados maternos pós-nascimento nos DPN2, 3 e 4 da prole de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	80
6.2	RESULTADOS QUANTO O COMPORTAMENTO DOS FILHOTES PRÉ- PÚBERES E PÚBERES.....	83
6.3	RESULTADOS QUANTO O COMPORTAMENTO DOS FILHOTES DURANTE A VIDA ADULTA DE RATAS QUE RECEBERAM TRATAMENTO COM LPS OU SAL NO DG16.	89
6.3.1	Resultados quanto a memória espacial verificada pelo teste de Barnes.....	89
6.3.1.1	Resultado quanto a aquisição e reversão do aprendizado durante os treinos.	89
6.3.1.2	Resultados quanto ao aprendizado da localização da caixa destino. .	92
6.3.1.3	Resultados quanto a reversão do aprendizado da localização da caixa destino	94
6.3.2	Resultados quanto ao teste de CA durante 20 min para verificação do comportamento tipo-ansioso.....	96
6.2.3	Resultados quanto ao teste de reconhecimento de objetos de 2h e 24h para verificação da memória de curto e longo prazo.	100
6.3.4	Resultados quanto ao teste de interação social.....	103
6.3.5	Resultados quanto ao teste de medo condicionado ao contexto..	105

6.3.6	Resultados quanto a resposta cardiovascular durante o teste de estresse por contenção.....	107
6.4	RESULTADOS DAS RATAS QUE RECEBERAM PRÉ-TRATAMENTO COM SAL OU NIM E TRATAMENTO COM LPS OU SAL NO DG16	112
6.4.1	Resultados quanto ao desenvolvimento do comportamento.....	112
6.4.2	Resultados quanto as concentrações de citocinas no plasma materno, líquido amniótico e cérebro fetal.....	115
6.4.3	Resultado quanto as ratas que receberam pré-tratamento SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL e abortaram ou não. .	118
6.4.4	Resultado quanto as ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS no DG16 e abortaram ou não.....	120
6.4.5	Resultados quanto ao nascimento da prole de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	122
6.4.6	Resultados quanto aos cuidados maternos pós-nascimento da prole de ratas que receberam tratamento pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	124
6.5	RESULTADOS QUANTO O COMPORTAMENTO DOS FILHOTES NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA.....	128
6.6	RESULTADOS QUANTO O COMPORTAMENTO DOS FILHOTES DURANTE A VIDA ADULTA DE RATAS QUE RECEBERAM PRÉ-TRATAMENTO COM SAL OU NIM E TRATAMENTO COM LPS OU SAL NO DG16.	135
6.6.1	Resultados quanto a memória espacial verificada pelo teste de Barnes.....	135
6.6.1.1	Resultado quanto a aquisição e reversão do aprendizado durante os treinos.	135
6.6.1.2	Resultados quanto ao aprendizado da localização da caixa destino	137

6.6.1.3	Resultados quanto a reversão do aprendizado da localização da caixa destino	141
6.6.2	Resultados quanto ao teste de CA durante 20 min para verificação do comportamento tipo-ansioso.....	145
6.6.3	Resultados quanto ao teste de reconhecimento de objetos de 2h e 24h para verificação da memória de curto e longo prazo.	150
6.6.4	Resultados quanto ao teste de interação social.....	152
6.7	RESULTADOS DAS RATAS QUE RECEBERAM PRÉ-TRATAMENTO COM SAL OU BET E TRATAMENTO COM LPS OU SAL DURANTE A GESTAÇÃO.....	155
6.7.1	Resultados quanto ao desenvolvimento do comportamento doentio.....	155
6.7.2	Resultados quanto as concentrações de citocinas no plasma materno, líquido amniótico e cérebro fetal.....	158
6.7.3	Resultado quanto a quantificação da enzima 11-β hidroxisteroide desidrogenase tipo 2 (11β-HSD-2) na placenta de ratas 6h após receberem pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com SAL ou LPS.....	161
6.7.4	Resultado quanto as ratas que receberam pré-tratamento SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL e abortaram ou não..	162
6.7.5	Resultado quanto as ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL durante a gestação e abortaram	164
6.7.4	Resultados quanto ao nascimento da prole de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.....	166
6.7.6	Resultados quanto aos cuidados maternos	168
6.8	RESULTADOS QUANTO O COMPORTAMENTO DOS FILHOTES NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA.....	172

6.9	RESULTADOS QUANTO O COMPORTAMENTO DOS FILHOTES DURANTE A VIDA ADULTA.....	179
6.9.1	Resultados quanto a memória espacial verificada pelo teste de Barnes.....	179
6.9.1.1	Resultado quanto a aquisição e reversão do aprendizado durante os treinos	180
6.9.1.2	Resultados quanto ao aprendizado da localização da caixa destino.	181
6.9.1.3	Resultados quanto a reversão do aprendizado da localização da caixa destino.....	184
6.9.2	Resultados quanto ao teste de CA durante 20 min para verificação do comportamento tipo-ansioso.....	188
6.9.3	Resultados quanto ao teste de reconhecimento de objetos de 2h e 24h para verificação da memória de curto e longo prazo.	193
6.9.4	Resultados quanto ao teste de interação social dos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL durante a prenhez.....	195
7	DISCUSSÃO	198
8	CONCLUSÃO	217
	REFERÊNCIAS.....	218
	APÊNDICE.....	234
	ANEXO A.....	245
	ANEXO B.....	246
	ANEXO C.....	247

1 INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro autista (TEA), foi primeiro descrito por Leo Kanner em 1943 em seu artigo “Perturbação autística no afetivo” onde ele descreve o comportamento de 11 crianças. Kanner percebeu um padrão de dificuldade inata destas crianças de manter contato visual e do uso da linguagem, interesse por atividades restritas e padrões repetitivos de comportamento, e enfatizou a solidão autista e manutenção da mesmice, e desde então têm sido objeto de intensa investigação. (CHOWN; HUGHES, 2016; GENTILE, 2015; HARRIS, 2018).

Hans Asperger em 1944 descreveu as mesmas características, no entanto, com início tardio e muitas vezes com traços de genialidade e deficiências concomitantes (HUGHES, 2016; WING, 1985). Desta forma, o termo Asperger passou a ser usado para referenciar o “autismo de alto nível” (WING, 1985).

Mas o primeiro a usar o termo autista foi Eugen Bleuler um psiquiatra suíço em 1910, onde ele o descrevia como sintomas esquizofrênico autista. Para Bleuler o autismo era caracterizado pela perturbada relação do esquizofrênico com sua própria realidade (BARNET, 2016).

Considerando-se o autismo uma incapacidade do indivíduo de formar uma relação afetiva de contato com pessoas, passou-se a considerar que a causa do autismo fosse por uma “ausência parental”, originado de pais opressores e ausentes, sendo causado principalmente pela falta de afeto materno. Fundamentado nessa teoria a muito já refutada, Bruno Bettelheim cunhou o termo “mães geladeira” e descreveu a rejeição, a educação fria e distante entre mãe e filho como a causa do comportamento autista (LENNY VAN ROSMALEN; 2020).

O autismo foi inserido como diagnóstico somente em 1980 no DSM-3, 37 anos depois de ser descrito por Kanner, até então, havia-se o conhecimento a respeito do transtorno, mas não havia uma organização básica dos sintomas dominantes para diagnóstico (HARRIS, 2018).

Somente a partir do DSM-4 de 1994 o autismo foi considerado um transtorno do neurodesenvolvimento e a partir do DSM-5 de 2013 então chamado de transtorno do espectro autista “TEA”, englobando a Síndrome de Asperger, Rett e o autismo propriamente dito em um único grupo.

O TEA é um transtorno heterogêneo com múltiplas causas, sintomas variados, graves distúrbios e co-morbidades associadas (AMARAL *et al.*, 2008), como convulsões, ansiedade, distúrbios do sono, déficits motores, comportamento agressivo, problemas gastrointestinais e processamento sensorial anormal (KUMAR; SHARMA, 2016). Várias manifestações emocionais estão associadas ao autismo, como depressão, aumento da ansiedade e medo (UMEDA *et al.*, 2010). Estudos relatam que as anormalidades da percepção sensorial são muito comuns em indivíduos autistas e poderiam contribuir para o complexo comportamento e sintomas do distúrbio (ANOMAL *et al.*, 2015; LEEKAM *et al.*, 2007).

Crianças com TEA apresentam déficits permanentes na comunicação verbal e não verbal, contato visual, compreensão e uso de gestos, assim como ausência de expressões faciais. Exibem ainda dificuldade de interação social, problemas para estabelecer uma conversa normal, em expressar emoções ou afeto e dificuldades para desenvolver, manter e compreender relacionamentos. Estes indivíduos apresentam ainda problemas em compartilhar brincadeiras imaginativas, dificuldades em fazer amigos e resistência ou ausência de interesse por pares. Exibem também padrões de comportamentos restritos e repetitivos, uso de objetos, fala estereotipada, são presos a padrões de rotinas e rituais, tem grandes interesses fixos e anormais por objetos, apresentam hipo ou hiperreatividade a estímulos sensoriais, bem como aparente indiferença a dor/temperatura, reação contrária e exacerbada a sons e texturas, assim como cheirar ou tocar objetos de forma excessiva, fascinação visual por luzes ou movimento e não demonstra medo diante do perigo. Podendo apresentar ou não comprometimento intelectual (BERNARDI *et al.*, 2012; DSM-5, 2013).

Os sintomas para diagnóstico do autismo podem ser observados antes dos três anos de idade, sendo que alguns dos sintomas são perceptíveis ainda aos seis meses de vida (BARON-COHEN *et al.*, 2000). Acometendo na proporção de 4:1 de indivíduos do sexo masculino para o feminino, muito embora pessoas do sexo feminino tendam a apresentar maior deficiência intelectual ou atraso na linguagem (DSM-5, 2013).

Figura 1 - Comportamentos tipo autista



Fonte: adaptado de: AUTISMO: UMA REALIDADE por ZIRADO, 2013.

Nota: Comportamentos tipo autista

Arte: Miguel Mendes, Marco e Fábio Ferreira

A etiologia do autismo ainda é desconhecida, porém várias linhas de pesquisa demonstram que fatores genéticos, neurológicos, imunológicos, infecções virais pré-natais, contaminantes alimentares e ambientais, bem como a neuroinflamação, podem influenciar o desenvolvimento de anormalidades na circuitaria neural que desencadeia o autismo (ASHWOOD; VAN DE WATER, 2004; KIRSTEN *et al.*, 2012; KOCOVSKA *et al.*, 2017).

Evidências epidemiológicas sugerem que a infecção materna durante a gravidez possam ser fatores de risco notáveis para desenvolvimento de doenças mentais, incluindo entre elas a esquizofrenia e autismo (BAHARNOORI *et al.*, 2013; BOKSA, 2010; GILMORE *et al.*, 2003; MEYER *et al.*, 2009; PATTERSON, 2009; PATTERSON, 2011).

A teoria neurodesenvolvimental do autismo propõe que o crescimento anormal, o desarranjo da citoarquitetura e padronização neuronal, juntamente com déficit na conectividade cortical possam ser as causas dos transtornos autistas (CHEN *et al.*, 2017; DANTZER; KELLEY, 2008; PARDO; EBERHART, 2007). Além disso, uma redução no número de células de purkinje no cerebelo parecem estar associado a alguns sintomas de autismo (COURCHESNE *et al.*, 2007).

Estes desarranjos indicam vários períodos de início pré-natal em região particulares do cérebro como amígdalas e córtex, que se desenvolvem mais tardiamente durante a neurogênese. Parece existir uma janela crítica de tempo para a neuromodulação, proliferação, migração, sinaptogênese, gliogênese, mielinização e apoptose de neurônios, períodos estes que se sobrepõem e começam na fase embrionária indo até a adolescência. Além do mais, regiões afetadas pelo autismo tendem a se desenvolver de forma mais lenta e são mais vulneráveis a distúrbios.(ASHWOOD *et al.*, 2006; BERBEL., *et al* 2014).

A modelagem animal é utilizada como recurso para melhor entender as causas e consequências do autismo. Estes modelos levam em consideração os comprometimentos comportamentais encontrados (BERNARDI *et al.*, 2012). Estes comprometimentos comportamentais são geralmente estudados em roedores utilizando-se de diversos testes, como labirinto em cruz elevado, campo aberto, caixa de claro-escuro, gravações de vocalizações ultrassônicas dentre tantos outros (BASSI *et al.*, 2012). O modelo animal possibilita uma oportunidade de desvendar alguns

aspectos deste transtorno, algo do qual não seria possível por razões éticas em humanos (BERNARDI *et al.*, 2012).

Diversos são os modelos para estudos e indução do autismo em roedores. Modelos de supernutrição da prole através da redução de ninhada, onde os filhotes recebem maior oferta de alimentos, os filhotes fêmeas destas ninhadas foram acasaladas e a geração seguinte exibiu comportamentos tipo-autista como redução do comportamento de brincar entre outros (NOVAIS *et al.*, 2020).

Em outro estudo onde foi ofertada uma dieta hipoproteica durante a gestação, os filhotes nascidos exibiram comportamentos tipo-autista como a redução da interação social e comunicação do filhotes (BATISTA *et al.*, 2018).

Em um modelo de estresse materno onde ratas receberam choque nas patas durante a gestação, os filhotes exibiram comportamentos tipo repetitivos e redução da interação social (CHAGAS *et al.*, 2021).

Há modelos farmacológicos que utilizam ácido valpróico (AVP), um anti-convulsivante muito utilizado na medicina, quando usado durante a gravidez parece aumentar a prevalência do TEA em crianças.

Modelos que utilizam AVP em roedores durante a gestação demonstraram que a prole apresentou comportamentos tipo-autista, como redução das vocalizações, comportamentos estereotipados e redução do comportamento de brincar (DIETERT *et al.*, 2011; SERVADIO *et al.*, 2016).

Modelos de que mimetizam infecções pré-natais são bem conhecidos e são ferramentas que fornecem uma oportunidade de questionamento se infecções durante a gestação podem causar alterações permanentes ou transitórias no sistema nervoso central (SNC) (BOKSA, 2010; PATERSON, 2011; YASUMATSU *et al.*, 2020).

Ainda não são bem compreendidos os mecanismos pelos quais as infecções pré-natais aumentam o risco para a doença (BAHARNOORI *et al.*, 2012). neste contexto, é importante considerar que eventos imunomediados durante a gestação como infecção materna durante a gravidez, uma vez que eles podem induzir mudanças duráveis na estrutura, função do desenvolvimento cerebral, como do sistema límbico, que controla o comportamento emocional e modula algumas respostas autonômicas como a frequência cardíaca, pressão arterial e frequência

respiratória (ASHWOOD *et al.*, 2006; DANTZER; KELLEY, 2008; KOCOVSKA *et al.*, 2017).

Diversos modelos de infecções são utilizados para simular infecções virais e bacterianas, e dentre as principais podemos citar os modelos lipopolissacarídeo (LPS), vírus influenza e ácido poliinosínico-policidílico (PolyI:C) injetadas via intraperitoneal (IP), intravenosa (IV), subcutânea (SC) ou intranasal (IN) em roedores (BOKSA, 2010; PATERSON, 2011).

O PolyI:C quando aplicado em ratas durante a gestação aumentou os níveis de citocinas no plasma, e causou prejuízos comportamentais nos filhotes no teste de reconhecimento de objetos e inibição pré-pulso (PPI) (BALLEDINE, 2015).

Modelos de infecção respiratória que utilizaram vírus influenza durante a gestação em roedores causaram déficits comportamentais importante como redução da interação social, PPI, causou prejuízos no campo aberto e alterações cerebrais principalmente no hipocampo (PATERSON, 2009).

O modelos com LPS são bem aceitos como modelo de infecção bacteriana e ativador da resposta imune inata, provocando comportamento doentio e ativação do eixo hipotálamo-hipofise-adrenal (HHA) (BOKSA, 2010; QUADRI *et al.*, 2016), além de provocarem comportamentos tipo-autistas na prole (KIRSTEN *et al.*, 2010; VITOR-VIEIRA; VILELA; GIUSTI-PAIVA; 2021).

O LPS é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas, largamente utilizado como modelo de infecção bacteriana (BAHARNOORI *et al.*, 2012; BOKSA, 2010; KIRSTEN *et al.*, 2010; PENTEADO *et al.*, 2014). O LPS logo após ser injetado é rapidamente reconhecido por macrófagos e outras células do sistema imune e ligando-se ao receptor tipo Toll-2 e 4 destas células (TLR-2, TLR-4) (BAHARNOORI *et al.*, 2012), desencadeando assim uma cascata de transdução de sinal induzindo a ativação de fatores de transcrição como fator kappa B (NFkB) e subsequentemente a transcrição de genes que codificam mediadores pró e anti-inflamatórios tais como, citocinas, quimiocinas e proteínas do sistema do complemento. A síntese e liberação de de citocinas pró-inflamatórias como interleucinas (IL) 1 e IL-6 , e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) são indicadores de ativação imune. IL-1 e TNF- α são produzidos localmente e atuam sobre fibroblastos e endotélio para induzir a sua própria síntese e de outras como a de IL-6. A IL-6 sintetizada interage então com alvos no cérebro e

leva síntese de prostaglandinas E2 (PGE) no hipotálamo mediada pela enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) produzida no endotélio vascular. As PGE atuam em neurônios termossensíveis que regulam a temperatura na área pré-ótica do hipotálamo anterior, mediando o aumento na temperatura corporal central (BOKSA, 2010), ativando o eixo HHA (QUADRI *et al.*, 2016), e causando os sintomas típicos de “comportamento doentio” caracterizado por febre, anorexia, anedonia, hipolocomoção, redução da exploração e interação social (DANTZER, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2020; PECCHI *et al.*, 2009; YIRMIYA *et al.*, 1994). As temperaturas mais altas alcançadas durante o estado de febre estimula a proliferação de células do sistema imune enquanto desfavorece o crescimento de bactérias e vírus. Há ainda uma redução nos níveis de minerais circulantes como Ferro e Zinco diminuindo a disponibilidade deste minerais vitais no crescimento e multiplicação destes organismos (DANTZER, 2004; HART, 1988; DANTZER, 2004; KLUGER, 1986). Especificamente, o pró-inflamatório A IL-6 parece assumir um papel crítico na mediação dos efeitos da ativação imunomaterna no desenvolvimento do cérebro fetal (MEYER *et al.*, 2009; SMITH *et al.*, 2007).

Além das respostas inflamatórias maternas, ocorre alterações das citocinas e outros mediadores na placenta. O LPS aplicado durante a gestação leva a redução da enzima placentária 11 β -hidroxisteroide desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD-2) uma importante enzima inativadora de glicocorticóides (FU *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2013). A 11 β -HSD-2 produzida pelos trofoblastos na placenta regula a passagem dos glicocorticóides através da placenta para o feto através da inativação dos mesmos (FU *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2013).

Em estudos realizados com LPS radiomarcados injetados em ratas prenhas, foi detectado o LPS nos tecidos maternos assim como na placenta, porém não foi detectado no cérebro fetal (ASHDOWN *et al.*, 2006). O LPS administrado induziu a elevação das concentrações de TNF- α , IL-1 ou IL-6 na placenta e IL-1 no plasma fetal (KIRSTEN *et al.*, 2011; URAKUBO *et al.*, 2001) e cérebro fetal (OSKVIK *et al.*, 2012). Citocinas desempenham um importante papel no desenvolvimento do SNC. A desregulação destes mediadores parece levar possíveis alterações no desenvolvimento do cérebro fetal (BOKSA, 2010).

O mecanismo pelo qual o LPS pré-natal induz alterações no cérebro fetal parece envolver o estresse oxidativo. Um aumento nos marcadores indicativos de

estresse oxidativo no cérebro fetal de ratos foi observado algumas horas após a exposição materna ao LPS, assim como no cérebro dos filhotes em idade pós-natal (PAINTLIA *et al.*, 2004; PAINTLIA *et al.*, 2008). Fatores ambientais, infecções pré-natais e predisposição genética parecem desempenhar um papel importante na desregulação da fisiologia das células neuronais gliais no autismo. As muitas combinações resultantes de interação genética-ambiente podem alterar o desenvolvimento cerebral durante a gravidez até a infância, podendo explicar a diversidade de alterações comportamentais em pacientes autistas. Fatores ambientais podem levar a regulação anormal de genes, podendo dar origem a cenários de estresse oxidativo e insultos neurais. Estudos tem evidenciado que a regulação epigenética (metilação de DNA, por exemplo) pode silenciar os genes que codificam enzimas envolvidas na remoção de radicais livres levando a uma função alterada de células gliais. Tais alterações poderiam ocorrer no autismo, porém ainda sem comprovação (BARTZOKIS, 2011; DI MARCO *et al.*, 2016; ZEIDAN-CHULIA *et al.*, 2014).

Estresse materno durante a gestação pode levar a alterações no comportamento materno pós-parto, desencadeando um provável desenvolvimento anormal na prole. Roedores nascem com cérebro imaturo, desta forma levam um tempo significativo para seu desenvolvimento, evidenciando que um relacionamento deficiente entre mãe e prole pode causar alterações permanentes no filhote (FLEMING *et al.*, 1999; MEYER *et al.*, 2006).

Mudanças cerebrais de longo prazo na prole e durante a vida pós-natal foram observados após ativação imunomaterna como, diminuição e morte de matéria branca, hipomielinização, aumento de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e diminuição nos níveis de serotonina foram detectados em diversas regiões cerebrais. O GFAP desempenha um papel importante na ativação das células de astróglia observadas em situação de lesão do SNC e neurodegeneração. Como resultado, o GFAP é aceito como um marcador com alta especificidade para danos cerebrais (ESNAFOGLU *et al.*, 2017). Da mesma forma, A molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizada 1 (IBA1), é uma proteína de ligação específica para micróglia ativada para fagocitose (OHSAWA *et al.*, 2004).

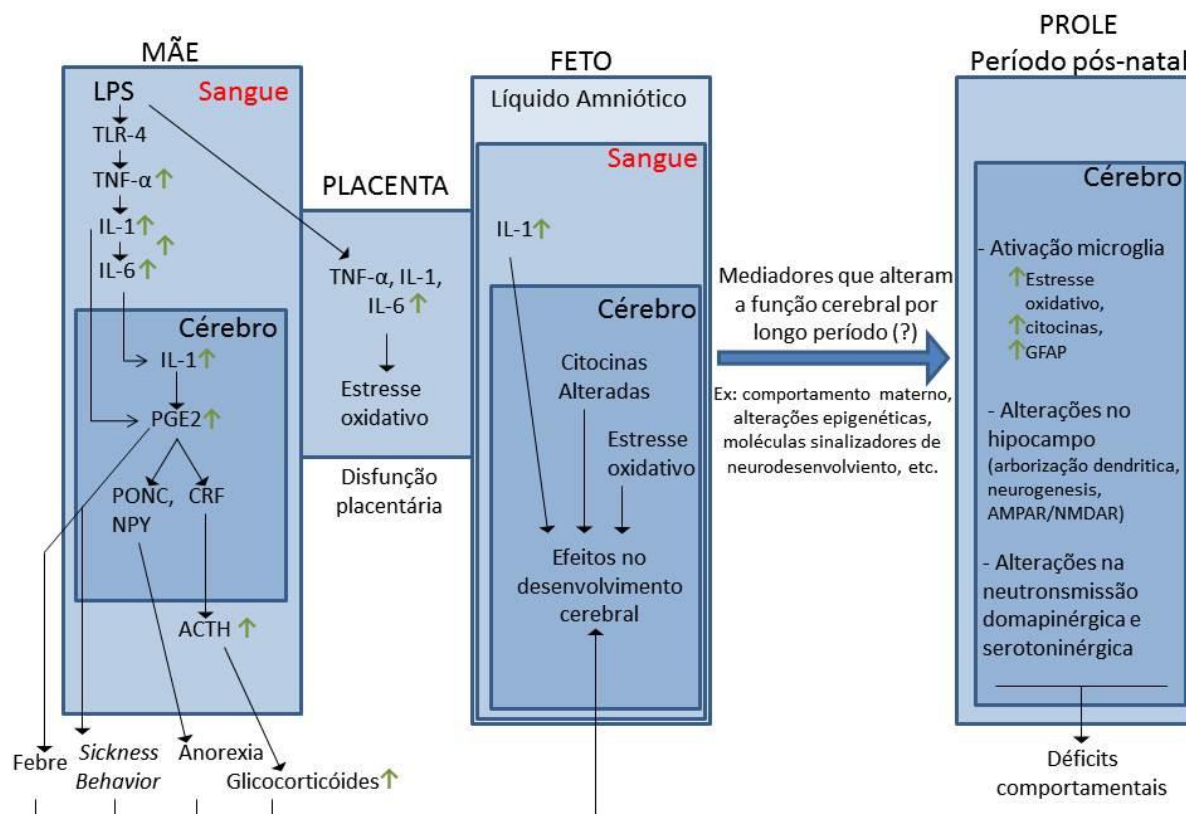
Micróglia são células especializadas que residem no SNC, e desempenham um papel crítico quando o sistema imunológico é ativado. Pesquisas recentes sugerem que estas células participam na organização sináptica, controle da excitabilidade neural, aprendizado e memória além de proteção e reparo cerebral (LEE *et al.*, 2017).

Estudos demonstraram existir alterações na neurotransmissão dopaminérgica. O hipocampo parece ser afetado com o aumento dos receptores AMPAR/NMDA, além de alterações de transmissão sináptica e redução da neurogênese. Da mesma maneira testes comportamentais demonstram prejuízo na inibição PPI (BOKSA, 2010) e aumento dos comportamentos tipo repetitivos e/ou estereotipados (SERVADIO *et al.*, 2015).

O modelo de transtorno do espectro autista por ativação imunológica pré-natal é, portanto, altamente adequado para contribuir e para o entendimento de como infecções pré-natais podem afetar o desenvolvimento do cérebro durante a fase pré e pós-natal. Apesar de décadas de pesquisa, muito pouco se sabe sobre a etiologia e/ou fisiopatologia do autismo, este parece ser o resultado de uma complexa combinação de fatores ambientais, neurológicos, imunológicos e genéticos.

Sendo assim, testes comportamentais relacionado com aspectos translacionais de autismo, bem como drogas que possam prevenir o comportamento doentio, e achados imunistoquímicos de áreas cerebrais que visem identificar marcadores de ativação neuronal ou de neuroinflamação podem contribuir com o entendimento da plasticidade neural na fisiopatologia do autismo sendo de grande interesse da ciência.

Figura 2 - Ação do LPS na mãe e no feto



Fonte: Giusti-Paiva, 2016

Nota: A figura 1 mostra a ação do LPS. Após a aplicação do LPS o mesmo se liga aos receptores TLR-4 em macrófagos e outras células imunes que desencadeiam uma cascata de transdução de citocinas (TNF- α , IL-1, IL6), estas por sua vez induzem a formação de PGE que atuam em neurônios termossensíveis no hipotálamo mediando a alteração de temperatura causando febre, ativação do eixo HPA e induzindo comportamento doentio. Da mesma forma pode aumentar a expressão destas citocinas na placenta causando aumento do estresse oxidativo bem como alterações no desenvolvimento cerebral fetal. Estas alterações podem perdurar pelo período pós-natal com aumento de estresse oxidativo, citocinas, GFPA, alterações no hipocampo como expressão de receptores AMPA/NMDA, diminuição da neurogênese e ainda alterações dopaminérgicas e serotoninérgicas causando déficits comportamentais tardias. Alterações no comportamento materno durante a infância pode interferir no desenvolvimento e maturação dos circuitos neurais da prole.

2 JUSTIFICATIVA

O modelo animal fornece uma adequada abordagem ao questionar se infecções pré-natais realmente podem causar mudanças transitórias ou permanentes no SNC dos filhotes, e quais mecanismos são as causas responsáveis por essas mudanças. Contribuindo assim para entendimento das correlações com o TEA permitindo desvendar alguns aspectos destas desordens, procedimentos estes que por razões éticas seriam impossíveis em seres humanos. O modelo proposto visa mimetizar infecções durante a gestação com a administração de LPS, injetado intraperitoneal (i.p.) em ratas prenhas no 16^o dia de gestação (GD16) e na dose de 500 µg/Kg desencadeando alterações comportamentais na prole características de autismo-*like*, modelo este já padronizado por nós em nosso laboratório. Analisando alterações comportamentais e de respostas autonômicas, e quantificando marcadores cerebrais específicos da prole na infância, adolescência e vida adulta pretende-se estudar os mecanismos de tais alterações promovendo intervenções tais com anti-inflamatórios não esteroidais ou esteroidais nas mães.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se um anti-inflamatório não esteroide (Nimesulide) e/ou esteroide (Betametasona) previne os prejuízos comportamentais causados aos filhotes machos durante a infância, adolescência e vida adulta causado pelo LPS aplicado na mãe no 16º dia de gestação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Quantificar as citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β no plasma das ratas, líquido amniótico e tecido cerebral fetal 2h após receberem pré-tratamento com SAL ou nimesulide (NIM) ou betametasona (BET) e tratamento com SAL ou LPS.
- b) Quantificar a expressão da enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo-2 (11 β -HSD-2) na placenta de ratas 6h após serem pré-tratadas com SAL ou BET e SAL ou LPS através da técnica de western blot.
- c) Avaliar a resposta autonômica dos filhotes de ratas que receberam tratamento SAL ou LPS durante a gestação através da aferição da pressão arterial média e frequência cardíaca durante o teste de estresse por contenção.
- d) Avaliar a expressão de c-fos em áreas específicas do encéfalo após o teste de estresse por contenção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas Wistar pesando de 200 a 250g, a partir de 8 semanas de vida, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL-MG. As ratas foram alojadas em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção, tratadas com ração comercial e água “*ad libitum*”, e mantidas em sala climatizada a 23 ± 1 °C em ciclo de 12 horas claro-escuro sendo as luzes acesas às 7h e desligadas às 19h.

4.2 ACASALAMENTO

Ao final do dia as ratas foram colocadas em gaiolas com ratos machos sexualmente experientes para o acasalamento na proporção de três fêmeas para um macho, e foram deixados juntos por quatro dias. Pela manhã dos quatro dias seguintes foi realizado o lavado vaginal e logo após analisado sua citologia para verificação da presença de espermatozoides. O dia em cuja manhã foi constatada a presença de espermatozoides no lavado vaginal foi considerado como sendo o dia zero de gestação (DG0). As ratas em que foram observadas a presença de espermatozoides foram então marcadas e separadas em caixas com outras duas ratas prenhas, onde foi acompanhado o ganho de peso até o DG16. Após esse dia as ratas foram separadas individualmente em uma caixa até dia do nascimento dos filhotes.

O dia de nascimento dos filhotes foi considerado como dia pós nascimento 0 (DPN0).

4.3 DROGAS UTILIZADAS

4.3.1 Lipopolissacarídeo

LPS obtido a partir de *Escherichia coli*, sorotipo 026:B6, marca Sigma-Aldrich, foi dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) e estocado em alíquotas de 10 mg/ml e posteriormente diluídos para administração nas ratas prenhas nas doses de 500 µg/kg no DG16 sendo aplicado por via intraperitoneal (.i.p.). Esta dose foi escolhida com base em estudos prévios que demonstraram induzir alterações comportamentais, endócrinas e aumentar as concentrações de citocinas plasmáticas (VITOR-VIEIRA, VILELA, GIUSTI-PAIVA; 2021). O DG16 foi escolhido pois em ratos este período

compreende o 2º trimestre de gestação em humanos respectivamente (CLANCY *et al.*, 2007). O grupo controle receberá solução salina (1ml/kg, i.p.) (SAL).

4.3.2 Nimesulide

Nimesulide (NIM) Sigma-Aldrich um potente anti-inflamatório não esteroidal, inibidor de cicloxigenase 2 (COX-2), foi dissolvido em solução tampão Tris base pH 9,5 na dose de 5mg/ml kg, sendo utilizado como pré-tratamento ao LPS.

4.3.3 Betametasona

Betametasona (BET) um anti-inflamatório esteroidal, de nome comercial Celestone®, com composto ativo de Fosfato Dissódico de Betametasona - Mantecorp Farmasa, 4mg/ml diluído em solução salina estéril na dose de 1,33mg/ml, sendo utilizado como pré-tratamento ao LPS.

4.3.4 Tramadol

Cloridrato de tramadol analgésico opioide de nome comercial Tramal® apresentado em ampolas de 100mg/ml foi diluído e utilizado na dose de 12mg ml/kg como analgésico para os animais que passaram por cirurgia.

4.3.5 Pentabiótico

Antibiótico polivalente Pentabiótico® da marca Zoetis apresentado aplicado na dose 20ui ml/Kg pós-cirurgia.

4.3.6 Heparina sódica

Heparina sódica de marca comercial Hemofol® apresentado em 5000ui/ml utilizado como anticoagulante a 0,1% diluído em solução salina para perfusão e desobstrução de cânulas de cateterização femoral.

4.3.7 Tribromoetanol

Tribromoetanol (TBE) foi utilizado na dose de 250mg/Kg para anestésiar os animais antes dos procedimentos invasivos.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado em quatro etapas sendo, a primeira etapa nas ratas prenhas, a segunda nos filhotes durante a infância e adolescência, a terceira e a quarta durante a fase adulta.

Primeiramente as ratas prenhas foram pré-tratadas com SAL utilizada como veículo (V), ou NIM, ou BET e logo após foram tratadas com LPS ou SAL no DG16, foram avaliadas nos testes de campo aberto (CA) 2 e 6h depois do tratamento, ingestão alimentar durante 6 horas. Logo após foram anestesiadas e eutanasiadas por decapitação para coleta de sangue pelo tronco para retirada do plasma, líquido amniótico e os cérebro dos fetos, para quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 circulantes nestes tecidos, além da placenta para quantificação da enzima 11 β -HSD2 através da técnica de Western blot.

Em um segundo momento as ratas prenhas pré-tratadas com V, ou NIM, ou BET e tratadas com LPS ou SAL no DG16, foram avaliadas no CA de 2h, ingestão alimentar e ganho ou perda de peso durante 24 horas, e foram monitoradas até o nascimento dos filhotes.

O dia de nascimento dos filhotes foi considerado DPN0. No DPN1 um dia após o nascimento, as ninhadas foram pesadas e contado o número de filhotes nascidos, e logo após foram padronizados em 8 filhotes, sendo 4 machos e 4 fêmeas.

De cada ninhada, somente filhotes machos foram utilizados nos testes comportamentais, sendo: 1 filhote para vocalização ultrassônica (Vus) realizado no DPN5 e teste de *homing* no DPN13; 1 filhote para o teste de tábua de buracos (TB) no DPN26, 1 filhote para teste de labirinto em cruz elevado (LEC) no DPN28 e no CA no PND34, e 1 filhote para o teste de comportamento social de brincar (CSB) no PND33. Os filhotes que passarem pelos testes de VUs e *homing* foram pesados nos DNP5, 13, 21, 28, e 34, para avaliação do crescimento. Os filhotes fêmeas foram mantidos para composição de ninhada até o desmame no DPN21 e logo após foram eutanasiadas.

Em um terceiro momento os filhotes que não passaram pelo teste de CSB foram avaliados durante a vida adulta. Os animais entre 8 e 10 semanas passaram pelos testes de: labirinto espacial de Barnes (LEB), CA, reconhecimento de objetos (RO), interação social (IS).

Destes, um animal foi testado no LEB, e outro animal passou pelos testes de CA durante 20 min, seguido ambientação para o teste de RO de 2 e 24h, e do teste de IS. O mesmo animal passou pelo teste de CA, RO de 2 e 24h e pelo teste de IS e estes testes foram realizados durante cinco dias seguidos.

Em um quarto momento estes animais no PND 90 foram avaliados quanto a resposta autonômica a um certo agente estressor.

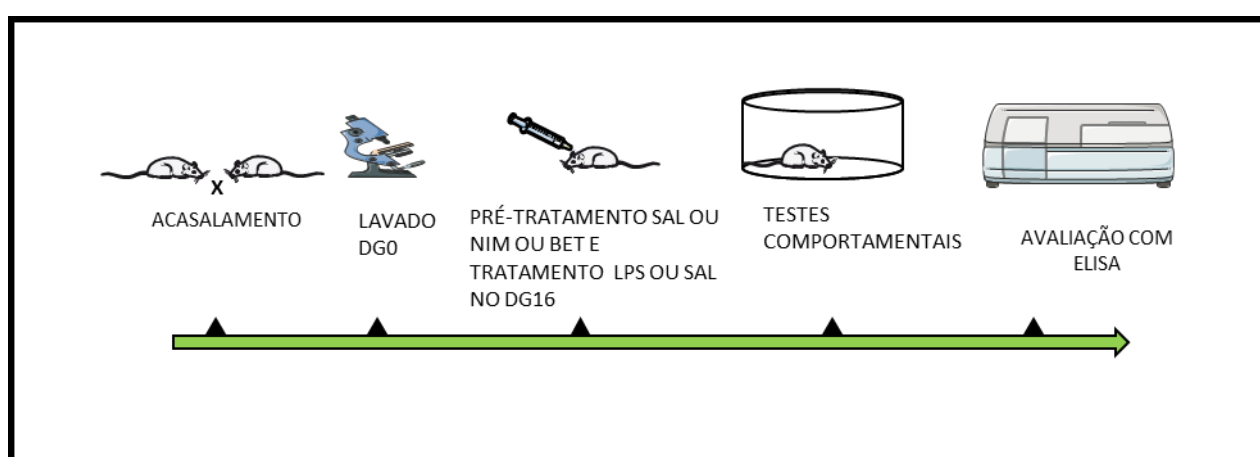
Os animais passaram por cirurgia de cateterização pela artéria femoral onde foi aferida a pressão arterial e a frequência cardíaca durante o teste de estresse por contenção (EPC).

90 minutos após o início do teste de estresse por contenção os animais foram anestesiados com TBE e perfundidos com SAL HEP e PFA para fixação dos tecidos encefálicos onde foi realizado imunistoquímica para c-fos.

Um outro grupo de animais passaram pelo teste de medo condicionado ao contexto e da mesma forma que os animais cateterizados passaram por perfusão para fixação dos tecidos encefálicos para realização de imunistoquímica.

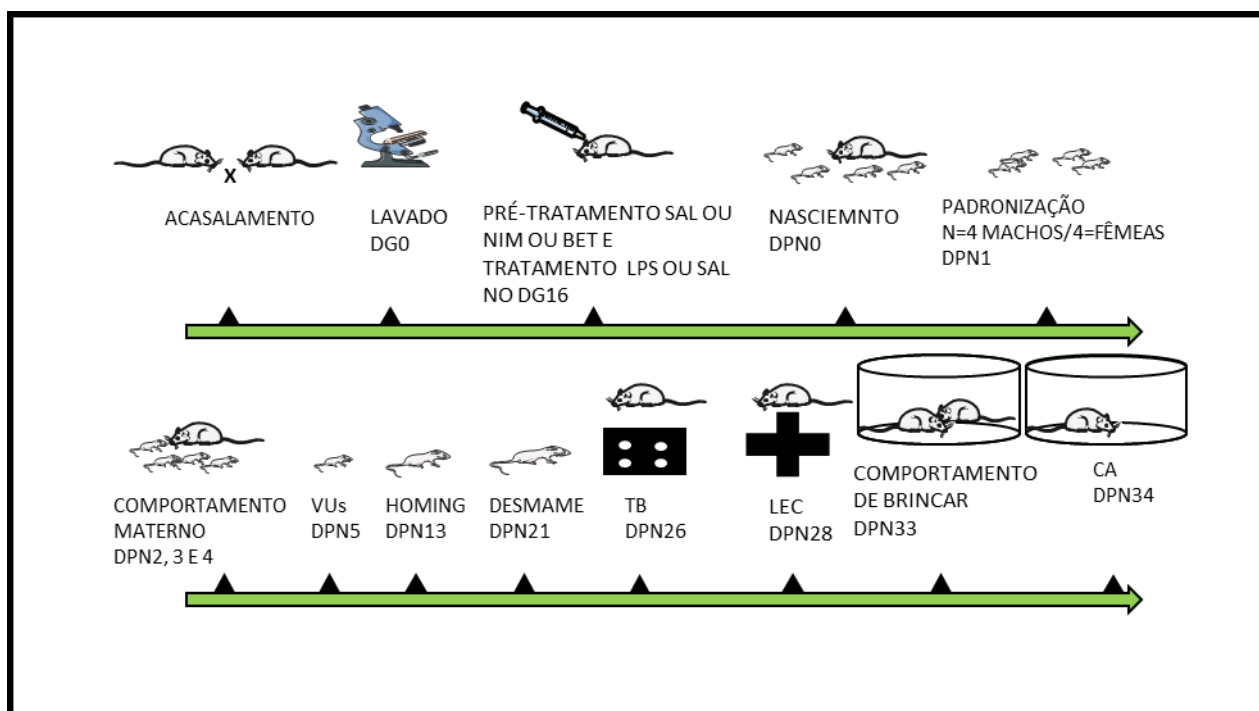
Todos os testes comportamentais da prole foram realizados entre 7h e 13h e de acordo com os protocolos CEUA em anexo.

Figura 3 - Delineamento experimental com as ratas prenhas



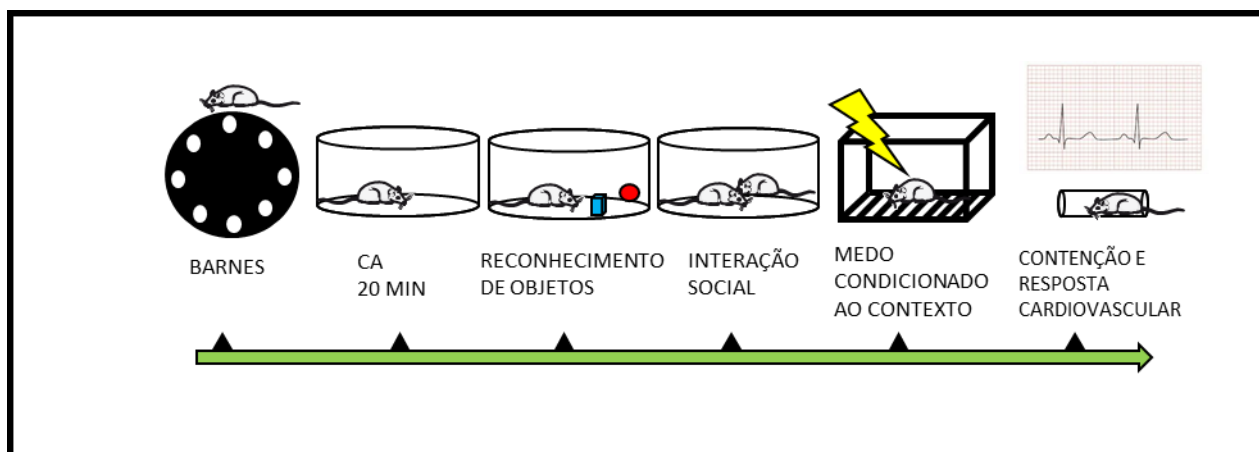
Fonte: do autor.

Figura 4 - Delineamento experimental com os filhotes durante pré-púberes e púberes



Fonte: do autor.

Figura 5 - Delineamento experimental com os filhotes durante a vida adulta



Fonte: do autor.

4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS NAS RATAS PRENHAS

4.5.1 Teste de campo aberto

As ratas prenhas 2h e 6h após receberem tratamento com LPS ou SAL juntamente com pré-tratamento de VEIC ou NIM ou BET foram submetidas ao teste de CA para avaliação da atividade locomotora para a caracterização do

comportamento doentio. As ratas foram colocadas individualmente no centro de uma arena circular de acrílico com diâmetro de 60 cm e paredes com 50 cm de altura e filmadas por 5 min para posterior análise, em seguida o aparato foi limpo com solução de etanol a 5%. A análise foi realizada de forma automática utilizando o *software Ethovision XT versão 9.0*.

Fotografia 1 - Campo aberto



Fonte: do autor.

4.5.2 Ingestão alimentar e ganho ou perda de peso

15 min antes do tratamento com LPS ou SAL e pré-tratamento com VEIC ou NIM ou BET, os animais foram pesados e a ração retirada. Após a aplicação, uma porção de ração previamente pesada foi disponibilizada aos animais. 6h depois esta ração foi novamente pesada para verificação da ingestão alimentar. Da mesma maneira, no dia seguinte 24h após os tratamentos, a ração foi novamente pesada para a verificação da ingestão alimentar. Da mesma forma, as ratas foram pesadas para verificação se houve ganho ou perda de peso. Este teste foi realizado para avaliação da anorexia e observar a perda de peso provocada pelo LPS (DANTZER, 2004).

4.5.3 Quantificação das citocinas e realização do Western blot

As ratas tratadas com LPS ou SAL e pré-tratadas com VEIC ou NIM ou BET foram anestesiadas com tribromoetanol (TBE), na dose de 250 mg/kg e decapitadas

para coleta de sangue do tronco, placenta, líquido amniótico e cérebro fetal para quantificação de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) 2h pós tratamento.

Logo após o sangue foi submetido à centrifugação por um período de 15 minutos a 4000 rpm a 4°, afim de obter o plasma para posterior dosagem das citocinas usando o kit ELISA.

Da mesma forma, logo após a coleta dos tecidos (placenta, líquido amniótico e cérebro fetal) os mesmos foram congelados em nitrogênio líquido para conservação das amostras para posterior dosagem das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 usando o Kit ELISA, e realização da técnica de Western blot.

Os cérebros fetais foram homogeneizados em solução tampão de lise com inibidores de proteases, e centrifugados a 9200 rpm por 15 min. Logo após o sobrenadante foi coletado, e suas proteínas foram quantificadas através do teste de Bradford e as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram então dosadas usando o Kit ELISA.

4.5.4 Western blot

Da mesma forma que os cérebros fetais a placenta foi homogeneizada em tampão de lise com inibidores de proteases, e centrifugados a 9200 rpm por 15 min. Logo após o sobrenadante foi coletado, e suas proteínas foram quantificadas através do teste de Bradford e em seguida, por meio de eletroforese, as proteínas foram separadas e subsequentemente transferidas para uma membrana. As membranas foram então encubadas nos anticorpos anti-11 β -HSD2, as membranas foram digitalizadas através do equipamento de aquisição de imagens *ChemiDoc XRS +* e do software *ImageLab versão 6.0.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc.)*. A análise foi realizada em relação à proteína β -actina. A técnica de Western blot foi realizada para quantificar a expressão da enzima 11 β -HSD2 na placenta 6h depois de tratamento.

4.5.5 Comportamento materno

No DPN1 as ninhadas pesadas, contadas e padronizadas em 4 filhotes machos e 4 filhotes fêmeas, as ratas e sua prole foram alojadas em caixas de acrílico transparentes para facilitar a observação. Nos DPN2, 3 e 4 foi observado o Comportamento materno (CM). O CM foi observado nos períodos da manhã

(09h30min às 11h) e à tarde (15h30min às 17h) de 3 em 3 min perfazendo um total de 30 observações por período e 60 observações por dia.

foram avaliados os parâmetros de CM: Posição arqueada (cifose), sobre os filhotes, lambendo os filhotes, posição passiva, limpando-se e construindo o ninho), e comportamentos não maternos (CNM) alimentando-se, explorando fora do ninho e fora do ninho não explorando.

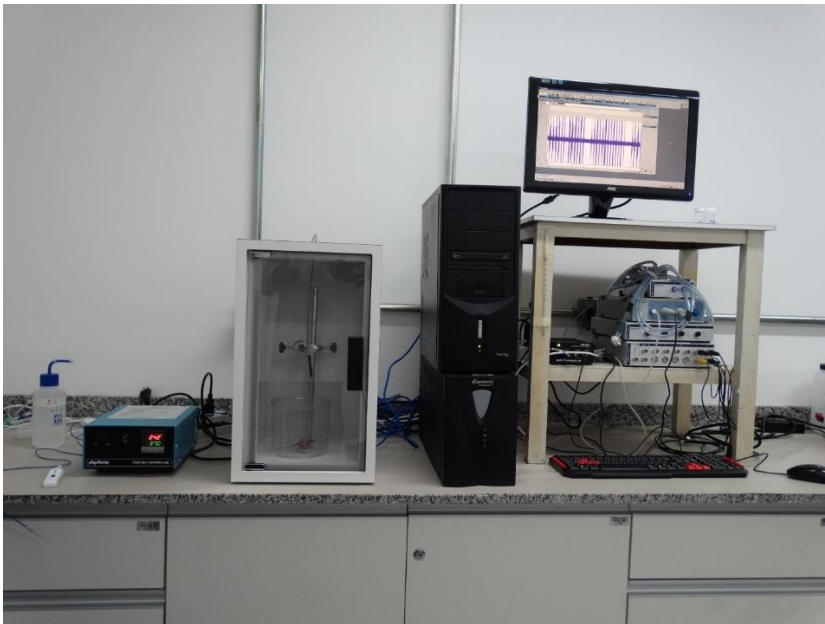
4.6 TESTES COMPORTAMENTAIS NA PROLE DURANTE A INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA

4.6.1 Teste de vocalização ultrassônica

O teste de VUs foi realizado nos filhotes no DPN5. Os filhotes que passaram pelo teste foram isolados da mãe e dos irmãos por 10 minutos em sala climatizada com temperatura mantida a 25°C e posteriormente submetidos ao teste durante 3 min. O teste consiste em colocar o filhote dentro de uma caixa com isolamento acústico, com um microfone de captação ultrassônica montado de forma suspensa, conectado a um amplificador (*Microphone Amplifier Med Associates inc*, modelo ANL-940-1) onde são gravadas as emissões das vocalizações e através do *Software LabChart* as gravações foram armazenadas em um computador e apresentadas como espectrogramas, onde foram posteriormente analisadas.

Filhotes de ratos comunicam-se por VUs entre de 20 e 90 kHz. Estas vocalizações mudam à medida que os filhotes desenvolvem em direção a comunicação acústica do rato adulto. Estudos de VUs em filhote de rato em uma variedade de contextos, incluindo o chamado isolamento induzido, contribui para investigação de emoções, interações sociais no início da vida, comportamento de apego, interações materno-infantil, comportamento juvenil, e desenvolvimento. VUs induzida por isolamento tem sido considerada um marcador de ansiedade com a sua taxa aumentada e diminuída por agentes ansiogênicos e ansiolítico, respectivamente (SPENCE *et al.*, 2016). O aparato foi limpo com solução de álcool a 5% entre os testes.

Fotografia 2 - Estação de gravação de vocalizações



Fonte: do autor.

4.6.2 Homing

O teste de *homing* foi aplicado no DPN13, os filhotes que passaram pelo teste foram isolados da mãe e dos irmãos por 30 min antes do teste.

O teste consiste em colocar o filhote em uma caixa de polipropileno a qual foi dividida em quatro partes iguais de maravalha, sendo colocado 3 partes com maravalha limpa, e 1 parte com maravalha proveniente do ninho materno. O filhote foi colocado na porção com maravalha limpa e virado com a cabeça para a parede contrária à porção com maravalha do ninho, na extremidade oposta da mesma.

O procedimento de resposta homing explora a motivação do filhote usando o olfato para atingir o seu ninho e de manter contato com sua mãe e irmãos. Ele é adequado e biologicamente relevante para examinar a aprendizagem espacial em roedores imaturos, como lembrando a localização do ninho, e tem um alto valor adaptativo para animal (MIKULECKA *et al.*, 2014).

O teste foi realizado durante 3 min onde foi avaliado a latência para o filhote entrar na porção com maravalha do proveniente do ninho (MELANCIA *et al.*, 2017).

Fotografia 3 - Caixa montada para o homing



Fonte: do autor.

4.6.3 Tábua de buracos

O aparato consiste de uma caixa de vidro de 40 cm largura x 40 cm comprimento x 40 cm altura, com uma tábua contendo 16 furos de 2,5 cm de diâmetro elevada à 15 cm do fundo da caixa por suportes, e montada sobre um fundo preto.

Um dia antes do teste todos os animais (inclusive os que não passaram pelo teste), foram levados a sala de comportamento para ambientação e lá permaneceram por 24h, no mesmo dia o filhote que passou pelo teste foi ambientado ao aparato sem a TB por 10 min. No dia seguinte à ambientação o filhote já ambientado passou pelo teste, o qual foi gravado para posterior análise. O teste foi realizado no PND26 e teve duração de 10 min.

Foi avaliada a frequência com que os animais mergulham a cabeça até a altura das orelhas dentro dos buracos. Este teste está associado a atividade exploratória (KUMAR e SHARMA, 2016) e comportamento estereotipado e repetitivo (SERVADIO *et al.*, 2016). O aparato foi limpo com solução de álcool a 5% entre os testes.

Fotografia 4 - Tábua de buracos



Fonte: do autor.

4.6.4 Labirinto em cruz elevado

O LEC consiste em um aparato com dois braços abertos e dois braços fechados, cada braço medindo 50 cm de comprimento e 10 cm de largura e elevados a 50 cm do solo. Filhotes no DPN28 foram isolados individualmente por 10 minutos e logo em seguida foram colocados no aparato com o focinho voltado para um dos braços fechados. Foi avaliado o tempo de exploração do braço aberto e o número de vezes que o animal esticou o corpo para entrar no braço aberto. Cada animal foi filmado por 5 minutos para posterior análise utilizando o *software Ethovision XT versão 9.0*. O aparato foi limpo com solução de álcool a 5% entre os testes.

Fotografia 5 - Labirinto em cruz elevado



Fonte: do autor.

4.6.5 Campo aberto

Filhotes no DPN34 foram submetidos ao teste de Campo Aberto. O teste foi realizado como descrito no item 4.5.1.

4.6.6 Comportamento de brincar

O teste de CB foi aplicado no DPN33 e consistiu em colocar dois animais da mesma idade e mesmo tratamento em uma caixa de vidro de 40 cm largura x 40 cm comprimento x 40 cm altura forrada com maravalha e verificar a interação entre eles.

Da mesma forma que o TB, um dia antes do teste todos os animais (inclusive os que não passaram pelo teste), foram levados a sala de comportamento para ambientação e lá permaneceram por 24h, no mesmo dia o filhote que passou pelo teste foi ambientado ao aparato individualmente por 10 min. No dia do teste, os animais previamente ambientados foram então isolados por 3,5h. Cada dupla de animal isolado e com mesmo tratamento (animais LPS foram confrontados com animais LPS e animais SAL foram confrontados com animais SAL) foram filmados por 10 min no dia do teste. O teste foi conforme descrito por (MELANCIA *et al.*, 2017).

Foram avaliadas as duplas, e os seguintes parâmetros: 1) frequência de solicitações para brincar; 2) frequência de aceite para brincar; 3) tempo de perseguição; 4) tempo de exploração ano-genital.

Fotografia 6 - Caixa montada para o teste de comportamento de brincar



Fonte: do autor.

4.7 TESTES COMPORTAMENTAIS NA PROLE DURANTE A VIDA ADULTA

4.7.1 Labirinto espacial de Barnes

O LEB consiste de uma plataforma circular de 120cm de diâmetro pintada de preto, com 20 furos de 10cm de diâmetro ao longo do perímetro e elevado a 100 cm do solo. Embaixo de um dos buracos é colocado uma caixa chamada de “caixa de destino”. Sobre o aparato é ligada uma luz de led de 50w sendo esta, muito aversiva para o animal forçando com este busque entrar na caixa destino para sua segurança. O teste é constituído de 1 dia de ambientação de 1 min (para que o animal conheça o aparato) e 10 dias de testes sendo dois ensaios por dia nos dias de treino de aprendizado (dias 1, 2, 3, 4 e 5) e reversão do aprendizado (7, 8 e 9), e um ensaio no dia dos testes de aprendizado (dia 6) e reversão do aprendizado (dia 10). Cada ensaio de treino teve duração máxima de 3 min onde foi avaliado a latência para entrada no buraco com a caixa de destino. Nos dias de teste e cada ensaio teve duração máxima de 1 min e 30 seg e foi avaliado a latência para exploração do buraco alvo, tempo de

exploração do quadrante alvo e número de erros do animal ao procurar o buraco alvo. Os animais com 8 semanas de vida foram colocados no centro da arena e filmados para posterior análise utilizando o software Ethovision XT versão 9.0. O aparato foi limpo com solução de álcool a 5% entre os testes.

Este teste assim como o labirinto aquático de Moris visa avaliar a memória espacial.

Fotografia 7 - Labirinto de Barnes



Fonte: do autor.

4.7.2 Campo aberto

Os animais com 9 semanas de vida foram submetidos ao teste de CA. O teste foi realizado conforme descrito no item 4.5.1. Cada animal foi colocado no centro da arena e filmado por 20 minutos para posterior análise utilizando o *software Ethovision XT versão 9.0*. O aparato foi limpo com álcool 5% entre os testes.

4.7.3 Reconhecimento de objetos

Com 9 semanas de vida foi realizado o teste de RO, este visa identificar a memória de discriminação de objetos pelos animais. O teste foi realizado na mesma arena de campo aberto. Um dia antes do teste o animal foi ambientado por 10 min ao aparato com maravalha cobrindo o piso. No primeiro dia de teste foram apresentados dois objetos iguais ao animal e foi deixado que o mesmo explorasse livremente os

objetos por 10 min. Estes objetos foram denominados objetos conhecidos. 2h depois o animal foi novamente colocado no aparato, desta vez com um objeto conhecido e um objeto novo diferente daquele apresentado anteriormente. 24h depois de apresentado aos objetos conhecidos, o animal foi novamente colocado no aparato com um objeto conhecido e um objeto diferente do apresentado anteriormente no teste de 2h. Os testes foram gravados durante 10 min e foi avaliado o tempo de interação do animal com os objetos. Este teste visa avaliar a memória de RO de curta (2h) e longa (24h) duração. Após cada teste os objetos foram limpos com álcool 5%.

Fotografia 8 - Aparato montado para o teste de reconhecimento de objeto



Fonte: do autor.

4.7.4 Interação social

Com 9 semanas de vida os animais passaram pelo teste de IS. O teste consiste em colocar dois animais da mesma idade e mesmo tratamento na mesma arena onde foi realizado o teste de campo aberto com o piso coberto com maravalha, e verificar o tempo de interação entre eles.

Os animais após passarem pelo teste de CA de 20 min, ambientação, teste de RO de 2h e 24h, passaram pelo teste de IS. No dia do teste, os animais previamente ambientados foram isolados por 3,5h. Cada dupla de animal isolado e com mesmo tratamento foram filmados por 10 min. Foi avaliado o tempo total de interação entre os animais.

Fotografia 9 - Campo montado para o teste de interação social



Fonte: do autor.

4.7.5 Cirurgia para inserção de Cateter na femoral

Com 9 semanas de vida os animais foram anestesiados com TBE 250mg/kg i.p. e um cateter de polietileno (PE-10) de 4 cm de comprimento foi implantado na artéria femoral para aferição da pressão arterial e frequência cardíaca. O cateter foi transpassado sob a pele e exteriorizado no dorso dos animais.

A resposta cardiovascular foi avaliada 24h depois da sessão de condicionamento. Logo após a cateterização os animais foram mantidos em caixas moradias individualizadas e colocados para recuperação na sala onde foi realizado o experimento para prévia ambientação. Os animais foram testados um por vez e uma única vez.

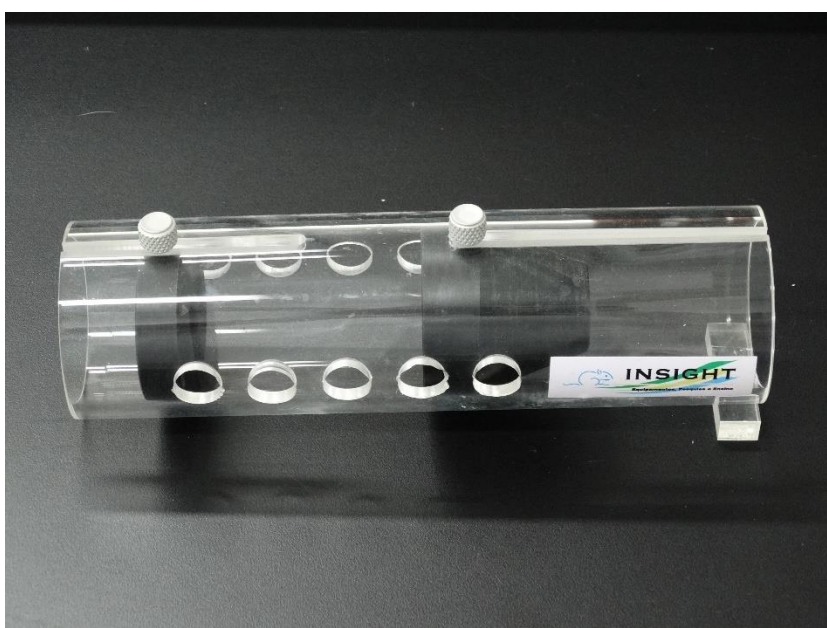
Os parâmetros cardiovasculares foram mensurados utilizando-se um transdutor de sinal acoplado ao cateter arterial que permitiu o processamento pelo computador (equipamento *AdInstruments®*, software *LabChart 7 Pro – PowerLab 4/30*). Durante 20 minutos foi medida a linha de base e então os animais foram colocados no aparato de estresse por contenção para aferida de 5 em 5 min durante 60 min os parâmetros cardiovasculares.

4.7.6 Teste de estresse por contenção

O teste consiste em colocar o animal em um tubo de contenção onde o animal não pode mover-se.

Com 9 semanas de vida os animais previamente cateterizados foram colocados no aparato de contenção por 60 min e verificada a PA através equipamento *PowerLab 4/30, AdInstruments®*, utilizando o *software LabChart 7 Pro*. Este teste visa verificar as respostas autonômica destes animais.

Fotografia 10 - Aparato para contenção



Fonte: do autor.

4.7.7 Perfusão e imunoistoquímica

90 min após o início do teste de estresse por contenção os animais foram anestesiados com TBE, na dose de 250 mg/kg de peso corporal e perfundidos através de uma punção intracardíaca com solução SAL HEP seguida de fixador PFA 4% preparado em solução de tampão fosfato (PB 0,1M). Os encéfalos foram então removidos e armazenados em fixador PFA 4% durante 4 horas e em seguida transferidos para uma solução de sacarose 30% preparada em PB 0,1M e armazenados à 4°C. Posteriormente os encéfalos foram seccionados em cortes de 30µm de espessura e em duplicatas utilizando-se um Criostato, e coletados em PB 0,01M e logo depois passaram por imunoistoquímica (VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2014; VITOR-VIEIRA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2021). Os cortes não utilizados foram

armazenados em solução anticongelante. Nestes cortes de tecidos foram realizadas marcações para c-fos.

Primeiramente, foi realizada a degradação da peroxidase endógena (solução de H₂O₂ ,1,5%) por 30 minutos, os cortes foram lavados com PB (0,01 M) 5 vezes por 5 minutos. Logo após, foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas com albumina de soro bovino 5% em 0,1 M de PB durante uma hora. Após o bloqueio da ligações inespecíficas os cortes foram incubados durante a noite com o anticorpo primário anti-fos de coelho (*Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA*) diluído 1:10.000 em PB (0,1 M) contendo 2% de *normal goat serum* e 0.3% *Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)* a 4°. No dia seguinte os cortes foram lavados por 3 vezes durante 5 min e após lavagem os cortes foram incubados com segundo anticorpo biotilado (*Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA*, diluído 1:200 em 1.5% de *normal goat serum - PB*) por 1h e logo depois lavados por 3 vezes durante 5 min e em seguida incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase (*Vector Elite*, 1:200 em PB) por 1 h ambos em temperatura ambiente. Para coloração, foi empregado diaminobenzidina (*DAB, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA*) intensificado com sulfato de níquel 1,5%. O produto da reação confere uma coloração violeta escuro – preto ao núcleo.

Por último, os cortes foram montados utilizando Gelatina de Albrecht (0,625% gelatina). As lâminas foram secas a temperatura ambiente, desidratadas com xileno e cobertas com Entellan. Os neurônios das áreas marcadas foram então contados com auxílio de um microscópio Nikon modelo H55L.

4.7.8 Medo condicionado ao contexto

O teste de medo condicionado ao contexto consiste de 3 etapas sendo: no primeiro dia habituação a caixa de choque por 10min; no segundo dia exposição ou não aos choques (6 choques nas patas com intensidade de 1,5 mA com duração de 3 segundos cada (*RESSTEL et al., 2006b*); e terceiro dia reexposição a caixa de choque, onde foi avaliado do tempo de congelamento (o tempo de congelamento é caracterizado por imobilidade do animal perante ao perigo ou medo, com total ausência dos movimentos motores voluntários menos a respiração). O teste foi realizado em uma câmara experimental de choque de 25 x 22 x 22 cm, com paredes de acrílico transparente para visualização e piso de grade composta por 18 hastes de

aço inoxidável (2 mm de diâmetro), com espaçamento de 1,5 cm de distância e ligados a um gerador de choque automática *Reflex Conditioner, modelo 8572*; Insight, Brasil.

Todos os animais foram testados apenas uma vez no período da manhã. O congelamento foi avaliado continuamente durante todo o ensaio de 10. O aparato foi limpo com solução de etanol a 5% entre os testes.

4.7.8.1 Vocalizações ultrassônicas aversivas

O teste de vocalização ultrassônica aversiva foi realizado nos animais no dia da reexposição ao choque. O teste consiste em um microfone de captação ultrassônica montado na caixa de reexposição ao choque de forma suspensa, conectado a um amplificador (*Microphone Amplifier Med Associates inc, modelo ANL-940-1*) as gravações das vocalizações foram feitas através do *Software LabChart* as gravações foram apresentadas em um computador e armazenadas como espectrogramas, onde foram posteriormente analisadas.

Três tipos de classes de vocalizações ultrassônicas, são emitidas por ratos jovens e adultos, as vocalizações ultrassônicas de 22kHz, 40kHz e as de 50kHz (REYES et al., 2020). Em resposta a situações aversivas, as vocalizações ultrassônicas de 22kHz são emitidas. O estímulo elétrico nas patas é considerado como aversivo para tal situação. Somente as emissões nessa frequência foram consideradas no presente trabalho.

Fotografia 11 - Aparato de choque para o teste de medo condicionado ao contexto



Fonte: do autor.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o *Software GraphPad Prism versão 8.0* e expressos com média \pm erro padrão da média (EPM).

Todos os dados passaram pelos testes de “*Anderson-Darling, D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov*” de Normalidade sendo que os valores maiores que 0.05 ($p > 0.05$) foram consideradas dentro da distribuição normal.

Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste *T-Student* Sendo os resultados obtidos com valores inferiores 0.05 ($p < 0.05$) considerados significativos.

Para comparação entre dois grupos e dois parâmetros foi utilizado o teste “*ANOVA de duas vias*” seguido pelo “*pós-teste de Tukey*”, e para comparação entre dois grupos e três parâmetros foi utilizado o teste “*ANOVA de três vias*” seguido pelo “*pós-teste de Tukey*”, sendo os resultados obtidos com valores inferiores 0.05 ($p < 0.05$) considerados significativos.

Para estimar o tamanho do efeito do tratamento entre dois grupos foi utilizado o teste “*d de Cohen*”, sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$) para o “*d de Cohen*”.

Para estimar o tamanho do efeito do tratamento entre mais de dois grupos foi utilizado o teste de “*Ômega-quadrado*” (ω^2) sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o “*Ômega-quadrado*”.

Para estimar a sobrevida de dois grupos de animais tratados foi utilizado o teste de “*Chi-quadrado*” (χ^2). Sendo os resultados obtidos com valores inferiores 0.05 ($p < 0.05$) considerados significativos. E para estimar a chance de ocorrência de um evento foi calculado *Odds Ration (OR)*.

6 RESULTADOS

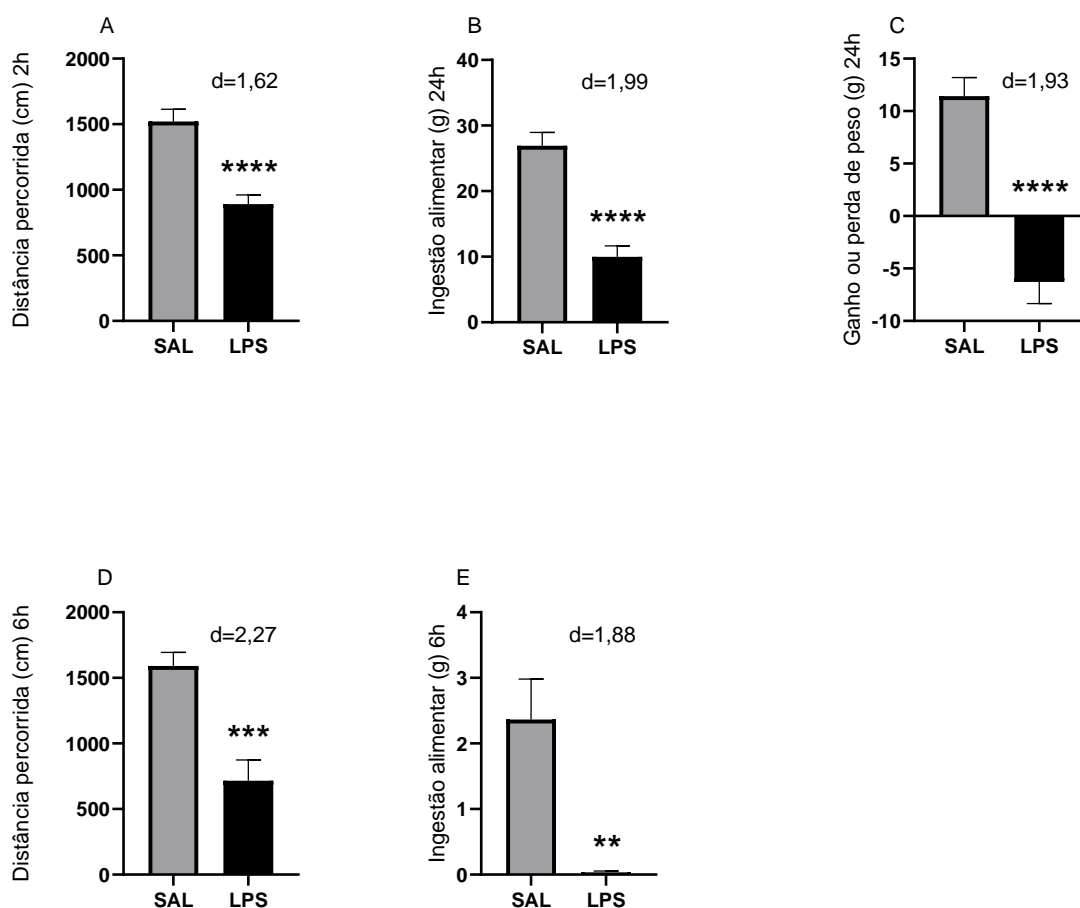
6.1 RESULTADOS DAS RATAS QUE RECEBERAM TRATAMENTO COM LPS OU SAL NO DG16.

6.1.1 Resultados quanto ao desenvolvimento do comportamento doentio.

Conforme mostrado no gráfico 1, o LPS induziu o comportamento doentio nas ratas quando aplicado na dose de 500 µg/kg no DG16.

Observamos que estas ratas percorreram uma menor distância em centímetros (cm) no campo aberto durante 5 min 2h $p < 0.0001$; $d = 1.62$ ($n = 15-34$), e 6h $p < 0.001$; $d = 2.27$ ($n = 9-8$) depois de receberem tratamento com LPS, ainda ingeriram menor quantidade de alimento durante 6h $p < 0.01$; $d = 1.88$ ($n = 8-9$) e 24h $p < 0.0001$; $d = 1.99$ ($n = 15-29$), além de perderem peso durante 24h $p < 0.0001$; $d = 1.93$ ($n = 15-29$) em comparação ao grupo das ratas controle.

Gráfico 1 - Resultado quanto ao desenvolvimento do comportamento doentio das ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto ao desenvolvimento do comportamento doentio das ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16. A) distância percorrida (cm) no teste de campo aberto 2h 5 min (n=15-34), B) ingestão alimentar durante 24h (g) (n=15-29), C) perda ou ganho de peso durante 24h (g) (n=15-29), D) distância percorrida (cm) no teste de campo aberto 6h (n=9-8) e E) ingestão alimentar durante 6h (g) (n=8-9). Dados expressos em média ± EPM. Os símbolos representam significância, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. Quando comparados ao grupo controle. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

Tabela 1 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao comportamento doentio das ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.

	SAL		LPS		teste t	d de Cohen		
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de p	d	Número	
CA 2h	1521	93,33	890,4	70,96	****	<0.0001	1.62	n=15-34
IA 2h	26,92	2,025	9,978	1,678	****	<0.0001	1.99	n=15-29
P/G (g)	11,43	1,766	-6,276	2,066	****	<0.0001	1.93	n=15-29
CA 6h	1592	103,4	715,2	158,9	***	0.0003	2.27	n=9-8
IA 6h	2,365	0,6183	0,03556	0,02082	**	0.0011	1.88	n=8-9

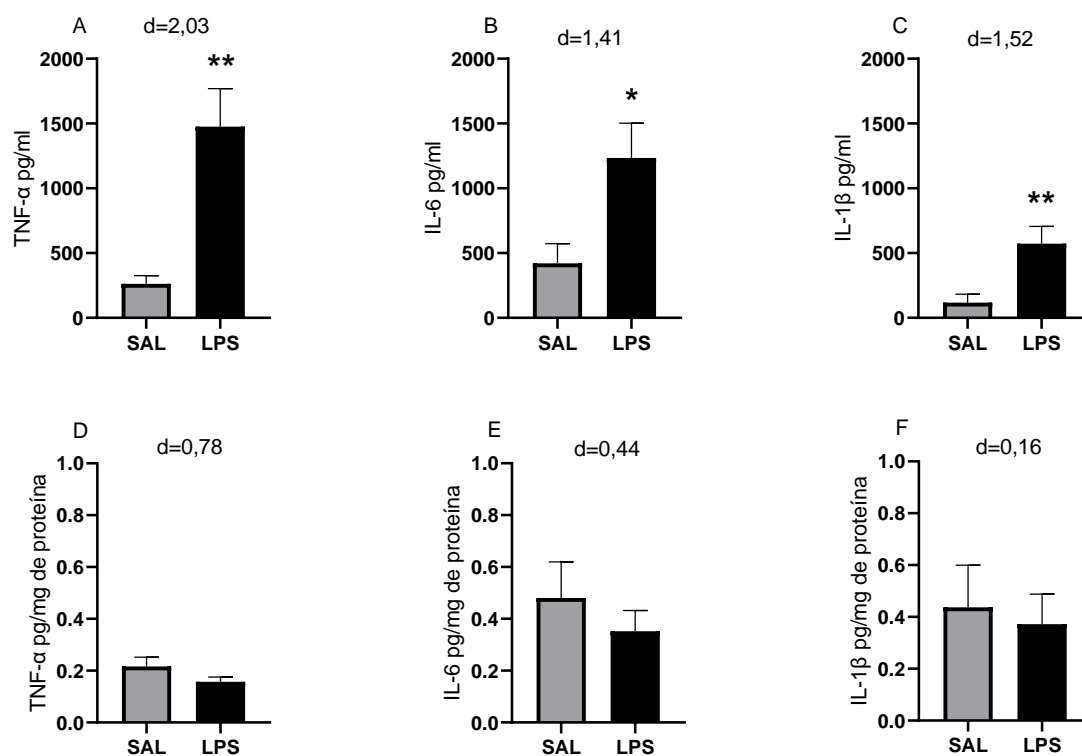
Fonte: do autor.

Nota: (CA 2h) distância percorrida (cm) no teste de campo aberto de 2h durante 5 min (IA 24h), ingestão alimentar durante 24h (g), (P/G 24h) perda ou ganho de peso durante 24h (g), (CA 6h) distância percorrida (cm) no teste de campo aberto 6h, (IA 6h) ingestão alimentar durante 6h (g) das ratas que recebera tratamento com LPS no DG16. Valor de p referente ao teste t, e valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

6.1.2 Resultados quanto as concentrações de citocinas no plasma materno, líquido amniótico e cérebro fetal.

Podemos observar no gráfico 2 que o LPS elevou as concentrações das citocinas plasmáticas TNF- α $p < 0.01$; $d = 2.03$ ($n = 7-8$), IL-6 $p < 0.05$, $d = 1.41$ ($n = 7-7$) e IL-1 β $p < 0.01$; $d = 1.52$ ($n = 8-8$) das ratas prenhas 2h após receberem tratamento com LPS. Porém, não houve detecção destas citocinas no líquido amniótico ($n = 7-7$) dos grupos e não houve diferença na concentração destas citocinas no cérebro fetal 2h após tratamento entre os grupos ($n = 7-7$).

Gráfico 2 - Resultados quanto as concentrações de citocinas plasmáticas das ratas prenhas e do cérebro fetal 2h após receberem tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto as concentrações de citocinas plasmáticas: A) TNF- α (pg/ml) (n=7-8), B) IL-6 (pg/ml) (n=7-7) e C) IL-1 β (pg/ml) (n=8-8), 2h após as ratas receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16, e do cérebro fetal D) TNF- α (pg/mg de proteína) (n=7-7), E) IL-6 (pg/mg de proteína) (n=7-7) e F) IL-1 β (pg/mg de proteína) (n=7-7) coletados no DG16 2h pós-tratamento com LPS ou SAL. Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Quando comparados ao grupo controle. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0,2$), pequeno ($0,2 \leq d < 0,5$), moderado ($0,5 \leq d < 0,8$), grande ($0,8 \leq d < 1,2$), e muito grande ($1,2 \leq d < 2,0$).

Tabela 2 - Análise através do teste t-student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto aos níveis de citocinas plasmáticas das ratas prenhas e do cérebro fetal 2h após receberem tratamento com LPS ou SAL no DG16.

	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
Plasma	Média	EPM	Média	EPM	Valor de P	d	Número	
TNF-α	261,8	64,33	1476	293	**	0.0022	2.03	n=7-8
IL-6	421,5	150,5	1234	269	*	0.0217	1.41	n=7-7
IL-1β	118,3	64,99	572,2	134,3	**	0.0088	1.52	n=8-8

	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
Cérebro	Média	EPM	Média	EPM	Valor de P	d	Número	
TNF-α	0,2161	0,03564	0,1569	0,01892	NS	0.1683	0.78	n=7-7
IL-6	0,4808	0,1385	0,3519	0,08038	NS	0.4365	0.44	n=7-7
IL-1β	0,4375	0,1619	0,3721	0,1157	NS	0.7482	0.16	n=7-7

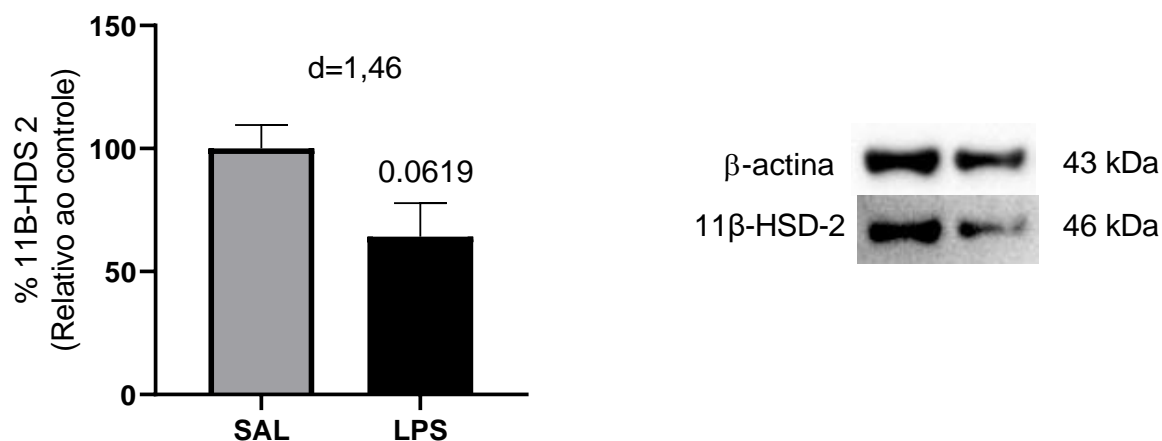
Fonte: do autor.

Nota: Concentrações de citocinas plasmáticas A) TNF- α (pg/ml), B) IL-6 (pg/ml) e C) IL-1 β (pg/ml), 2h após as ratas receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16, e concentração de citocinas no cérebro fetal D) TNF- α (pg/mg de proteína), E) IL-6 (pg/mg de proteína) e F) IL-1 β (pg/mg de proteína) coletados no DG16 2h pós-tratamento com LPS ou SAL. Valor de p referente ao teste t, e valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

6.1.3 Resultado quanto a expressão enzima 11- β hidroxisteroide desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD-2) na placenta de ratas 6h após receberem tratamento com LPS ou SAL.

Podemos observar no gráfico 3 que o LPS tendeu a reduzir a expressão da enzima 11 β -HSD-2 $p=0,0619$; $d=1.46$ ($n=5-4$) na placenta das ratas 6h após o tratamento em comparação ao grupo controle.

Gráfico 3 - Expressão da enzima 11 β -HSD-2 na placenta 6h após o tratamento com LPS ou SAL.



Fonte: do autor.

Nota: Resultado quanto a expressão da enzima 11 β -HSD-2 na placenta 6h após as ratas receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16. Dados expressos em média \pm EPM onde $p=0.0619$. Quando comparados ao grupo controle. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

Tabela 3 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto a quantificação da enzima 11 β -HSD-2 na placenta 6h após o tratamento com LPS ou SAL.

	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de p	d	Número	
11β-HSD-2	100	21,36	64,21	27,2	NS	0.0619	1.46	n=5-4

Fonte: do autor.

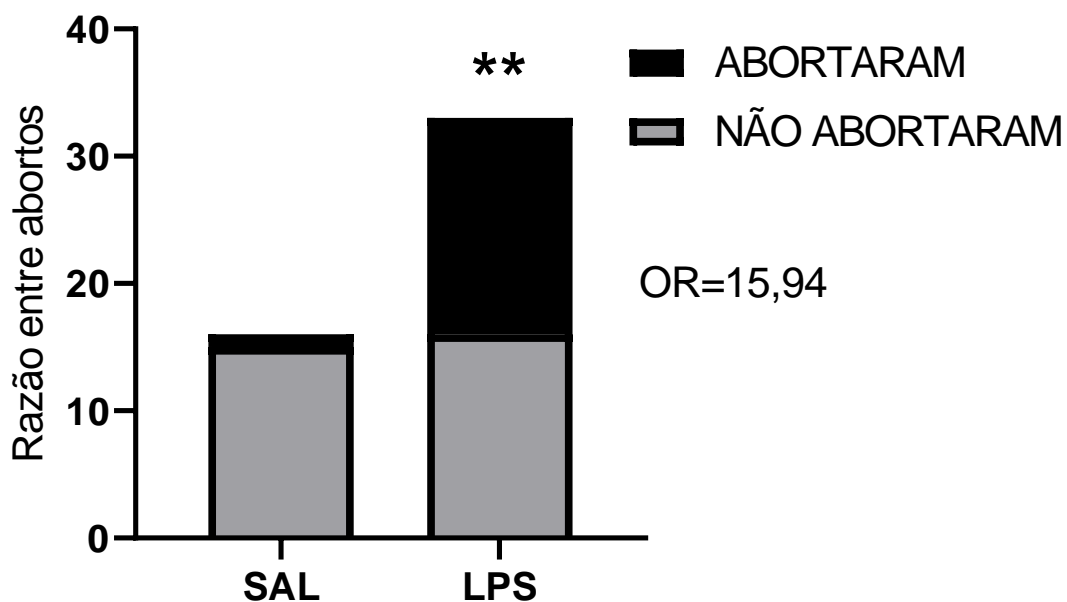
Nota: Expressão da enzima 11 β -HSD-2 na placenta 6h após as ratas receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16. Valor de p referente ao teste t , e valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

6.1.4 Resultado quanto as ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL e abortaram ou não.

Conforme demonstrado no gráfico 4, dentro dos grupos tratados foi observado que as ratas que receberam LPS no DG16 sofreram mais abortos do que as ratas que receberam SAL.

Dentre as ratas prenhas foi maior o número de abortos do grupo que recebeu LPS no DG16 $17/33=51,52\%$ $n=33$ quando comparado ao grupo controle $1/15=5,56\%$ $n=16$ onde $p<0.01$. Sendo esta, a relação das ratas que sofreram abortos ou não. Da mesma forma, observamos que as ratas que receberam LPS tiveram 15,94 vezes mais chances de abortarem do que as ratas controle, evidenciado pelo ODDS RATIO (OR=15,94).

Gráfico 4 - Resultado a razão quanto ao número de aborto ou não abortos causados pelo LPS em comparação ao grupo SAL.



Fonte: do autor.

Nota: Resultado quanto a razão do número de abortos ou não abortos causados pelo tratamento com LPS ou SAL. Dados expressos em valores absolutos de contingência. Os símbolos representam significância $**p<0.01$ e ODDS RATION (OR) é a chance de um evento ocorrer.

Tabela 4 - Análise dos dados de Qui-quadrado das ratas que abortaram ou não.

	SAL	LPS			
Não abortos	15	16			
Abortos	1	17			
Qui-quadrado	Valor de p		Odds Ratio	95% IC	
$\chi^2=9500,1$ $z=3.082$	**	0.0021	OD=15,94	2,217 to 176,8	

Fonte: do autor.

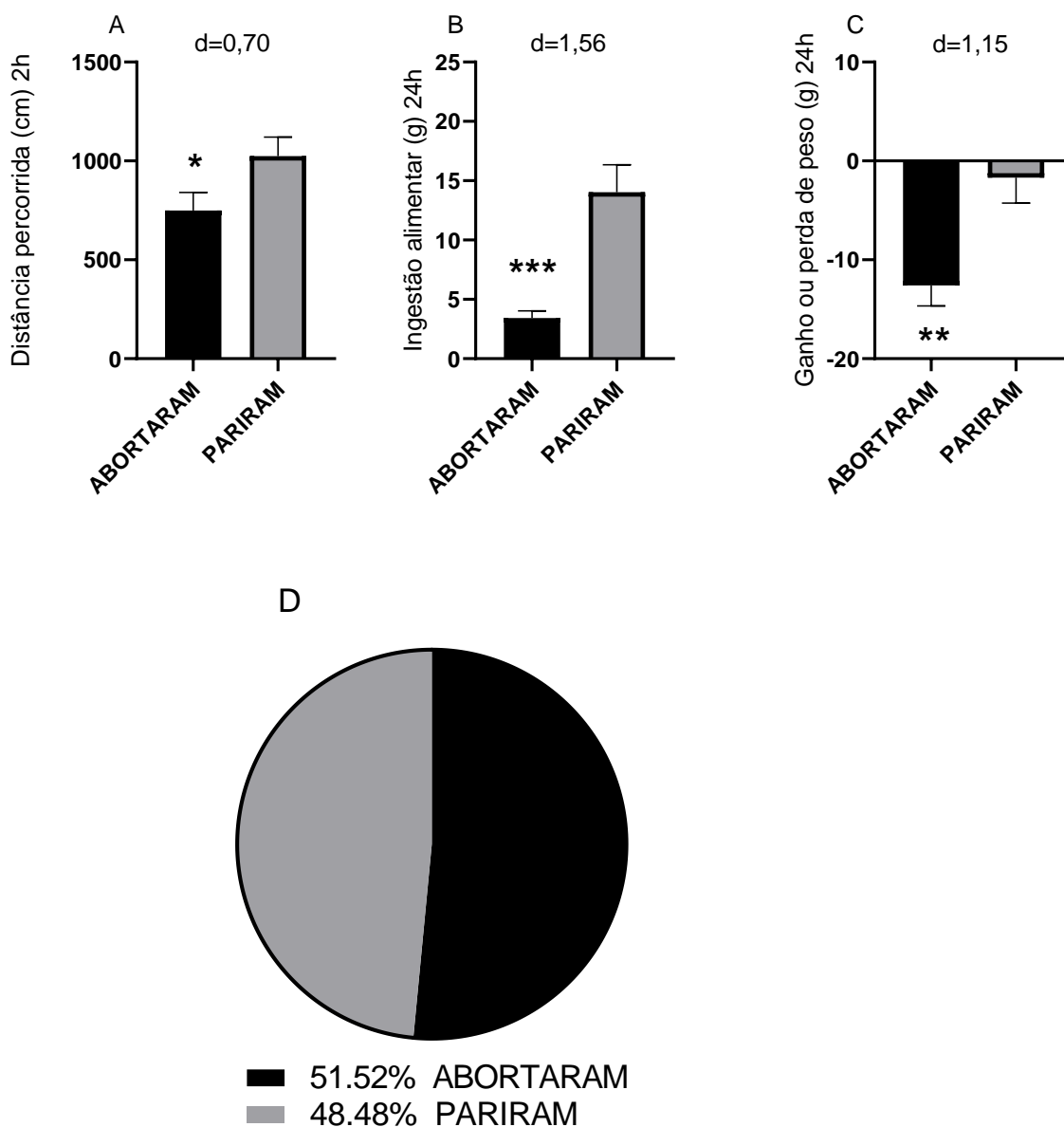
Nota: Valores de Qui-quadrado (χ^2), valores de p mostrando a significância, valores de odds ratio (OR) que é a chance de um evento ocorrer e intervalo de confiança (IC).

6.1.5 Resultado somente das ratas que receberam tratamento com LPS e abortaram ou não.

Como apresentado no gráfico 5, dentro do grupo das ratas que receberam tratamento com LPS durante a gestação e desenvolveram comportamento doentio, foi observado que houveram mais abortos pós-tratamento.

Observamos que do total de ratas tratadas com LPS durante a gestação (n=33) que 51.52% (n=17) abortaram e 48.48% (n=16) levaram a prenhez a termo. As ratas que abortaram percorreram uma menor distância no teste de campo aberto durante 5 min 2h depois de receberam tratamento com LPS $p<0.05$, $d=0.70$ (n=17-18), ingeriram menor quantidade de alimento durante 24h $p<0.001$; $d=1,56$ (n=17-18) e perderam mais peso em 24h $p<0.01$; $d=1,15$ (n=17-18) em comparação as ratas que receberam tratamento com LPS e não abortaram.

Gráfico 5 - Resultados quanto aos abortos causados pelo LPS.



Fonte: do autor.

Nota: Resultado quanto aos abortos causados pelo tratamento com LPS. A) Distância percorrida (cm) pelas ratas que sofreram ou não aborto no campo aberto 2h após receberem LPS, B) ingestão alimentar (g) das ratas que sofreram ou não aborto, 24h após receberem LPS, C) perda de peso (g) das ratas que sofreram ou não aborto, 24h após receberem LPS e D) percentual de abortos das ratas que receberam LPS (n=33 animais). Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Quando comparadas ao grupo que não sofreram abortos. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

Tabela 5 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao comportamento doentio das ratas que receberam tratamento com LPS no DG16 e abortaram ou não.

	Abortos		Paridas		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de P	d	Número	
CA 2h	749,5	90,7	1025	96,5	*	0.0454	0.70	n=17-18
IA 24h	3,434	0,5972	14,02	2,319	***	0.0001	1.56	n=17-18
P/G (g)	-12,59	2,081	-1,688	2,58	**	0.0024	1.15	n=17-18
Ratas que abortaram			%	51.52				
Ratas que pariram			%	48.48				

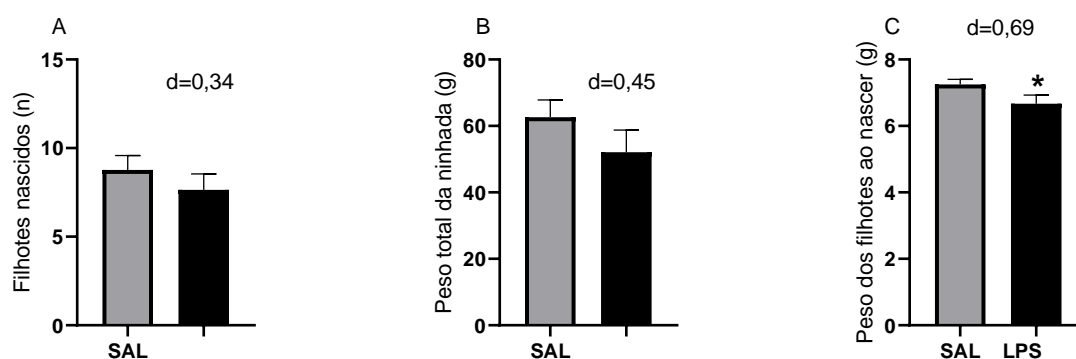
Fonte: do autor.

Nota: (CA 2h) distância percorrida (cm) no teste de campo aberto 2h durante 5 min (IA 24h), ingestão alimentar durante 24h (g), (P/G) perda ou ganho de peso durante 24h (g), e % de ratas que abortaram ou não. . Valor de p referente ao teste t, e valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

6.1.6 Resultados quanto ao nascimento da prole das ratas que receberam LPS ou SAL.

Como apresentado no gráfico 6 observamos que o comportamento doentio causado pelo LPS aplicado no DG16 não reduziu o número de filhotes nascidos por ninhada e não reduziu o peso total da ninhada no DPN1 em comparação ao grupo controle. No entanto, observamos que os filhotes de ratas que receberam LPS nasceram com peso menor quando comparados aos filhotes do grupo controle $p < 0.05$; $d = 0.69$ (n=13-17).

Gráfico 6 - Resultados quanto as ninhadas das ratas tratadas com LPS ou SAL durante a prenhez.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados das ninhadas quanto ao: A) número de filhotes que nasceram, B) peso total da ninhada (g) e peso do filhote (g) no DPN1, de filhotes machos e fêmeas de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16 (n=13-17). Dados expressos em média ± EPM. Quando comparados ao grupo controle. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

Tabela 6 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao nascimento da prole de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.

	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de P	d	Número	
NFN	8,769	0,8098	7,647	0,8991	NS	0.3769	0.34	n=13-17
PTN	62,65	5,205	52,09	6,669	NS	0.2449	0.45	n=13-17
PFN	7,253	0,1486	6,67	0,2593	*	0.0198	0.69	n=13-17

Fonte: do autor.

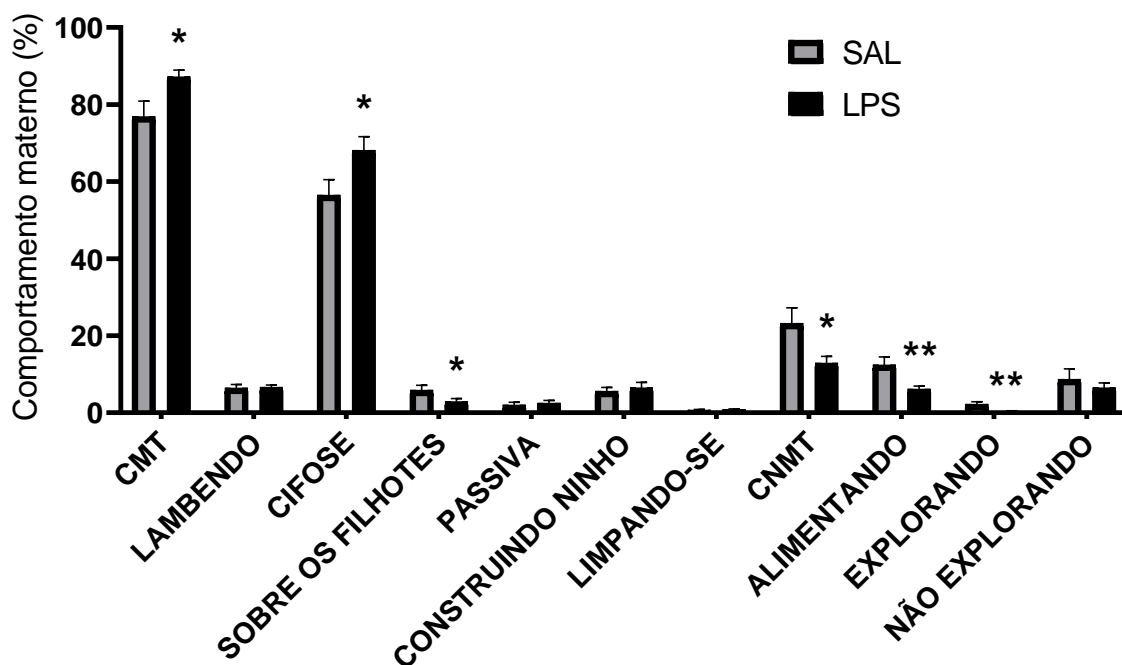
Nota: (NFN) número de filhotes que nasceram, (PTN) peso total da ninhada (g) no DPN1 e (PFN) peso do filhote (g) no DPN1. Valor de p referente ao teste t, e valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

6.1.7 Resultados quanto aos cuidados maternos pós-nascimento nos DPN2, 3 e 4 da prole de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.

O gráfico mostra o percentual de tempo gasto cuidando dos filhotes pelas ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL. Observamos que as ratas que apresentaram comportamento doentio causado pelo LPS cuidaram melhor da prole

de forma geral, evidenciado pelo maior tempo gasto de comportamento materno total (CMT) $p < 0.05$; $d = 0.93$, pelo parâmetro materno de “posição arqueada (cifose)” $p < 0.05$; $d = 0.84$ e pelo tempo reduzido de comportamento não materno total (CNMT) $p < 0.05$; $d = 0.93$ e pelos parâmetros não maternos “alimentando-se” $p < 0.01$; $d = 1.05$ e “fora do ninho não explorando” $p < 0.01$; $d = 1.11$ em comparação ao grupo controle ($n = 15-12$). Houve uma redução no parâmetro materno “sobre os filhotes” $p < 0.05$; $d = 0.78$ em comparação ao controle. Não houve diferença entre os grupos nos parâmetros maternos, “lambendo os filhotes”, “em posição passiva alimentando”, “construindo ninho” e “limpando-se”, e do parâmetro não materno “explorando fora do ninho”.

Gráfico 7 - Resultados quanto aos cuidados maternos e não maternos de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto ao % de tempo gasto com cuidados maternos e não maternos com a prole nos PND2, 3 e 4 das ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16. Parâmetros maternos: Comportamento materno total (CMT), "lambendo" os filhotes, em "cifose" amamentado, "sobre os filhotes" não amamentando, em posição "passiva", "construindo o ninho" e "limpando-se". Parâmetros não-maternos: Comportamento não materno total (CNMT), "alimentando", "explorando fora do ninho" e fora do ninho "não explorando" (n=15-12 por grupo). Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Quando comparados ao grupo controle. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

Tabela 7 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto aos cuidados maternos pós-nascimento da prole de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.

	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de p	d	Número	
CMT	76,81	4,069	87,19	1,794	*	0.0191	0.93	n=12-15
Lamb	6,343	1,022	6,556	0,621	NS	0.8541	0.07	n=12-15
Cif	56,44	4,094	68,11	3,531	*	0.0398	0.84	n=12-15
Sob	5,833	1,262	2,852	0,8112	*	0.0497	0.78	n=12-15
Pass	1,991	0,7567	2,444	0,7586	NS	0.6796	0.16	n=12-15
CN	5,556	0,991	6,444	1,45	NS	0.6352	0.19	n=12-15
Limp	0,6481	0,2032	0,7778	0,2531	NS	0.7036	0.15	n=12-15
CNMT	23,19	4,069	12,81	1,794	*	0.0191	0.93	n=12-15
Alim	12,36	2,13	6,111	0,7763	**	0.0061	1.05	n=12-15
EFN	2,176	0,6989	0,2963	0,1868	**	0.0084	1,11	n=12-15
FNNE	8,657	2,766	6,407	1,31	NS	0.4400	0.29	n=12-15

Fonte: do autor.

Nota: Parâmetros maternos: (CMT) Comportamento materno total, (Lamb) “lambendo” os filhotes, (Cif) em “cifose” amamentado, (Sob) “sobre os filhotes” não amamentando, (Pass) em posição “passiva”, (CN) “construindo o ninho” e (Limp) “limpando-se”. Parâmetros não-maternos: (CNMT) comportamento não materno total, (Alim) “alimentando”, (EFN) “explorando fora do ninho” e (FNNE) fora do ninho “não explorando”. Valor de p referente ao teste t, e valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

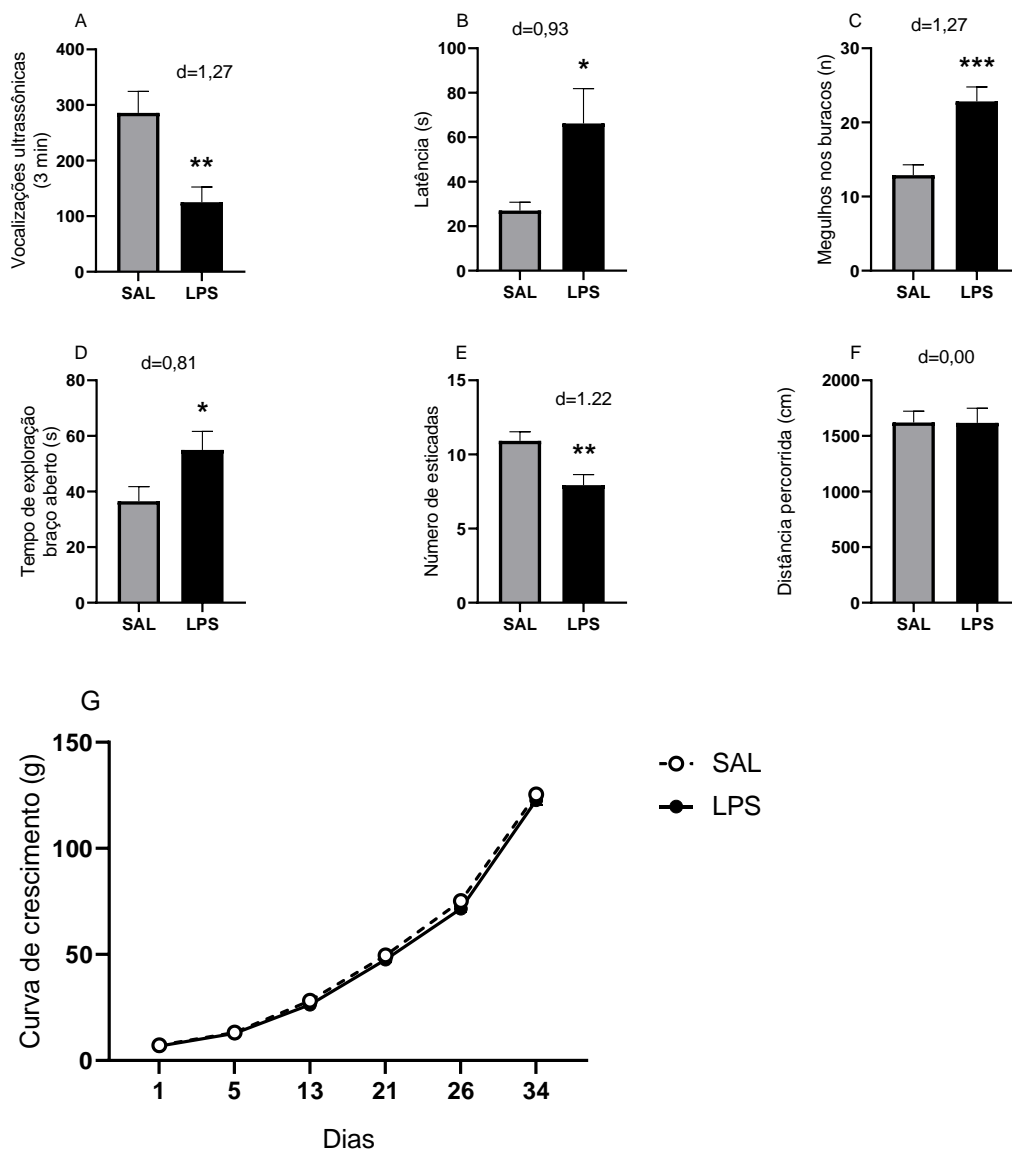
6.2 RESULTADOS QUANTO O COMPORTAMENTO DOS FILHOTES PRÉ-PÚBERES E PÚBERES.

Conforme apresentado no gráfico 8 os filhotes das ratas que apresentaram comportamento doentio induzido pelo LPS expressaram vários déficits comportamentais em comparação aos filhotes controle.

Podemos observar no gráfico 8 que houve uma redução nos parâmetros de comunicação dos filhotes das ratas que receberam LPS, evidenciado pela baixa na emissão de vocalizações ultrassônicas $p < 0.01$; $d = 1,27$ ($n = 14-11$) no DPN5, redução na interação do filhote com a ninhada, evidenciado pelo aumento na latência para alcançar a porção com a maravalha proveniente do ninho materno no teste de *homing*

$p < 0.05$; $d = 0.93$ ($n = 14-11$) no DPN13, aumento do comportamento repetitivo mostrado pelo aumento no número de mergulhos com a cabeça nos buracos, do teste de tábua de buracos $p < 0.001$; $d = 1.27$ ($n = 25-16$) no DPN26, dificuldade de avaliação de risco destacado pelo menor número de esticadas para entrar no braço aberto $p < 0.01$; $d = 1.22$ e maior tempo de exploração dos braços abertos no teste de labirinto em cruz elevado $p < 0.05$; $d = 0.81$ ($n = 15-12$) no DPN28, em comparação ao grupo controle. Não houve diferença na mobilidade entre os grupos conforme mostrado pela distância percorrida (cm) no CA durante 5 min no DPN34, e da mesma forma não houve diferença entre os grupos quanto ao peso dos filhotes machos durante o crescimento nos DPN1, 5, 13, 21, 26 e 34, como mostrado na curva de crescimento ($n = 11-14$ por grupo).

Gráfico 8 - Resultados quanto o comportamento dos filhotes machos pré-púberes de ratas que receberam tratamento com LPS ou LPS no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultado quanto ao comportamento dos filhotes machos de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16. A) quanto ao: número de vocalizações ultrassônicas durante 3 min no DPN5 (n=11-14), B) latência (s) para entrada na porção com maravalha do ninho no teste de *homing* no DPN13 (n=11-14), C) número de mergulhos no teste de tábua de buracos no DPN26 (n=16-24), D) tempo gasto (s) nos braços abertos e E) número de esticadas no teste de labirinto em cruz elevado no DPN28 (n=12-15), F) distância percorrida (cm) no campo aberto durante 5 min no DPN34 (n=17-24) e G) curva de crescimento (g) dos filhotes pesados nos DPN1, 5, 13, 21, 26 e 34 (n=11-14). Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ quando comparados ao grupo controle. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

Tabela 8 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao comportamento dos filhotes na infância e adolescência de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.

	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de p	d	Número	
Vus	285,8	38,7	125,2	27,21	**	0.002	1.27	n=11-14
Homing	27	3,778	66,21	15,64	*	0.0402	0.93	n=11-14
TB	12,88	1,405	22,83	1,952	***	0.0006	1.27	n=16-24
LEC	36,53	5,262	54,95	6,682	*	0.0476	0.81	n=12-15
Est LEC	10,92	0,6088	7,93	0,7136	**	0.0049	1.22	n=12-15
CA	1621	101,1	1617	131,9	NS	0.9845	0.00	n=17-24

Fonte: do autor.

Nota: (Vus) Vocalizações ultrassônicas durante 3 min no DPN5, *homing* no DPN13 (TB) tábua de buracos no DPN26, (LEC) tempo de exploração do braço aberto e Est LEC número de esticadas labirinto em cruz elevado no DPN28, (CA) distância percorrida (cm) no campo aberto no DPN34.
 *. Valor de p referente ao teste t, e valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

Tabela 9 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao crescimento dos filhotes na infância e adolescência, de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.

Curva de crescimento								
DPN	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de p	d	Número	
1	7,18	0,15	6,79	0,16	NS	0.4447	0.70	n=11-14
5	13,13	0,3	12,78	0,34	NS	0.9725	0.30	n=11-14
13	28,13	0,66	26,28	0,71	NS	0.3581	0.75	n=11-14
21	49,59	0,97	47,5	1,05	NS	0.6446	0.58	n=11-14
26	75,18	1,41	71,53	1,32	NS	0.3637	0.76	n=11-14
34	125,45	1,77	122,64	2,24	NS	0.9141	0.39	n=11-14

Fonte: do autor.

Nota: Curva de crescimento dos filhotes machos avaliadas nos DPN1, 5, 13, 21, 26 e 34 Valor de p referente ao teste t, e valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

Tabela 10 - Análise através da ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao crescimento dos filhotes na infância e adolescência, de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.

Curva de crescimento	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado		
	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	Número	
Interação	F (5, 115) = 1,092	NS	0.3687	0,00001	n=11-14
Tempo	F (1,769, 40,69) = 4973	****	<0.0001	0,97	n=11-14
Tratamento	F (1, 23) = 2,499	NS	0.1276	0,0004	n=11-14

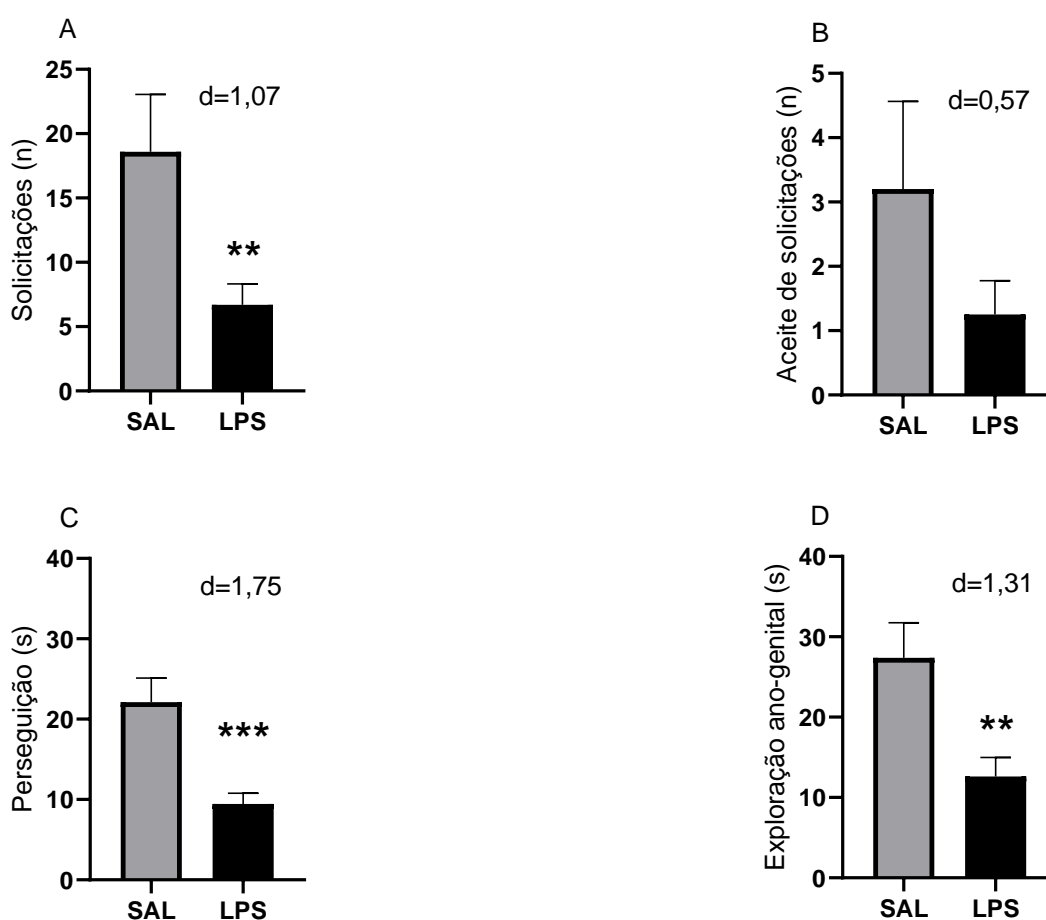
Fonte: do autor.

Nota: Curva de crescimento dos filhotes. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste Ômega-quadrado sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "Ômega-quadrado".

Conforme demonstrado no gráfico 9 os filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS durante a gestação tiveram menor interesse em interagir com outros filhotes de mesmo tratamento durante o teste de comportamento de brincar.

Esta falta de interesse ficou evidenciada pela redução no comportamento de “solicitar” as brincadeiras $p < 0.01$; $d = 1.07$, “perseguir” $p < 0.001$; $d = 1.75$ e “explorar” o oponente $p < 0.01$; $d = 1.31$, quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença entre os “aceites” das brincadeiras durante o teste entre os grupos ($n = 10-16$).

Gráfico 9 - Resultados quanto ao comportamento de brincar dos filhotes machos de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Parâmetros observados durante o teste de comportamento de brincar no DPN33 dos filhotes machos de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16. ($n = 10-16$) quanto ao: A) número de vezes que o filhote “solicitou as brincadeiras”, B) número de vezes que o filhote “aceitou as brincadeiras”, C) tempo (s) que o filhote “perseguiu” o oponente e D) tempo (s) que o filhote “explorou” o oponente. Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Quando comparados ao grupo controle. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

Tabela 11 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto aos parâmetros no comportamento de brincar dos filhotes durante a adolescência, de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG

	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de p	d	Número	
Solic	18,6	4,458	6,688	1,632	**	0.0072	1.07	n=10-16
AS	3,2	1,365	1,25	0,5284	NS	0.1349	0.57	n=10-16
Pers	22,11	3,008	9,434	1,355	***	0.0002	1.75	n=10-16
Expl	27,37	4,367	12,62	2,366	**	0.0035	1.31	n=10-16

Fonte: do autor.

Nota: (Solic) número de vezes que o filhote “solicitou as brincadeiras”, (AS) número de vezes que o filhote “aceitou as solicitações de brincadeiras”, (Pers) tempo (s) que o filhote “perseguiu” o oponente e (Expl) tempo (s) que o filhote “explorou” o oponente. Valor de p referente ao teste t, e valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

6.3 RESULTADOS QUANTO O COMPORTAMENTO DOS FILHOTES DURANTE A VIDA ADULTA, DE RATAS QUE RECEBERAM TRATAMENTO COM LPS OU SAL NO DG16.

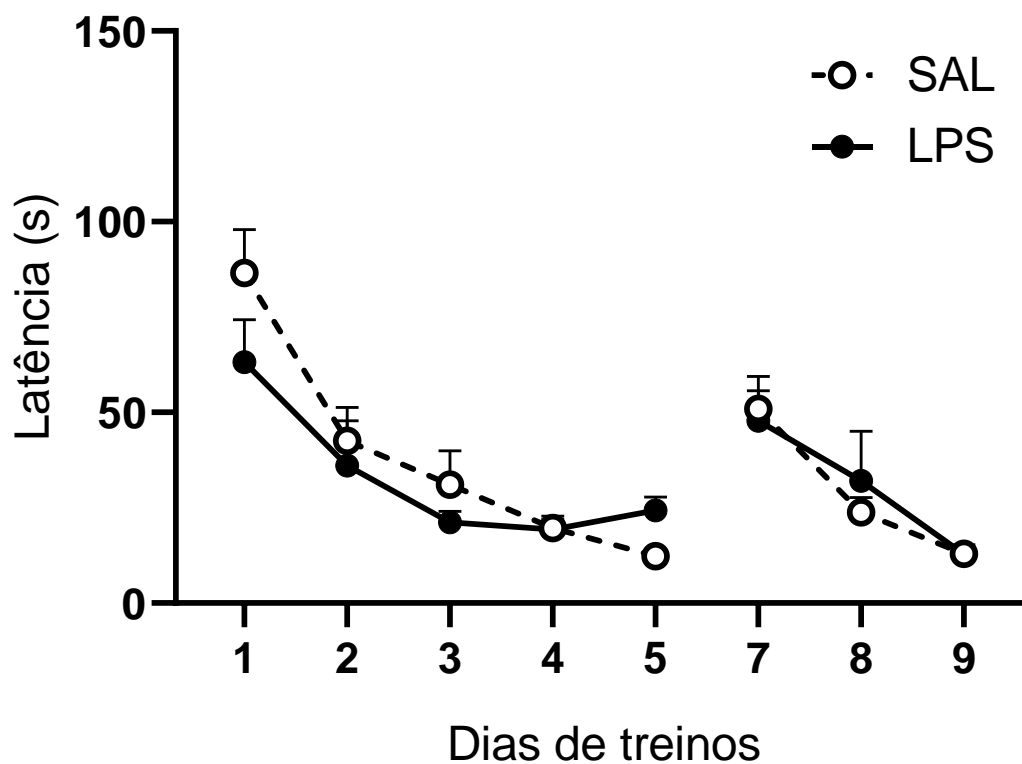
6.3.1 Resultados quanto a memória espacial verificada pelo teste de Barnes.

6.3.1.1 Resultado quanto a aquisição e reversão do aprendizado durante os treinos.

O gráfico 10 mostra a evolução da aquisição de memória nos 5 primeiros dias treinos (dias 1 – 5), e nos 3 dias posteriores do teste de aquisição da memória (dias 7 – 9) a reversão da memória de aprendizado. A evolução do aprendizado é evidenciada pela redução da latência para entrada no buraco onde está a caixa destino.

Podemos observar que o LPS aplicado nas mães durante a gestação não foi capaz de alterar o comportamento do filhote quanto ao aprendizado espacial, demonstrando que, ambos os grupos aprenderam de forma semelhante onde estava a caixa destino, não havendo assim diferença significativa entre os grupos durante a aquisição da memória e da reversão da memória (n=9-8).

Gráfico 10 - Resultados quanto a aprendizado durante os treinos no teste de Barnes de filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Curva de aprendizado para entrada no buraco com a caixa destino dos filhotes machos durante a vida adulta, filhotes de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16 (n=6-7). O gráfico mostra a latência para entrada no buraco com a caixa destino durante os dias de treino de aprendizado (dias 1, 2, 3, 4 e 5) e reversão do aprendizado (dias 7, 8 e 9). Dados expressos em média \pm EPM.

Tabela 12 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao resultado de aquisição e reversão do aprendizado durante os treinos.

Dias	SAL		LPS		ANOVA de duas vias		<i>d</i> de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de p	d	Número	
1	86,61	11,29	63,21	11,12	NS	0.1753	0.74	n=9-8
2	42,61	8,7	36	11,76	NS	0.9819	0.23	n=9-8
3	31	8,93	21,14	2,9	NS	0.905	0.50	n=9-8
4	19,66	3,1	19,35	2,62	NS	>0.9999	0.04	n=9-8
5	12,33	2,36	24,28	3,57	NS	0.8108	1.43	n=9-8
7	50,88	8,59	47,78	7,92	NS	0.9913	0.13	n=9-8
8	23,83	3,85	32	13,05	NS	0.9189	0.32	n=9-8
9	12,88	2,43	12,78	1,4	NS	>0.9999	0.02	n=9-8

Fonte: do autor.

Nota: Dados da curva de aprendizado dos filhotes machos avaliadas nos 1, 2, 3, 4 e 5 e regressão do aprendizado nos dias 7, 8 e 9 durante o teste de labirinto de Barnes. Valor de p referente ao teste t, e valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

Tabela 13 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao resultado de aquisição e reversão do aprendizado durante os treinos.

Treinos de Barnes					
Dias 1-5		ANOVA de duas vias Ômega-quadrado			
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2	Número
Interação	F (4, 70) = 1,375	NS	0.2514	0.009	n=9-8
Tempo	F (4, 70) = 18,08	****	<0.0001	0.43	n=9-8
Tratamento	F (1, 70) = 1,304	NS	0.2573	0.001	n=9-8
Dias 7-9					
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2	Número
Interação	F (2, 42) = 0,3376	NS	0.7154	0.01	n=9-8
Tempo	F (2, 42) = 13,33	****	<0.0001	34	n=9-8
Tratamento	F (1, 42) = 0,08127	NS	0.777	0.01	n=9-8

Fonte: do autor.

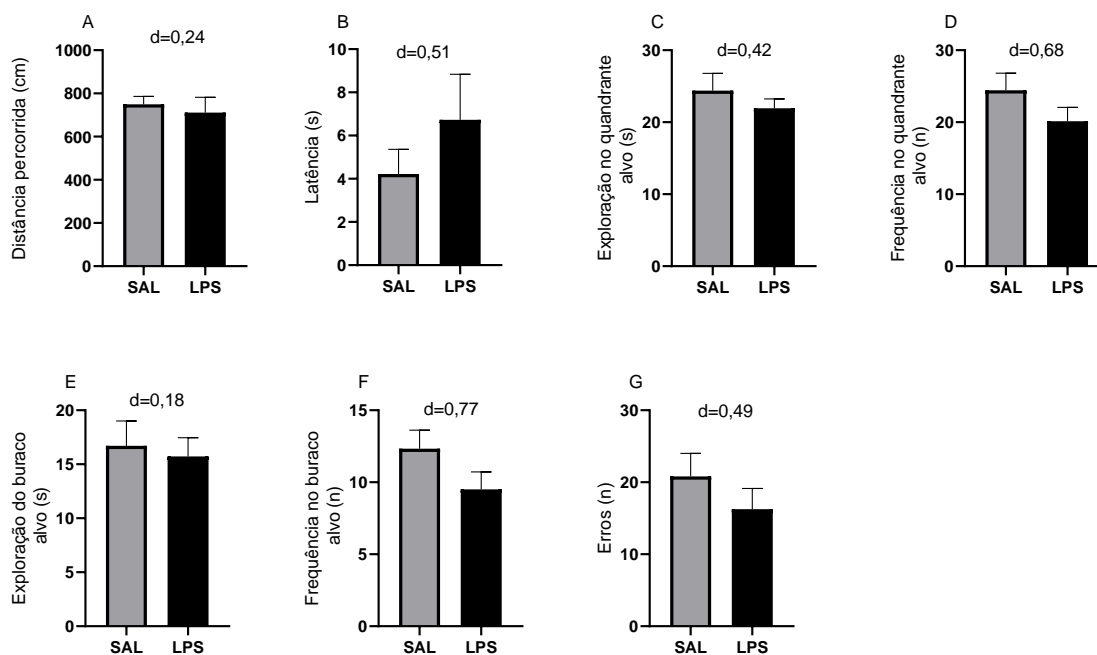
Nota: Dados da curva de aprendizado dos filhotes machos avaliadas nos 1, 2, 3, 4 e 5 e regressão do aprendizado nos dias 7, 8 e 9 durante o teste de labirinto de Barnes. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

6.3.1.2 Resultados quanto ao aprendizado da localização da caixa destino.

O gráfico 11 apresenta os parâmetros observados no 6º dia durante o teste de aprendizado quanto a localização da caixa.

Observamos que não houve prejuízo quanto a memória espacial de aprendizado dos filhotes de ratas que receberam LPS, a distância percorrida no aparato, latência para chegada ao buraco alvo, o tempo de exploração do quadrante onde está localizado o buraco alvo, a frequência de exploração dos buracos deste quadrante, o tempo de exploração do buraco alvo, a frequência de exploração deste buraco e o número de vezes que exploram os buracos errados no dia do teste foi similar para ambos os grupos durante o 1 min e 30 seg de teste, LPS e controle (n=9-8).

Gráfico 11 - Resultados dos parâmetros avaliados no teste de aprendizado no dia 6 no teste de Barnes pelos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Parâmetros avaliados no dia do teste de aprendizado (dia 6) no teste de Barnes dos filhotes machos durante a vida adulta filhotes de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16 (n=6-7) quanto a: A) distância percorrida (cm), B) latência para exploração do buraco alvo, C) exploração (s) no quadrante alvo, D) frequência de exploração dos buracos no quadrante alvo, E) exploração (s) do buraco alvo, F) frequência de exploração do buraco alvo, e G) número de vezes que frequentou o os buracos errados. Dados expressos em média ± EPM. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

Tabela 14 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto aos resultados do aprendizado da localização da caixa destino.

	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de P	d	Número	
Dist	789,4	18,18	785,7	70,11	NS	0.9568	0.24	n=9-8
Lat	4,286	1,522	5,5	2,21	NS	0.652	0.51	n=9-8
CQA	22,91	2,066	21,37	1,655	NS	0.5798	0.42	n=9-8
FQA	26,29	3,74	20,5	2,419	NS	0.2377	0.68	n=9-8
CBA	15,06	1,644	15,37	2,329	NS	0.9136	0.18	n=9-8
FBA	13	1,915	9,333	1,308	NS	0.1554	0.77	n=9-8
Erros	24,71	3,537	18,67	3,293	NS	0.2422	0.49	n=9-8

Fonte: do autor.

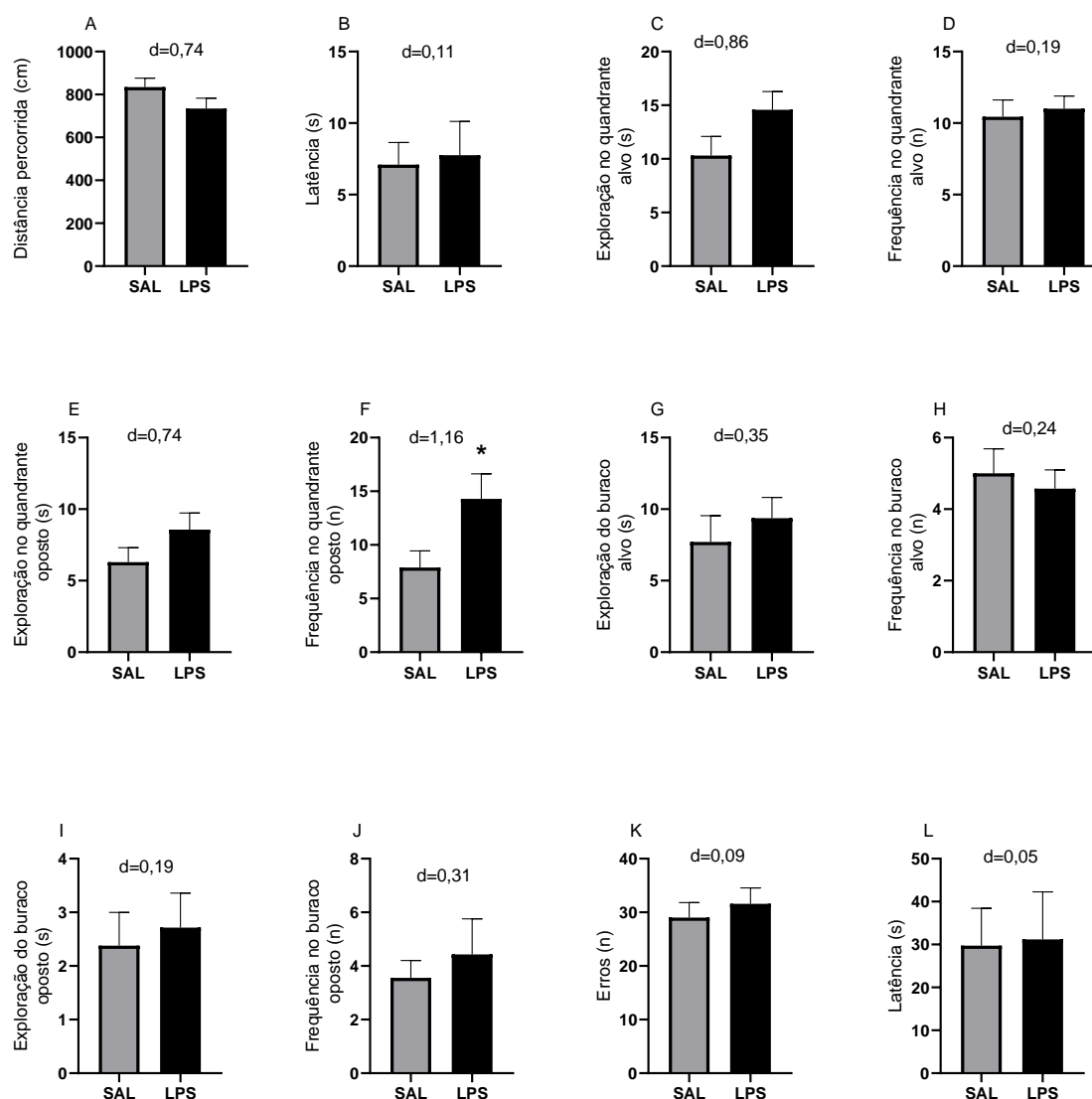
Nota: (Dist) distância percorrida (cm), (Lat) latência para exploração do buraco alvo, (EQA) exploração (s) no quadrante alvo, (FQA) frequência de exploração dos buracos no quadrante alvo, (EBA) exploração (s) do buraco alvo, (FBA) frequência de exploração do buraco alvo, e (Erros) número de vezes que frequentou o os buracos errados. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

6.3.1.3 Resultados quanto a reversão do aprendizado da localização da caixa destino

O gráfico 12 apresenta os parâmetros observados no 10º dia durante o teste de reversão do aprendizado quanto a localização da caixa.

Observamos que quanto a memória espacial de reversão do aprendizado dos filhotes de ratas que receberam LPS, estes de exploraram mais o quadrante onde a caixa destino se encontrava anteriormente, constatamos que estes filhotes de ratas que receberam LPS de explorem com mais frequência o quadrante oposto $p < 0.05$; $d = 1.16$, em comparação ao grupo controle. Porém quanto a distância percorrida no aparato, latência para chegada ao buraco alvo, o tempo de exploração do quadrante onde está localizado o buraco alvo, a frequência de exploração dos buracos deste quadrante, o tempo de exploração do buraco alvo, a frequência de exploração deste buraco e o número de vezes que exploram os buracos errados no dia do teste foi similar para ambos os grupos durante o 1 min e 30 seg de teste, LPS e controle (n=9-8).

Gráfico 12 - Resultados dos parâmetros avaliados no teste de reversão do aprendizado no dia 10 no teste de Barnes pelos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Parâmetros avaliados no dia do teste de reversão do aprendizado (dia 10) no teste de Barnes dos filhotes machos de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16 (n=6-7) quanto a: A) distância percorrida (cm), B) latência para exploração do buraco alvo, C) exploração (s) no quadrante alvo, D) frequência de exploração dos buracos no quadrante alvo, E) exploração (s) do quadrante oposto, F) frequência de exploração do buraco oposto, G) exploração (s) do buraco alvo, H) frequência de exploração do buraco oposto, I) exploração (s) do buraco oposto, J) frequência de exploração do buraco oposto, e G) número de vezes que frequentou os buracos errados. Dados expressos em média \pm EPM. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

Tabela 15 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto aos resultados da reversão do aprendizado da localização da caixa destino.

	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de P	d	Número	
Dist	834,2	133,1	734,9	136,4	NS	0.1393	0.74	n=9-8
Lat	7,1	4,885	7,75	6,714	NS	0.8149	0.11	n=9-8
CQA	10,31	5,342	14,57	4,525	NS	0.1136	0.86	n=9-8
FQA	10,44	3,539	11	2,38	NS	0.7271	0.19	n=9-8
CQO	6,289	3,069	8,571	3,08	NS	0.1628	0.74	n=9-8
FQO	7,889	4,676	14,29	6,211	*	0.0336	1.16	n=9-8
CBA	7,711	5,48	9,371	3,834	NS	0.5075	0.35	n=9-8
FBA	5	2,062	4,571	1,397	NS	0.6452	0.24	n=9-8
CBO	2,37	1,859	2,71	1,704	NS	0.7153	0.19	n=9-8
FBO	3,556	1,944	4,429	3,505	NS	0.5352	0.31	n=9-8
Erros	28,7	8,001	29,5	9,366	NS	0.8474	0.09	n=9-8
LatBO	29,71	8,747	31,17	11,12	NS	0.918	0.05	n=9-8

Fonte: do autor.

Nota: (Dist) distância percorrida (cm), (Lat) latência para exploração do buraco alvo, (EQA) exploração (s) no quadrante alvo, (FQA) frequência de exploração dos buracos no quadrante alvo, (EQO) exploração (s) do quadrante oposto, (FQO) frequência de exploração do buraco oposto, (EBA) exploração (s) do buraco alvo, (FBA) frequência de exploração do buraco alvo, (EBO) exploração (s) do buraco oposto, (FBO) frequência de exploração do buraco oposto, (Erros) número de vezes que frequentou o os buracos errados e (LatBO) sendo a latência para encontrar o buraco oposto. Valor de p referente ao teste t e valores de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

6.3.2 Resultados quanto ao teste de CA durante 20 min para verificação do comportamento tipo-ansioso.

No gráfico 13 apresentado podemos observar que o LPS aplicado nas mães durante a gestação causou prejuízos aos filhotes durante a vida adulta quanto a mobilidade e ansiedade.

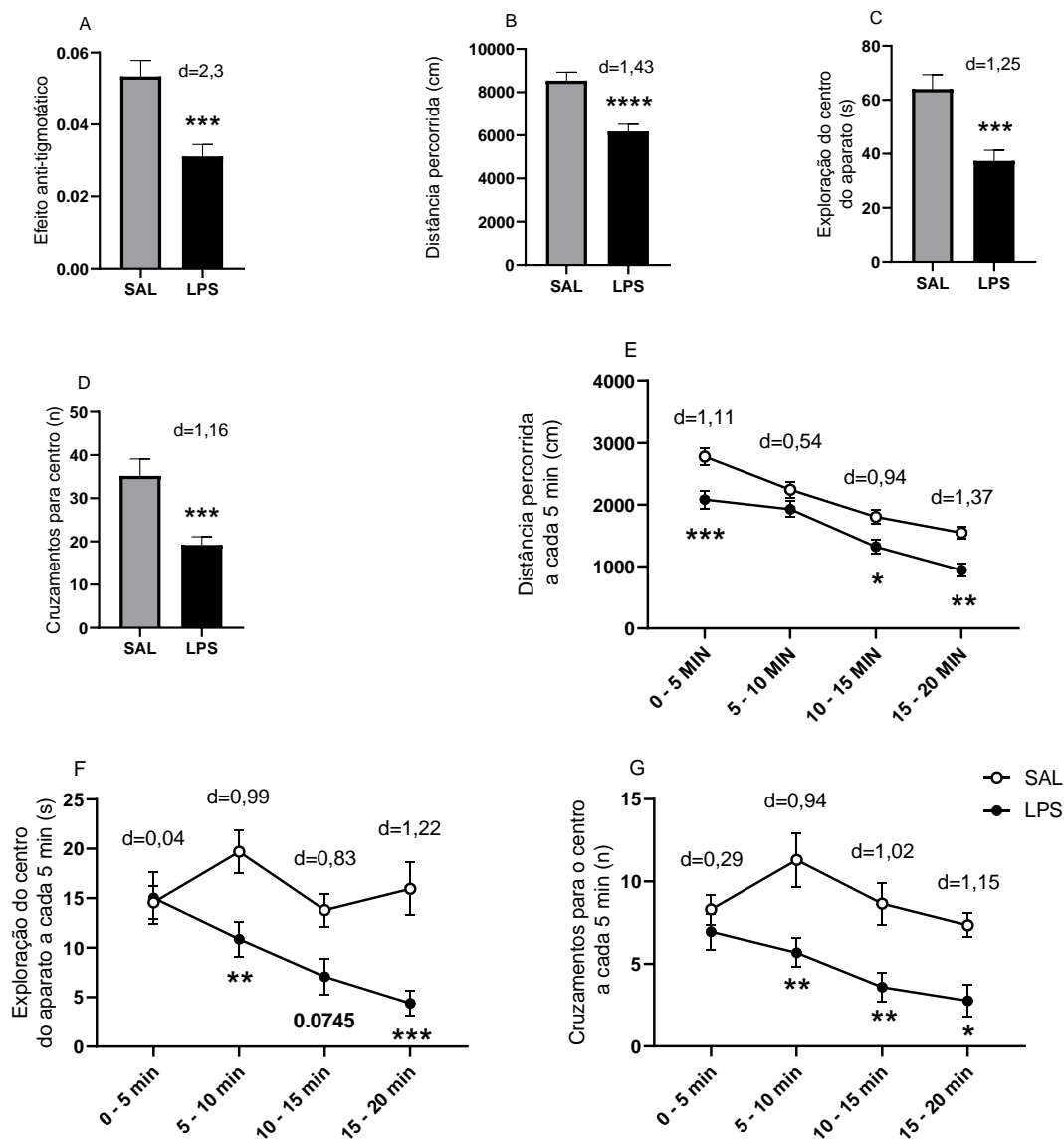
Observamos que houve uma menor exploração do aparato como demonstrado pela diminuição da distância total percorrida (cm) no aparato durante 20 min $p < 0.0001$; $d = 2.3$, e da menor distância percorrida (cm) de 5 em 5 min durante os tempos de 0-5 min $p < 0.001$; $d = 1.11$, 10-15 min $p < 0.05$; $d = 0.94$ e 15-20 min $p < 0.01$; $d = 1.37$. Estes

animais exploram por menos tempo (s) $p < 0.001$; $d = 1.25$ o centro do aparato e tiveram um menor número de cruzamentos para centro do aparato $p < 0.001$; $d = 1.16$ durante 20 min. Da mesma maneira, os animais exploram por menos tempo (s) o centro do aparato a cada 5 min durante os tempos 5-10 min $p < 0.05$; $d = 0.99$, tenderam a explorar por menos tempo (s) 10-15 min $p < 0.0722$; $d = 0.83$ e 15-20 min $p < 0.001$; $d = 1.22$ e tiveram um menor número de cruzamentos para o centro do aparato durante os tempos de 5-10 min $p < 0.01$; $d = 0.94$, 10-15 min $p < 0.01$; $d = 1.02$ e 15-20 min $p < 0.05$; $d = 1.15$ quando comparados ao grupo controle ($n = 20-22$).

Da mesma maneira, os filhotes adultos de ratas que receberam LPS, tiveram mais comportamento tipo-ansioso conforme mostrado pelo efeito anti-tigmotático $p < 0.001$; $d = 2.3$, quando comparado ao grupo controle. A tigmotaxia é definida como a tendência dos roedores de manterem o contato com as paredes do aparato. O efeito anti-tigmotático é dado por uma razão, onde divide-se o tempo que o animal permaneceu no centro do aparato (TC), pelo tempo que o animal permaneceu no centro (TC), mais o tempo que o animal permaneceu na periferia (TP).

$TC / (TC + TP) =$ Efeito anti-tigmotático.

Gráfico 13 - Resultados dos parâmetros avaliados durante o teste de campo aberto de 20 min pelos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto aos parâmetros avaliados no dia do teste CA durante 20 min dos filhotes machos adultos de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16 (n=20-22) quanto ao: A) efeito anti-tigmotático, B) distância percorrida (cm), C) tempo de exploração no centro do aparato e D) número de cruzamentos para o centro do aparato, parâmetros avaliados no dia do teste CA a cada 5 min e durante 20 min E) distância percorrida (cm), F) tempo de exploração no centro do aparato e G) número de cruzamentos para o centro do aparato. Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Quando comparados ao grupo controle. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

Tabela 16 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto aos resultados do teste de CA durante 20 min para verificação do comportamento tipo-ansioso.

	SAL		LPS		teste t	d de Cohen		Número
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de p	d		
EAT	0,05336	0,004455	0,03113	0,003278	***	0.0002	2.3	n=20-22
Dist	8542	387,8	6182	334	****	<0.0001	1.43	n=20-22
EC	64,03	5,346	37,35	3,934	***	0.0002	1.25	n=20-22
FCC	35,2	3,891	19,18	1,913	***	0.0005	1.16	n=20-22

Fonte: do autor.

Nota: (EAT) efeito anti-tigotático, (Dist) distância percorrida (cm), (EC) tempo de exploração no centro do aparato e (FCC) frequência de cruzamentos para o centro do aparato. Valor de p referente ao teste t e valores de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

Tabela 17 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado valores quanto ao resultado do teste de CA a cada 5 min para verificação do comportamento tipo-ansioso.

Distância percorrida a cada 5 min								
Minutos	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de P	d	Número	
0-5	2782,018	129,17	2085,1	143,12	***	0.0002	1.11	n=20-22
5-15	2244,09	126,31	1928,52	129,38	NS	0.2321	0.54	n=20-22
10-15	1804,28	114,25	1322,54	109,62	*	0.0197	0.94	n=20-22
15-20	1547,37	92,01	941,42	99,9	**	0.0018	1.37	n=20-22

Tempo de exploração no centro a cada 5 min								
Minutos	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de P	d	Número	
0-5	14,58	1,64	15,02	2,65	NS	0.9998	0.04	n=20-22
5-15	19,69	2,12	10,86	1,74	**	0.009	0.99	n=20-22
10-15	13,794	1,68	7,07	1,84	NS	0.0745	0.83	n=20-22
15-20	15,942	2,66	4,39	1,27	***	0.0003	1.22	n=20-22

Cruzamentos para o centro a cada 5 min								
Minutos	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de P	d	Número	
0-5	8,3	0,9	6,95	1,1	NS	0.8492	0.29	n=20-22
5-15	11,3	1,64	5,68	0,88	**	0.0012	0.94	n=20-22
10-15	8,65	1,28	3,59	0,85	**	0.0043	1.02	n=20-22
15-20	7,35	0,73	2,77	0,97	*	0.0119	1.15	n=20-22

Fonte: do autor.

Nota: Valores parâmetros avaliados no dia do teste CA durante 20 min dos filhotes machos adultos de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16 (n=20-22) quanto a distância percorrida (cm) a cada 5 min, tempo de exploração no centro do aparato a cada 5 min e número de cruzamentos para o centro do aparato a cada 5 min. Valor de p referente ao teste t e valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

6.2.3 Resultados quanto ao teste de reconhecimento de objetos de 2h e 24h para verificação da memória de curto e longo prazo.

No gráfico 14 podemos observar que o LPS aplicado nas mães durante a gestação não reduziu a exploração do objeto novo demonstrado pelo índice de reconhecimento de objetos depois de 2h, isto é evidenciado no aumento da exploração do objeto familiar durante 2h. Da mesma maneira, durante o teste de 24h não houve diferença entre os grupos LPs e controle.

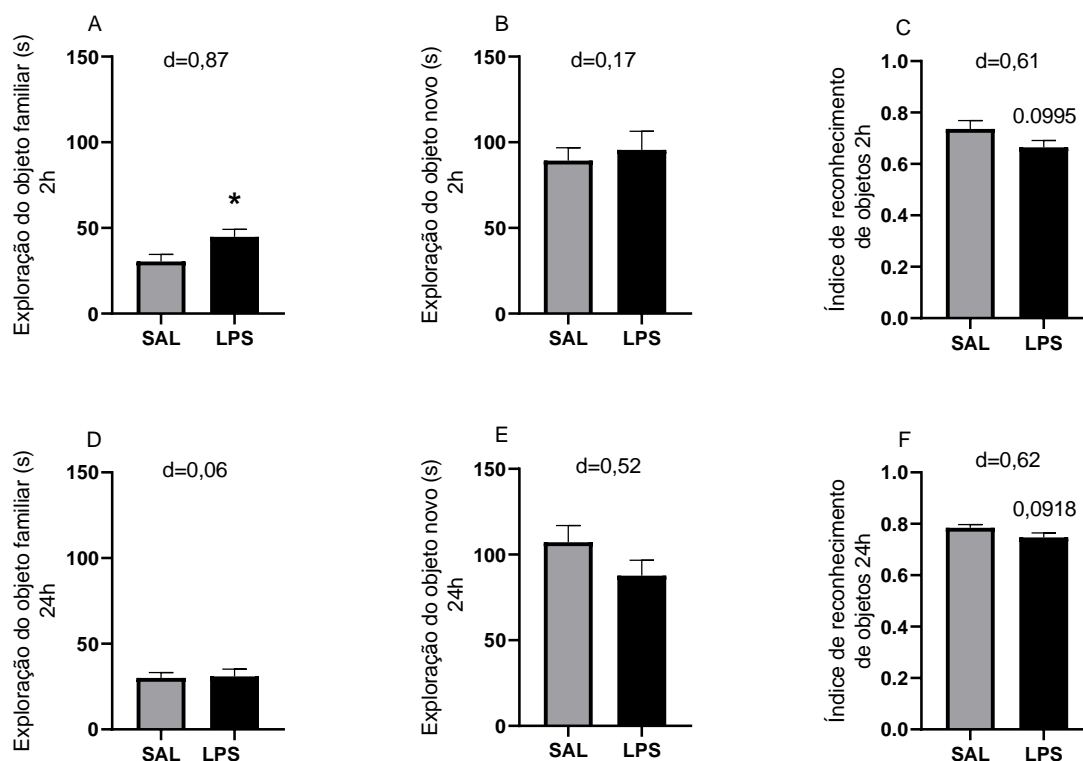
Desta forma, o LPS aplicado durante prenhez não causou certo prejuízo na memória de discriminação de objetos durante a vida adulta.

No gráfico 14 podemos observar que os filhotes adultos de ratas que receberam LPS exploraram mais o familiar durante 10 min durante o teste no tempo de 2h após a apresentação dos objetos $p < 0.05$; $d = 0,87$, já com relação ao índice de reconhecimento de 2h, não houve diferença quanto a exploração do objeto novo sobre o familiar quando comparado ao grupo controle. Da mesma forma, não houve a entre os grupos após 24h de apresentação dos objetos ($n = 16-15$).

O índice de reconhecimento de objetos é uma razão dada divisão do tempo que o animal explorou o objeto novo (TN) pelo tempo que o animal explorou o objeto novo (TN), mais o tempo que o animal explorou o objeto familiar (TF). Este índice revela se o quanto animal teve preferência por explorar o objeto novo.

$$TN / (TF + TN) = \text{Índice de reconhecimento de objetos.}$$

Gráfico 14 - Resultados obtidos durante o teste de reconhecimento de objetos dos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto aos parâmetros avaliados nos dias dos testes reconhecimento de objetos de 2 e 24h dos filhotes adultos machos de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16 (n=9-9 animais por grupo) quanto ao: A) exploração (s) do objeto familiar de 2h, B) exploração (s) do objeto novo de 2h, C) índice de reconhecimento dos objetos de 2h, D) exploração (s) do objeto familiar de 24h, E) exploração do objeto novo de 24h e F) índice de reconhecimento dos objetos de 24h. Dados expressos em média ± EPM. Os símbolos representam significância *p<0.05. Quando comparados ao grupo controle. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

Tabela 18 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto aos resultados do teste de reconhecimento de objetos de 2h e 24h para verificação da memória de curto e longo prazo.

	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de p	d	Número	
EOF 2h	30,44	4,096	44,8	4,339	*	0.0226	0.87	n=16-15
EON 2h	89,31	7,512	95,53	10,88	NS	0.6379	0.17	n=16-15
IR 2h	0,7365	0,03213	0,6648	0,02684	NS	0.0995	0.61	n=16-15
EOF 24h	30	3,225	30,93	4,25	NS	0.8612	0.06	n=16-15
EON 24h	107,1	9,796	87,67	9,043	NS	0.1567	0.52	n=16-15
IR 24h	0,7846	0,01254	0,7468	0,01795	NS	0.0918	0.62	n=16-15

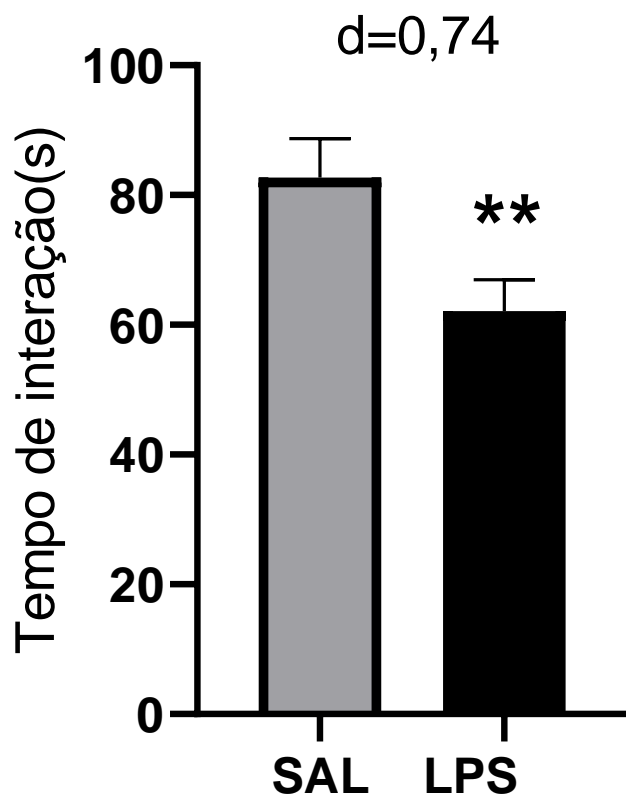
Fonte: do autor.

Nota: (EOF 2h) exploração (s) do objeto familiar de 2h, (EON 2h) exploração (s) do objeto novo de 2h, (IR 2h) índice de reconhecimento dos objetos de 2h, (EOF 24h) exploração (s) do objeto familiar de 24h, (EON 24h) exploração do objeto novo de 24h e (IR 24h) índice de reconhecimento dos objetos de 24h. Valor de p referente ao teste t e valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

6.3.4 Resultados quanto ao teste de interação social

Como apresentado no gráfico 15 os filhotes adultos de ratas que receberam LPS durante a gestação interessaram-se menos em interagir com o oponente durante o teste de interação social. Estes filhotes interagiram por menor tempo com animais de mesmo tratamento durante os 10 min durante o teste de interação social $p < 0.01$; $d = 0.74$ quando comparados ao grupo controle ($n = 25-28$).

Gráfico 15 - Resultados quanto a interação social dos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultado quanto o tempo (s) de interação social entre os filhotes adultos machos de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16 ($n=28-25$ animais por grupo). Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância $**p<0.01$. Quando comparados ao grupo controle. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

Tabela 19 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto aos resultados do teste de interação social.

	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de p		d	Número
IS	82,7	5,978	62,13	4,852	**	0.0095	0.74	n=25-28

Fonte: do autor.

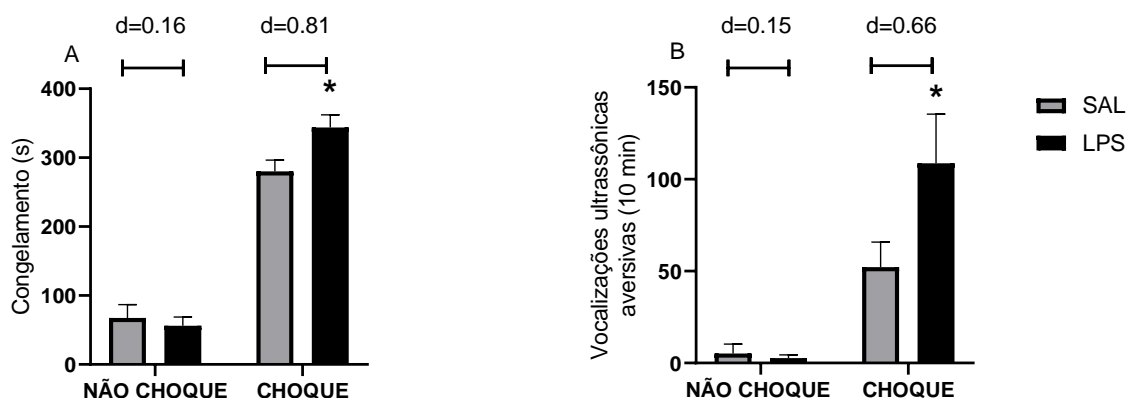
Nota: Tempo (s) de interação social (IS) entre os filhotes adultos machos de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16. Valor de p referente ao teste t e valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

6.3.5 Resultados quanto ao teste de medo condicionado ao contexto.

Como mostrado no gráfico14 os filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS durante a gestação e receberam choques nas patas, responderam com maior intensidade aos estímulos quando apresentados a caixa de choque 24h depois de serem submetidos aos choques nas patas.

Os filhotes adultos de ratas que receberam tratamento com LPS e receberam choque nas patas ficaram mais tempo em congelamento $p < 0.05$ e emitiram mais vocalizações ultrassônicas $p < 0.01$, durante os 10 min de teste quando em comparação ao grupo controle. No entanto, não houve diferença entre os grupos que não receberam choque nas patas quando comparados ao controle (n=10-22).

Gráfico 16 - Resultados quanto ao medo condicionado ao contexto dos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto os parâmetros do teste de medo condicionado ao contexto dos filhotes machos adultos de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16 quanto ao: A) tempo de congelamento (s) dos animais que receberam ou não choque nas patas (n=19-22 por grupo), e B) número de vocalizações ultrassônicas aversivas (10 min) dos animais que receberam ou não choque nas patas (n=21-15 por grupo) durante o teste medo condicionado ao contexto. Dados em média \pm EPM. Os símbolos representam significância * $p < 0.05$., Quando comparados ao grupo controle.

Tabela 20 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao resultado do teste de medo condicionado ao contexto.

	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de p	D	Número	
Congel								
N Ch	67,52	83,56	56,05	57,52	NS	0.618	0.16	n=19-20
Ch	280,22	76,78	343,78	80,07	*	0.0131	0.81	n=22-19
VUs								
N Ch	5,157	22,48	2,62	7,4	NS	0.669	0.15	n=19-16
Ch	52,23	62,3	108,66	103,7	**	0.049	0.66	n=14-10

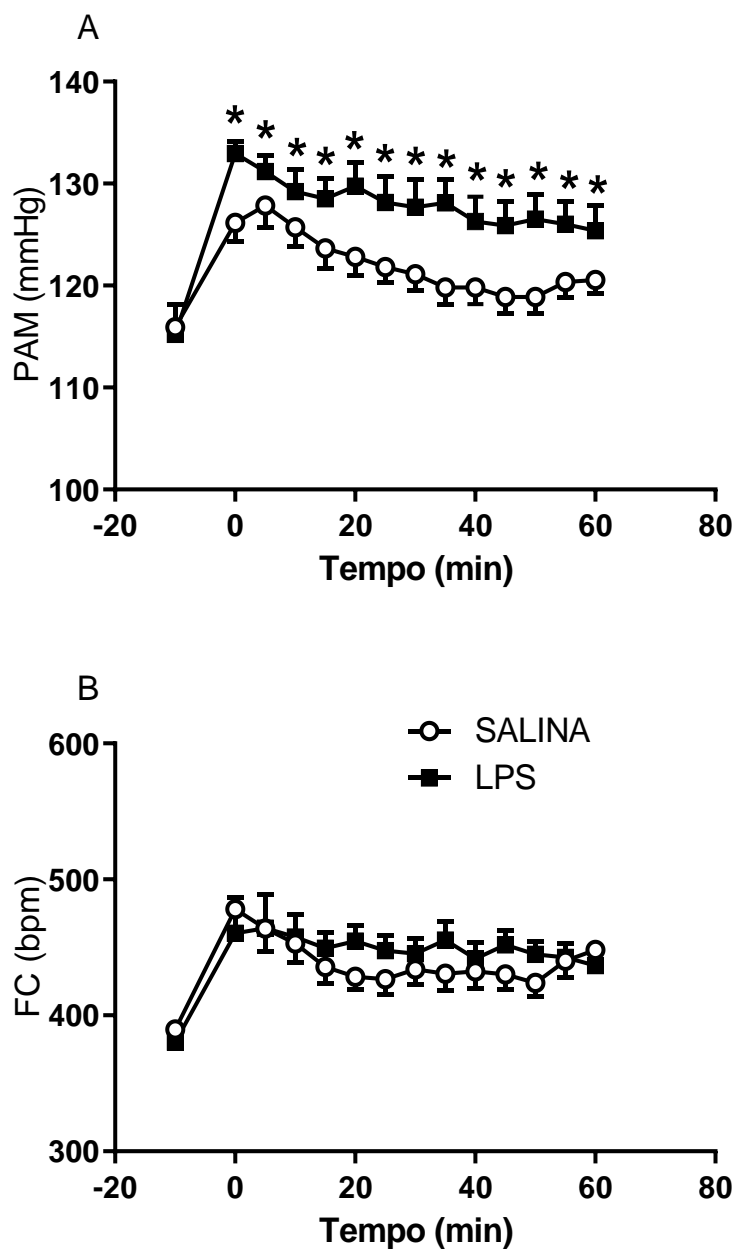
Fonte: do autor.

Nota: Tempo (s) de congelamento (Cong) e de vocalização ultrassônica aversiva (Vus av) entre os filhotes adultos que receberam ou não choque nas patas, filhotes machos de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16. Valor de p referente ao teste t e valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

6.3.6 Resultados quanto a resposta cardiovascular durante o teste de estresse por contenção

Conforme mostrado no gráfico 17, os filhotes adultos de ratas que receberam LPS ratas durante a gestação tiveram uma resposta cardiovascular mais exacerbada durante o teste de estresse por contenção. Observamos que os animais LPS tem média pressórica igual ao grupo controle durante o tempo basal e elevam mais esta média pressórica durante o teste de contenção a quando comparados aos animais controle. Esta resposta exacerbada ao estresse causada pela contenção durante os 60 min de teste é evidenciada pela elevação da pressão arterial média (PAM) em milímetros de mercúrio (mmHg) $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle (n=8-10). Em contra partida, não observamos a mesma diferença na elevação da frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm) entre os grupos estudados.

Gráfico 17 - Resultados quanto a PAM e FC dos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto a resposta cardiovascular dos filhotes machos adultos de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16 (n=10-8) durante o teste de estresse por contenção. A) PAM basal (20 min) e durante o teste de estresse por contenção (60 min), e B) FC (bpm) basal (20 min) e durante o teste de estresse por contenção (60 min). Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância * $p < 0.05$. Quando comparados ao grupo controle.

Tabela 21 - Análise através do Anova de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto a resposta cardiovascular durante o teste de estresse por contenção.

PAM		ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
Variação	F (DFn, DFd)		Valor de p	ω^2	Número
Interação	F (13, 208) = 2,059	*	0.0179	0.01	n=8-10
Tempo	F (13, 208) = 18,99	****	<0.0001	0.19	n=8-10
Tratamento	F (1, 16) = 4,694	*	0.0457	0.13	n=8-10

FC (bpm)					
Variação	F (DFn, DFd)		Valor de p	ω^2	Número
Interação	F (13, 208) = 0,821	NS	0.6374	0.005	n=8-10
Tempo	F (13, 208) = 5,943	****	<0.0001	0.14	n=8-10
Tratamento	F (1, 16) = 0,4561	NS	0.5091	0.006	n=8-10

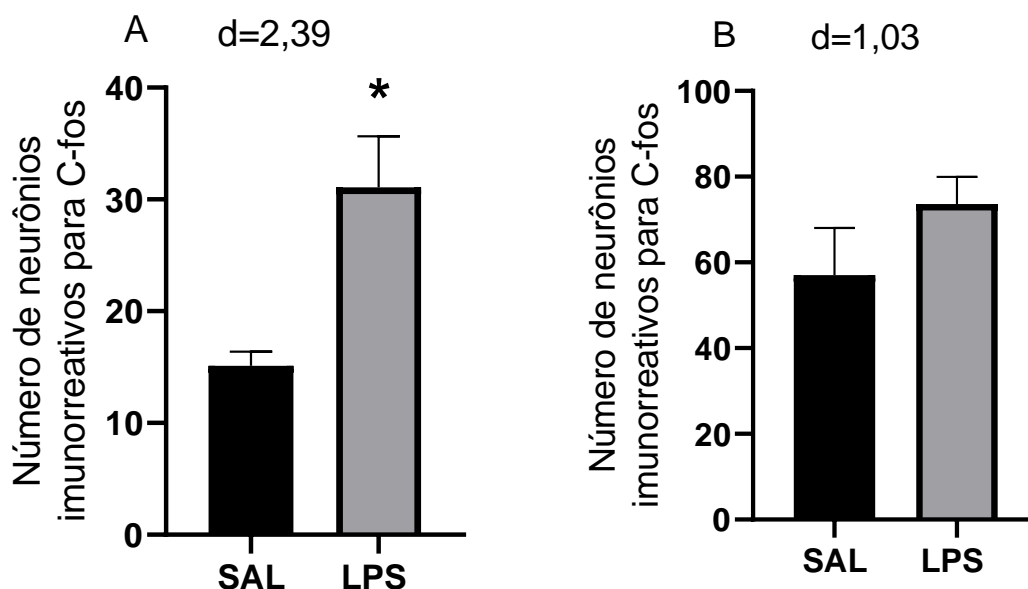
Fonte: do autor.

Nota: Dados da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos filhotes machos avaliados durante o teste de estresse por contenção. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

6.3.7 Resultados quanto ao número de neurônios imunorreativos para C-fos das áreas do Locus Coeruleus e Núcleo do Trato Solitário pós análise da resposta cardiovascular.

Observamos que a área do LC foi mais ativada durante o teste de estresse por contenção nos filhotes adultos de ratas que receberam LPS durante a gestação em comparação ao grupo controle, evidenciado pelo maior número de neurônios imunorreativos para C-fos, onde $p < 0.05$; $d = 2.39$. O mesmo não foi observado na área do NTS, não havendo diferença significativa na imunorreativação para C-fos pós o teste de estresse por contenção nos animais filhotes de ratas que receberam LPS durante a gestação em comparação ao grupo controle.

Gráfico 18 - Núcleos contados em 3 cortes distintos da dentro da mesma área e no mesmo encéfalo.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto a ativação neural através da imunorreatividade para C-fos nas áreas A) LC e B) NTS, durante a teste de contenção dos filhotes machos adultos de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16. Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância * $p < 0.05$. Quando comparados ao grupo controle. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

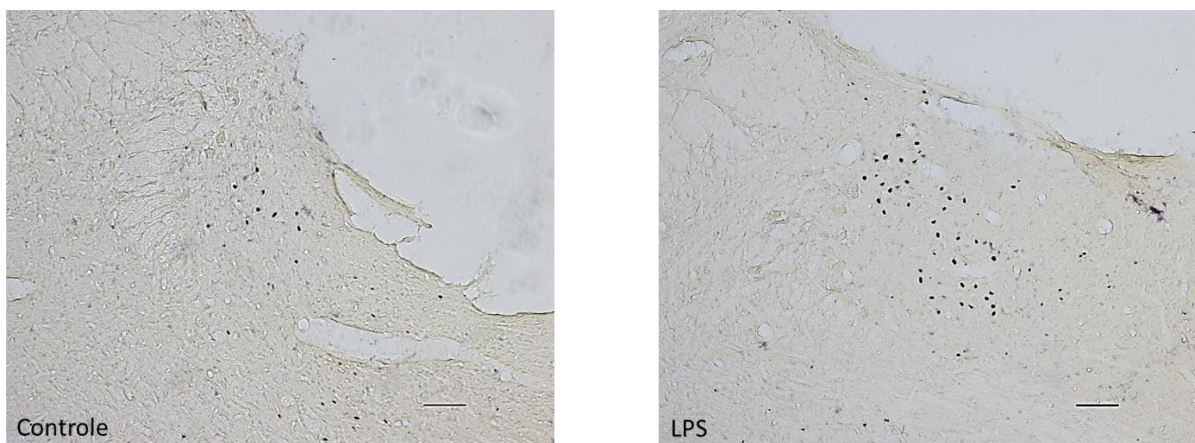
Tabela 22 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen dos neurônios imunorreativos para C-fos pós teste de estresse por contenção dos filhotes adultos de ratas LPS ou SAL.

	SAL		LPS		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de p	d	Número	
LC	15,11	1,283	31,08	4,587	*	0.0343	2.39	n=3-4
NTS	57,05	11,03	73,66	6,314	NS	0.2207	1.03	n=3-4

Fonte: do autor.

Nota: Número de neurônios imunorreativos para C-fos contados em 3 cortes diferentes do mesmo encéfalo nas áreas locus coeruleus (LC) e núcleo do trato solitário (NTS) após o teste de estresse por contenção. Valor de p referente ao teste t e valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

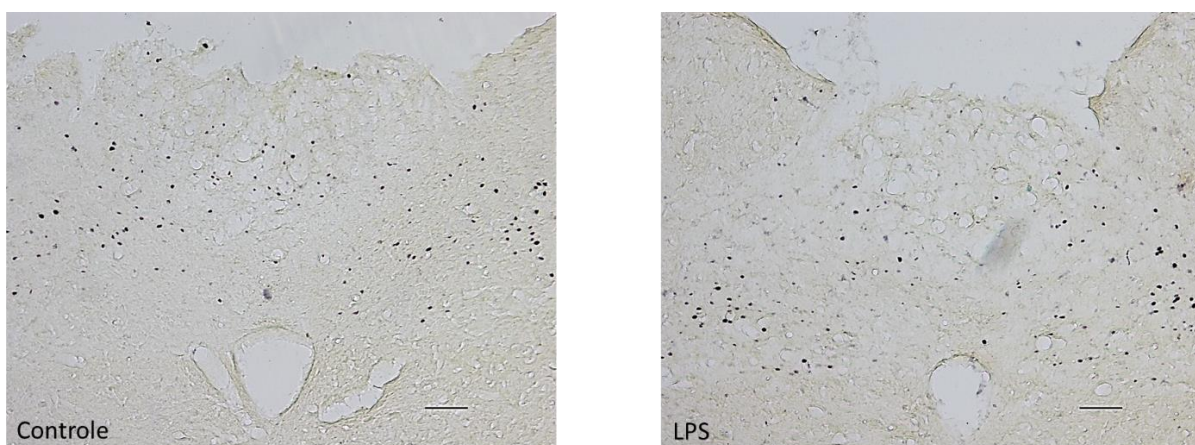
Fotografia 12 - Mostrando a área do locus coeruleus com neurônios imunorreativos para C-fos pós teste de estresse por contenção em filhotes adultos de ratas que receberam LPS ou SAL no GD16.



Fonte: do autor.

Nota: Fotografia mostrando a área do locus coeruleus com neurônios imunorreativos para C-fos pós teste de contenção realizado nos filhotes adultos de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.

Fotografia 13 - Mostrando a área do trato solitário com neurônios imunorreativos para C-fos pós teste de estresse por contenção em filhotes adultos de ratas que receberam LPS ou SAL no GD16.



Fonte: do autor.

Nota: Fotografia mostrando a área do núcleo do trato solitário com neurônios imunorreativos para C-fos pós teste de contenção realizado nos filhotes adultos de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16.

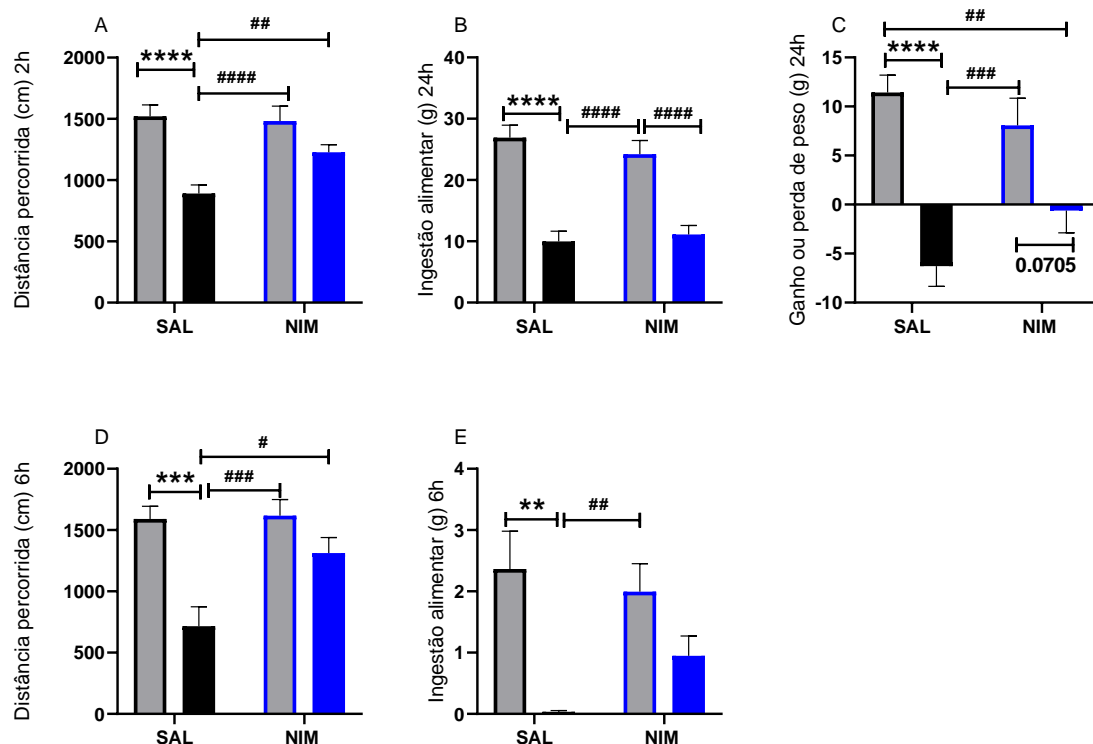
6.4 RESULTADOS DAS RATAS QUE RECEBERAM PRÉ-TRATAMENTO COM SAL OU NIM E TRATAMENTO COM LPS OU SAL NO DG16

6.4.1 Resultados quanto ao desenvolvimento do comportamento

Conforme mostrado no gráfico 19 o NIM na dose de 5mg/kg foi capaz de prevenir alguns parâmetros do comportamento doentio causado pelo LPS na dose de 500 µg/kg no DG16 nas ratas.

Observamos que o NIM preveniu a baixa mobilidade das ratas tratadas com LPS evidenciado pela maior distância percorrida (cm) no CA durante 5 min 2h $p<0.01$ (n=14-34 por grupo) e 6h $p<0.05$ (n=8-9 por grupo) após receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS em comparação ao grupo que recebeu tratamento com LPS. O mesmo efeito não foi observado quanto a ingestão alimentar durante 6h (n=8-9 por grupo) e 24h (n=14-29 por grupo). E da mesma maneira não preveniu a perda de peso durante 24h (n=14-29 por grupo) em comparação ao grupo das ratas LPS.

Gráfico 19 - Resultado quanto ao desenvolvimento do comportamento doentio das ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto a prevenção do desenvolvimento do comportamento doentio das ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16. A) distância percorrida (cm) durante no teste de campo aberto de 2h durante 5 min (n=14-34 por grupo), B) ingestão alimentar durante 24h (g) (n=14-29 por grupo), C) perda ou ganho de peso durante 24h (g) (n=14-29 por grupo), D) distância percorrida (cm) no teste de campo aberto de 6h durante 5 min (n=8-9 por grupo) e E) ingestão alimentar durante 6h (g) (8-9 por grupo). Dados expressos em média ± EPM. Os símbolos representam significância, **p<0.01, ***p<0.001****p<0.0001 quando comparados entre grupo controle e LPS, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001####p<0.0001 quando comparados entre os grupos NIM e LPS. Valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

Tabela 23 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao comportamento doentio das ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

CA 2h				
	ANOVA de duas vias	Ômega-quadrado		
Varição	F (DFn, DFd)		Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 88) = 4,667	*	0.0335	0.02
Pré-tratamento	F (1, 88) = 2,957	NS	0.089	0.01
Tratamento	F (1, 88) = 25,80	****	<0.0001	0.19
CA 6h				
	F (DFn, DFd)		Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 29) = 4,786	*	0.0369	0.06
Pré-tratamento	F (1, 29) = 4,786	*	0.0369	0.07
Tratamento	F (1, 29) = 20,49	****	<0.0001	0.32
IA 6h				
	F (DFn, DFd)		Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 29) = 2,521	NS	0.1232	0.02
Pré-tratamento	F (1, 29) = 0,4487	NS	0.5082	0.01
Tratamento	F (1, 29) = 17,40	***	0.0003	0.32
IA 24				
	F (DFn, DFd)		Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 77) = 1,020	NS	0.3156	0.0001
Pré-tratamento	F (1, 77) = 0,1688	NS	0.6823	0.005
Tratamento	F (1, 77) = 62,82	****	<0.0001	0.43
G/P 24h				
	F (DFn, DFd)		Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 76) = 3,472	NS	0.0663	0.02
Pré-tratamento	F (1, 76) = 0,2275	NS	0.6348	0.006
Tratamento	F (1, 76) = 29,68	****	<0.0001	0.25

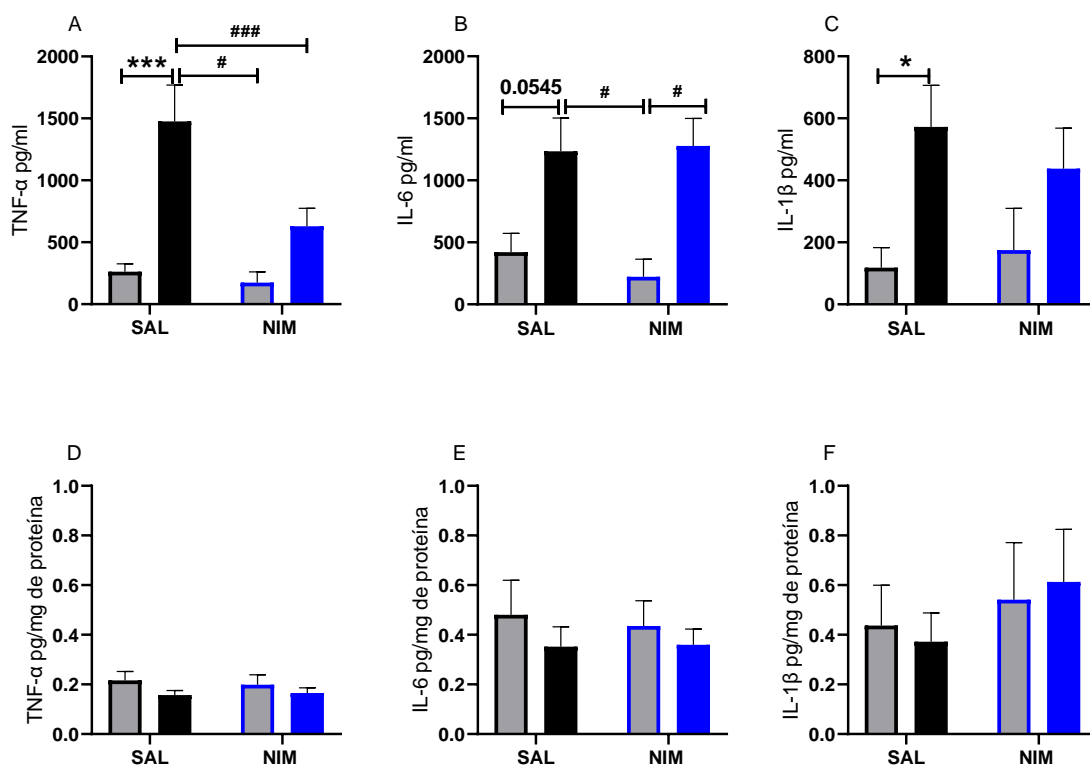
Fonte: do autor.

Nota: (CA 2h) distância percorrida (cm) no teste de campo aberto de 2h durante 5 min (IA 24h), (CA 6h) distância percorrida (cm) no teste de campo aberto de 6h durante 5 min, (IA 6h) ingestão alimentar durante 6h (g), ingestão alimentar durante 24h (g), (P/G 24h) perda ou ganho de peso durante 24h (g). Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \geq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

6.4.2 Resultados quanto as concentrações de citocinas no plasma materno, líquido amniótico e cérebro fetal.

Podemos observar no gráfico 20 que a NIM foi parcialmente eficiente em prevenir a elevação nas concentrações de citocinas plasmáticas no sangue materno 2h depois receberem pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS. Observamos que houve uma redução na concentração de TNF- α $p < 0.001$ ($n=6-8$ por grupo) no plasma de ratas prenhas 2h após receberem pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS, quando comparados ao grupo LPS. Porém não houve diferença na concentração das citocinas IL-6 e IL-1 β ($n=6-8$ por grupo) quando comparados ao grupo LPS. Não houve detecção destas citocinas no líquido amniótico, e não houve diferença quanto a concentração destas citocinas no cérebro fetal entre os grupos 2h após receberem pré-tratamento e tratamento ($n=7-8$).

Gráfico 20 - Resultados quanto as concentrações de citocinas plasmáticas das ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS no DG16 e do cérebro fetal.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto as concentrações de citocinas plasmáticas A) TNF- α (pg/ml), B) IL-6 (pg/ml) e C) IL-1 β (pg/ml), 2h após as ratas receberem pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16 (n=6-8 por grupo), e do cérebro fetal D) TNF- α (pg/mg de proteína) E) IL-6 (pg/mg de proteína) e F) IL-1 β (pg/mg de proteína) coletados no DG16 2h pós-tratamento com LPS ou SAL (n=7-8 por grupo). Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância *p<0.05, ***p<0.001. Quando comparados entre grupo controle e LPS, #p<0.05, ###p<0.001. Quando comparados entre os grupos NIM e LPS. Valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

Tabela 24 - Análise através da ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos níveis de citocinas no plasma e cérebro fetal 2h após as ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

(Continua)

ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado		
TNF-α Plasma materno				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 25) = 4,030	NS	0.0556	0.05
Pré-tratamento	F (1, 25) = 6,100	*	0.0207	0.09
Tratamento	F (1, 25) = 19,43	***	0.0002	0.32
IL-6 Plasma materno				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 23) = 0,3096	NS	0.5833	0.01
Pré-tratamento	F (1, 23) = 0,1281	NS	0.7237	0.02
Tratamento	F (1, 23) = 18,37	***	0.0003	0.40
IL-1β Plasma materno				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 26) = 0,6379	NS	0.4317	0.009
Pré-tratamento	F (1, 26) = 0,1070	NS	0.7462	0.02
Tratamento	F (1, 26) = 8,961	**	0.006	0.21
ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado		
TNF-α Cérebro fetal				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 25) = 0,1891	NS	0.6674	0.02
Pré-tratamento	F (1, 25) = 0,02015	NS	0.8883	0.03
Tratamento	F (1, 25) = 2,477	NS	0.1281	0.05
IL-6 Cérebro fetal				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 25) = 0,07295	NS	0.7893	0.03
Pré-tratamento	F (1, 25) = 0,03781	NS	0.8474	0.03
Tratamento	F (1, 25) = 1,091	NS	0.3062	0.003

Tabela 24 - Análise através da ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos níveis de citocinas no plasma e cérebro fetal 2h após as ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

(Conclusão)				
IL-1β Cérebro fetal				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 25) = 0,1331	NS	0.7183	0.03
Pré-tratamento	F (1, 25) = 0,8355	NS	0.3694	0.006
Tratamento	F (1, 25) = 0,0003	NS	0.9862	0.03

Fonte: do autor.

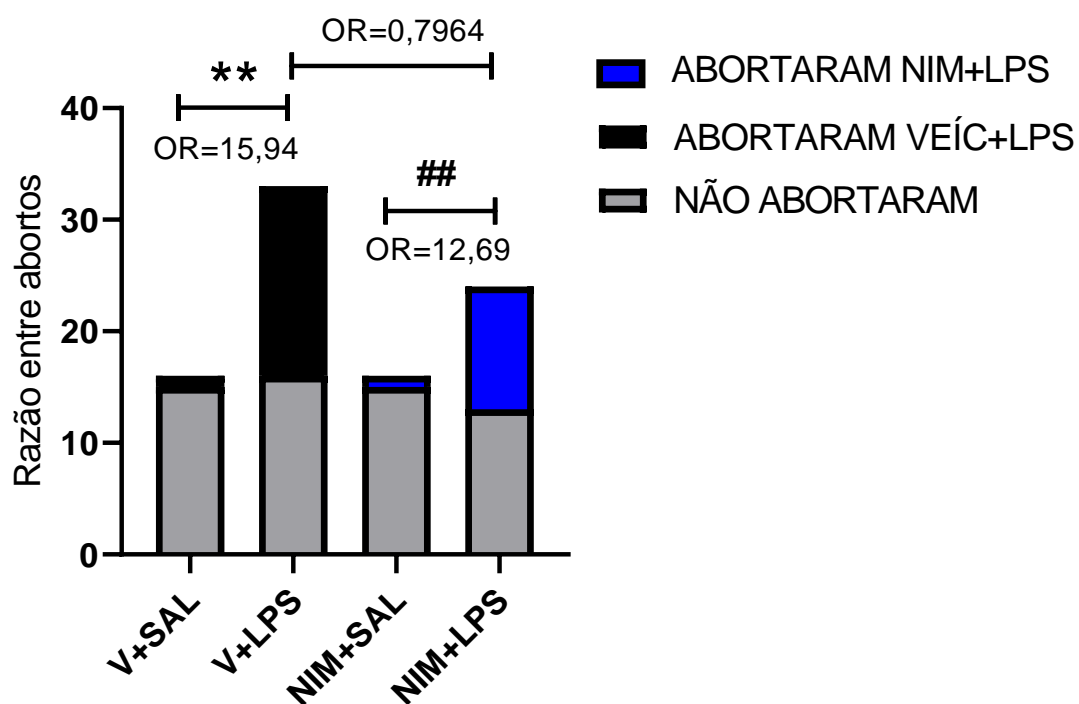
Nota: Valores de TNF- α , IL-6 e IL-1 β no plasma e no cérebro fetal 2h após o pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com SAL ou LPS. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

6.4.3 Resultado quanto as ratas que receberam pré-tratamento SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL e abortaram ou não.

Conforme demonstrado no gráfico 21, dentro dos grupos pré-tratados foi observado que as ratas que receberam NIM+LPS no DG16 sofreram mais abortos em comparação as ratas que receberam NIM+SAL. Em contrapartida as ratas que receberam NIM+LPS abortaram tanto quanto as ratas que receberam V+LPS.

Dentre as ratas prenhas foi maior o número de abortos do grupo que recebeu NIM+LPS no DG16 11/24=45,83% n=24 quando comparado ao grupo NIM+SAL 1/15=5,56% n=16 onde $p < 0.01$. Sendo esta, a relação das ratas que sofreram abortos ou não e observamos que as ratas que receberam NIM+LPS tiveram 12,69 vezes mais chances de abortarem do que as ratas NIM+SAL, evidenciado pelo ODDS RATIO (OR=12,69). Porém, as ratas que receberam NIM+LPS tiveram a mesma chance de abortar que as ratas que receberam V+LPS conforme evidenciado pelo OR=0,7964.

Gráfico 21 - Resultado da razão quanto ao número de aborto ou não, abortos causados pelo pré-tratamento com V ou NIM e pelo tratamento com LPS ou SAL.



Fonte: do autor.

Nota: Resultado quanto a razão do número de abortos ou não abortos causados pelo pré-tratamento com Veículo (V) ou NIM e tratamento com LPS ou SAL. Dados expressos em valores absolutos de contingência. Os símbolos representam significância $**p < 0.01$; $##p < 0.01$ e ODDS RATION (OR) é a chance de um evento ocorrer.

Tabela 25 - Análise dos dados de Qui-quadrado das ratas que abortaram ou não.

	NIM+V		NIM+LPS		
Abortos	1		11		
Não abortos	15		13		
Qui-quadrado	Valor de p		Odds Ratio		95% IC
$\chi^2=7.163,1$	$z=2.676$	**	0.0074	OD=12,69	1,885 to 144,6

	V+LPS		NIM+LPS		
Abortos	17		11		
Não abortos	16		13		
Qui-quadrado	Valor de p		Odds Ratio		95% IC
$\chi^2=0.1795,1$	$z=0.4237$	NS	0.6718	OD=0,7964	0,2817 to 2,180

Fonte: do autor.

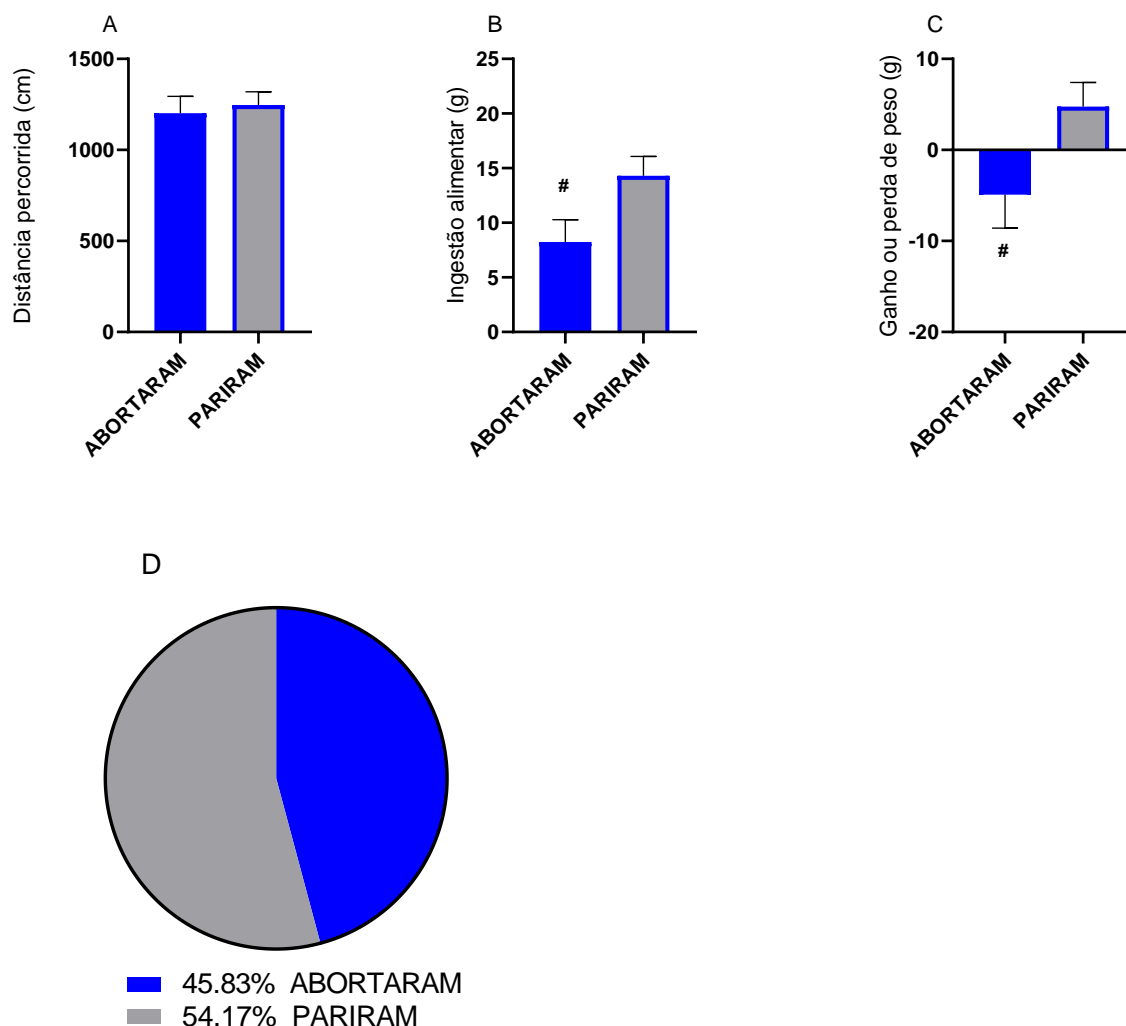
Nota: Valores de Qui-quadrado (χ^2), valores de p mostrando a significância, valores de odds ratio (OR) que é a chance de um evento ocorrer e intervalo de confiança (IC).

6.4.4 Resultado quanto as ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS no DG16 e abortaram ou não.

Como apresentado no gráfico 22 dentro do grupo das ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS durante a gestação e desenvolveram comportamento doentio, foi observado que algumas ratas abortaram pós-tratamentos.

Observamos que do total de ratas pré-tratadas com NIM e tratadas com LPS durante a gestação (n=24) que 45,83% (n=11) abortaram e 54,17% (n=13) levaram a prenhez a termo. Não houve diferença quanto a distância percorrida (cm) no teste de CA 2h depois de receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS. No entanto, as ratas que abortaram ingeriram menor quantidade de alimento durante 24h $p<0.05$ e perderam mais peso em 24h $p<0.05$, em comparação as ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS e não abortaram.

Gráfico 22 - Resultados quanto aos abortos causados pelo LPS de ratas pré-tratadas com NIM.



Fonte: do autor.

Nota: Resultado quanto aos abortos causados pelo LPS nas ratas que receberam pré-tratamento com NIM, A) distância percorrida (cm) pelas ratas que sofreram ou não aborto no campo aberto 2h após receberem pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS, B) ingestão alimentar (g) das ratas que sofreram ou não aborto, 24h após receberem pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS, C) perda de peso (g) das ratas que sofreram ou não aborto, 24h após receberem pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS e D) percentual de abortos das ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS (n=24 animais). Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância #p<0.05 quando comparadas ao grupo que não sofreram abortos.

Tabela 26 - Análise através do teste t de student dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao comportamento doentio das ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS no DG16 e abortaram ou não.

	Abortos		Paridas		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de p	d	Número	
CA 2h	1202	91,94	1247	72,76	NS	0.7004	0.29	n=11-13
IA 24h	8,238	2,033	14,31	1,769	*	0.0337	0.93	n=11-13
P/G (g)	-4,909	3,686	4,769	2,632	*	0.0399	0.88	n=11-13
Ratas que abortaram			%	45.83				
Ratas que pariram			%	54.17				

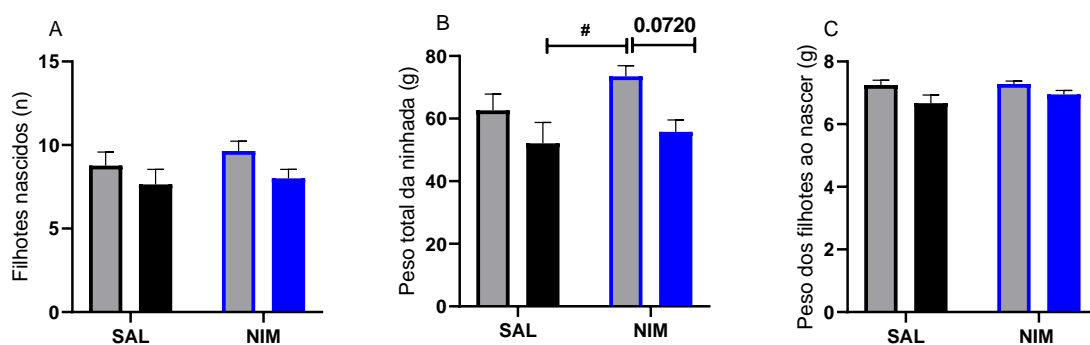
Fonte: do autor.

Nota: (CA 2h) distância percorrida (cm) no teste de campo aberto 2h durante 5 min (IA 24h), ingestão alimentar durante 24h (g), (P/G) perda ou ganho de peso durante 24h (g), e % de ratas que abortaram ou não. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

6.4.5 Resultados quanto ao nascimento da prole de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16

Como apresentado no gráfico 23 observamos que a ninhada de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com SAL nasceu mais pesada em comparação a ninhada de ratas que receberam LPS $p < 0.05$, e da mesma maneira tendeu a ser mais pesada que a ninhada que recebeu pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS $p = 0.0720$ ($n = 13-20$ por grupo). Não houve diferença entre os grupos pré-tratados e tratados quanto ao número de filhotes nascidos e peso dos filhotes no DPN1 ($n = 13-20$ por grupo).

Gráfico 23 - Resultados quanto as ninhadas das ratas pré-tratadas com NIM e tratadas com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados das ninhadas quanto ao: A) número de filhotes que nasceram, B) peso total da ninhada (g) no DPN1 e C) peso do filhote (g) no DPN1, de filhotes machos e fêmeas de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16 (n=13-20 por grupo). Dados expressos em média \pm EPM. O símbolo # representa significância $\#p < 0.05$ quando comparado entre o grupo NIM e LPS.

Tabela 27 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao nascimento da prole de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

NFN				
ANOVA de duas vias			Ômega-quadrado	
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 60) = 0,1277	NS	0.7221	0.01
Pré-tratamento	F (1, 60) = 0,7085	NS	0.4033	0.004
Tratamento	F (1, 60) = 3,600	NS	0.0626	0.03
PTN				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 59) = 0,4906	NS	0.4864	0.007
Pré-tratamento	F (1, 59) = 2,001	NS	0.1625	0.01
Tratamento	F (1, 51) = 2,869	NS	0.0964	0.1
PFN				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 60) = 0,4753	NS	0.4932	0.007
Pré-tratamento	F (1, 60) = 0,7652	NS	0.3852	0.003
Tratamento	F (1, 60) = 6,700	*	0.0121	0.08

Fonte: do autor.

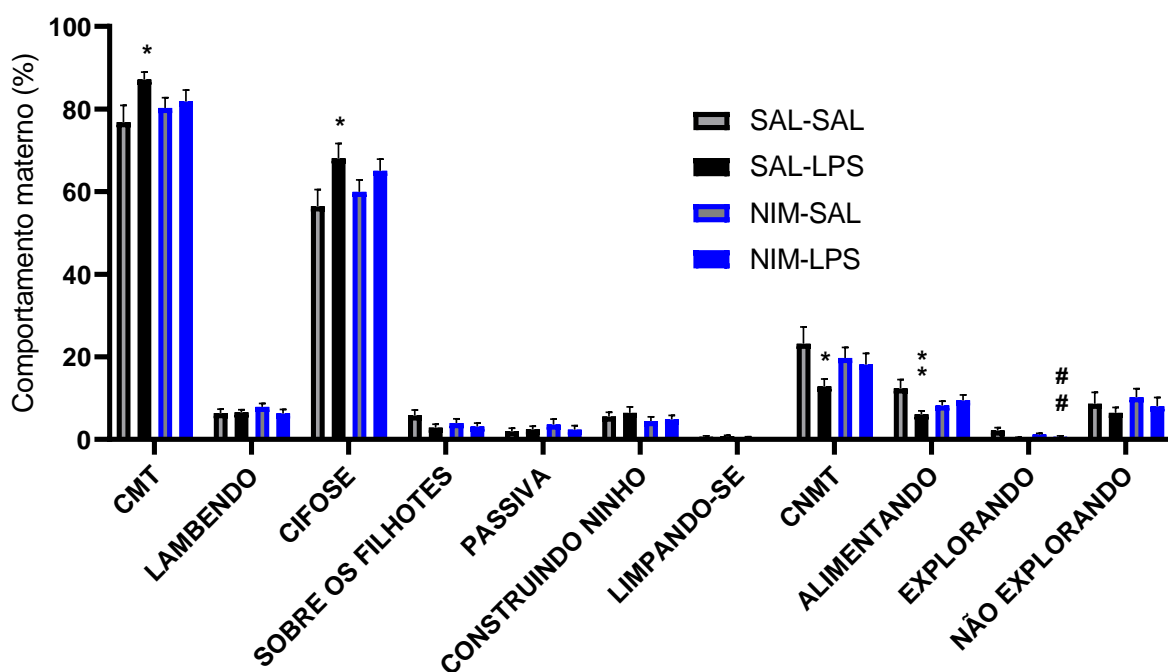
Nota: (NFN) número de filhotes que nasceram, (PTN) peso total da ninhada (g) no DPN1 e (PFN) peso do filhote (g) no DPN1. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

6.4.6 Resultados quanto aos cuidados maternos pós-nascimento da prole de ratas que receberam tratamento pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16

O gráfico 24 mostra o percentual de tempo gasto cuidando da prole, pelas ratas que receberam pré-tratamento com NIM ou SAL e tratamento com LPS ou SAL. Observamos que não houve diferença entre os grupos pré-tratados com NIM e tratados com LPS em relação ao grupo LPS no cuidado geral da prole no CMT. Não houve diferença entre os parâmetros, maternos de, "lambendo os filhotes," "em cifose alimentando os filhotes", "sobre os filhotes não alimentando", "em posição passiva

alimentando os filhotes”, “construindo o ninho” e “limpando-se”, e da mesma forma no comportamento na materno geral da prole CNMT, e pelos parâmetros não maternos “alimentando-se” e “fora do ninho não explorando” em comparação ao grupo LPS (n=12-15 por grupo). Houve diferença entre o grupo pré-tratado com NIM e tratado com LPS ou SAL no parâmetro “explorando” fora do ninho $p<0.01$.

Gráfico 24 - Resultados quanto aos cuidados maternos e não maternos de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto ao % de tempo gasto com cuidados maternos e não maternos com a prole nos PND2, 3 e 4 das ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16. Parâmetros maternos: Comportamento materno total (CMT), “lambendo” os filhotes, em “cifose” amamentado, “sobre os filhotes” não amamentando, em posição “passiva”, “construindo o ninho” e “limpando-se”. Parâmetros não-maternos: Comportamento não materno total (CNMT), “alimentando”, “explorando fora do ninho” e fora do ninho “não explorando” (n=15-12 por grupo). Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância * $p<0.05$, ** $p<0.01$ quando comparados entre o grupo LPS e controle, ## $p<0.01$ quando comparado entre os grupos NIM.

Tabela 28 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos cuidados maternos pós-nascimento da prole de ratas que receberam tratamento pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

(Continua)

CMT	ANOVA de duas vias			Ômega-quadrado
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 49) = 2,473	NS	0.1223	0,02
Pré-tratamento	F (1, 49) = 0,1109	NS	0.7406	0.01
Tratamento	F (1, 49) = 4,647	*	0.036	0.06
Lamb				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 49) = 1,152	NS	0.2884	0.002
Pré-tratamento	F (1, 49) = 0,3707	NS	0.5454	0.01
Tratamento	F (1, 49) = 0,4787	NS	0.4923	0.01
Cif				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 49) = 1,343	NS	0.2522	0.005
Pré-tratamento	F (1, 49) = 0,03510	NS	0.8522	0.01
Tratamento	F (1, 49) = 7,337	**	0.0093	0.10
Sob				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 49) = 1,286	NS	0.2622	0.005
Pré-tratamento	F (1, 49) = 0,7654	NS	0.3859	0.004
Tratamento	F (1, 49) = 3,538	NS	0.0659	0.04
Pass				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 49) = 0,0002256	NS	0,9881	0.01
Pré-tratamento	F (1, 49) = 7,738	**	0,0077	0.11
Tratamento	F (1, 49) = 0,2521	NS	0,6178	0.01

Tabela 28 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos cuidados maternos pós-nascimento da prole de ratas que receberam tratamento pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

(Continuação)

CN				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (30, 539) = 2,363	****	<0.0001	0.004
Pré-tratamento	F (10, 539) = 886,7	****	<0.0001	0.92
Tratamento	F (3, 539) = 7,725	NS	>0.9999	0.0003
Limp				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 49) = 1,465	NS	0.2319	0.008
Pré-tratamento	F (1, 49) = 4,515	*	0.0387	0.06
Tratamento	F (1, 49) = 0,2970	NS	0.5883	0.01
CNMT				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 49) = 2,473	NS	0.1223	0.02
Pré-tratamento	F (1, 49) = 0,1109	NS	0.7406	0.01
Tratamento	F (1, 49) = 4,647	*	0.036	0.06
Alim				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 49) = 7,653	**	0.008	0.10
Pré-tratamento	F (1, 49) = 0,08395	NS	0.7732	0.01
Tratamento	F (1, 49) = 3,524	NS	0.0664	0.04
EFN				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 49) = 3,167	NS	0.0814	0.03
Pré-tratamento	F (1, 49) = 0,5447	NS	0.464	0.007
Tratamento	F (1, 49) = 10,71	**	0.002	0.15

Tabela 28 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos cuidados maternos pós-nascimento da prole de ratas que receberam tratamento pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

(Conclusão)

FNNE				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 49) = 1,306	NS	0.9971	0.01
Pré-tratamento	F (1, 49) = 0,5912	NS	0.4457	0.007
Tratamento	F (1, 49) = 1,189	NS	0.2808	0.003

Fonte: do autor.

Nota: Parâmetros maternos: (CMT) Comportamento materno total, (Lamb) “lambendo” os filhotes, (Cif) em “cifose” amamentado, (Sob) “sobre os filhotes” não amamentando, (Pass) em posição “passiva”, (CN) “construindo o ninho” e (Limp) “limpando-se”. Parâmetros não-maternos: (CNMT) comportamento não materno total, (Alim) “alimentando”, (EFN) “explorando fora do ninho” e (FNNE) fora do ninho “não explorando”. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o “*Ômega-quadrado*”.

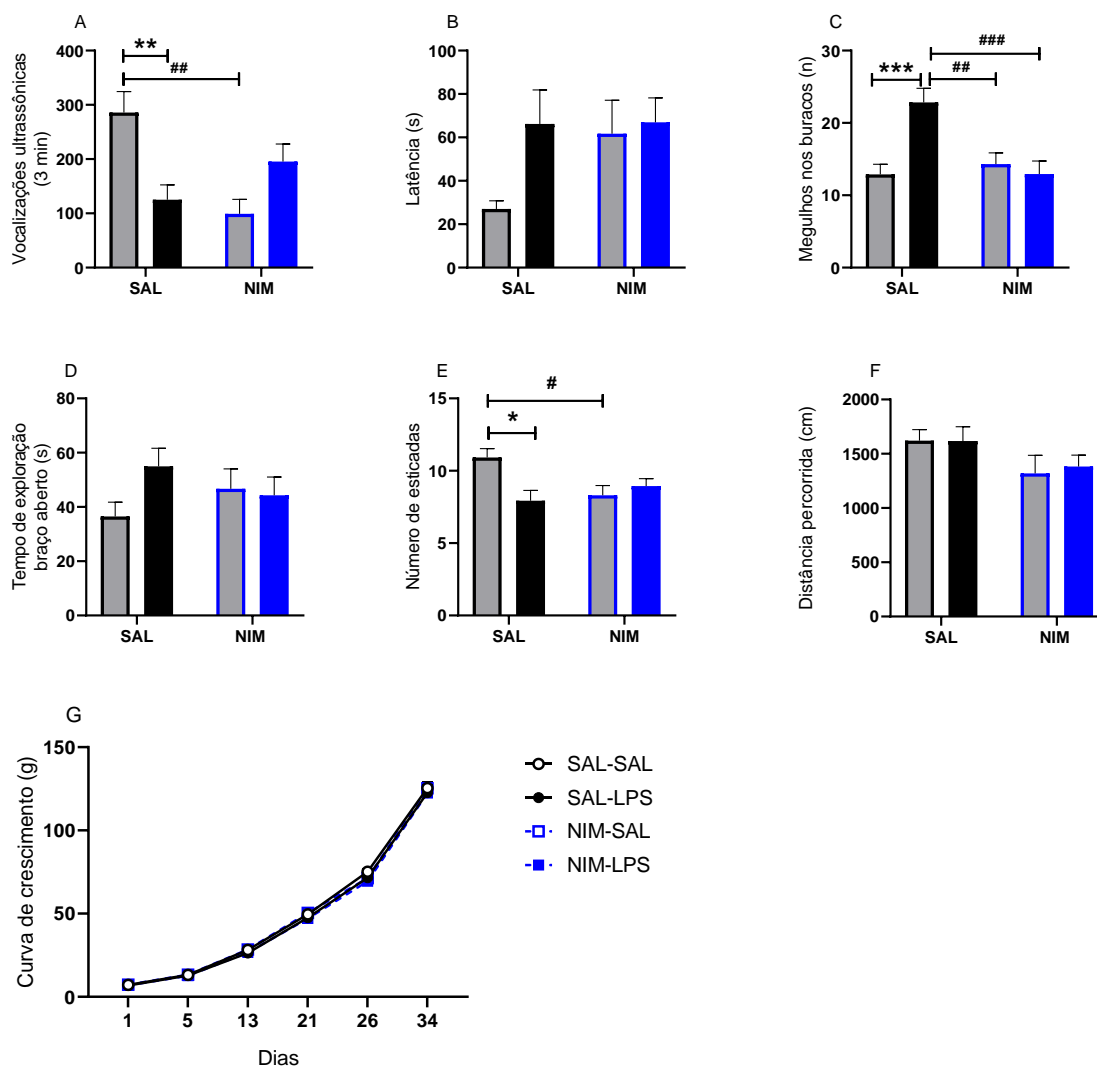
6.5 RESULTADOS QUANTO O COMPORTAMENTO DOS FILHOTES NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA

Conforme apresentado no gráfico 25 o pré-tratamento com NIM durante a gestação preveniu alguns comportamentos típicos induzidos pelo LPS aplicado durante a gestação, em comparação ao grupo LPS.

Podemos observar no gráfico 21 que não houve diferença na quanto as emissões de vocalizações ultrassônicas do grupo pré-tratado com NIM e tratado com LPS em relação ao grupo LPS. Porém, houve redução nos parâmetros de comunicação dos filhotes das ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com SAL, evidenciado pela baixa na emissão de vocalizações ultrassônicas $p < 0.01$ ($n=11-17$ por grupo) no DPN5. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto latência para alcançar a porção com a maravalha proveniente do ninho materno no teste de *homing* ($n=11-17$ por grupo) no DPN13. Já no teste de tábua de buracos observamos uma redução do comportamento repetitivo mostrado pela diminuição no número de mergulhos com a cabeça nos buracos $p < 0.001$ ($n=13-24$ por grupo) no DPN26, prevenindo o comportamento tipo-repetitivo quando comparado ao grupo LPS. Houve uma redução da avaliação de risco no grupo que

recebeu NIM da mesma forma que o grupo que recebeu LPS quando comparados ao grupo que recebeu somente SAL, no entanto não houve diferença no tempo de exploração do braço aberto por estes grupos no teste de labirinto em cruz elevado no DPN28 (n=12-17 por grupo). E da mesma maneira, não houve diferença na mobilidade entre os grupos conforme mostrado pela distância percorrida (cm) no CA durante 5 min (n=13-24 por grupo) no DPN34 e não houve diferença entre os grupos quanto ao peso dos filhotes machos durante o crescimento nos DPN1, 5, 13, 21, 26 e 34, como mostrado na curva de crescimento (n=11-15 por grupo).

Gráfico 25 - Resultados quanto o comportamento dos filhotes machos durante a infância e adolescência, filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou LPS no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultado quanto ao comportamento dos filhotes machos de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16. A) quanto ao: número de vocalizações ultrassônicas durante 3 min no DPN5, B) latência (s) para entrada na porção com maravalha do ninho no teste de *homing* no DPN13, C) número de mergulhos no teste de tábua de buracos no DPN26, D) tempo gasto (s), E) número de esticadas para entrada nos braços abertos no teste de labirinto em cruz elevado no DPN28, F) distância percorrida (cm) no campo aberto durante 5 min no DPN34 e G) curva de crescimento (g) dos filhotes pesados nos DPN1, 5, 13, 21, 26 e 34. (n=26-17 animais por grupo). Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância **p<0.01, ***p<0.001 quando comparados entre o grupo e controle, ##p<0.01, ###p<0.001 quando comparados entre os grupos NIM e grupos SAL e LPS.

Tabela 29 - Análise através do Anova de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao comportamento dos filhotes na infância e adolescência, de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

(Continua)

Vus	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 51) = 16,34	***	0.0002	0.21
Pré-tratamento	F (1, 51) = 3,345	NS	0.0733	0.03
Tratamento	F (1, 51) = 1,018	NS	0.3177	0.0002
Homing				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 51) = 1,674	NS	0.2015	0.01
Pré-tratamento	F (1, 51) = 1,821	NS	0.1832	0.01
Tratamento	F (1, 51) = 2,869	NS	0.0964	0.03
TB				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 66) = 9,191	**	0.0035	0.08
Pré-tratamento	F (1, 66) = 5,128	*	0.0268	0.04
Tratamento	F (1, 66) = 5,290	*	0.0246	0.04
Est LEC				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 52) = 8,045	**	0.0065	0.10
Pré-tratamento	F (1, 52) = 1,587	NS	0.2134	0.009
Tratamento	F (1, 52) = 3,413	NS	0.0704	0.03
LEC				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 53) = 2,381	NS	0.1288	0.02
Pré-tratamento	F (1, 53) = 0,001086	NS	0.9738	0.01
Tratamento	F (1, 53) = 1,410	NS	0.2404	0.007

Tabela 29 - Análise através do Anova de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao comportamento dos filhotes na infância e adolescência, de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

(Conclusão)				
CA				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 67) = 0,06409	NS	0.8009	0,01
Pré-tratamento	F (1, 67) = 4,145	*	0.0457	0.04
Tratamento	F (1, 67) = 0,05138	NS	0.8214	0.01

Fonte: do autor.

Nota: (Vus) Vocalizações ultrassônicas durante 3 min no DPN5, *homing* no DPN13 (TB) tábua de buracos no DPN26, (LEC) labirinto em cruz elevado no DPN28, (CA) distância percorrida (cm) no campo aberto no DPN34. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*."

Tabela 30 - Análise através do Anova de três vias quanto ao crescimento dos filhotes na infância e adolescência, de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

Curva de crescimento			
ANOVA de três vias	F (DFn, DFd)	Valor de p	
Tempo (dias)	F (5, 282) = 4582	****	<0.0001
(SAL vs NIM)	F (1, 282) = 0,5937	NS	0.4416
(SAL vs LPS)	F (1, 282) = 12,12	***	0.0006
Tempo (dias) x (SAL vs NIM)	F (5, 282) = 0,9655	NS	0.4392
Tempo (dias) x (SAL vs LPS)	F (5, 282) = 0,7708	NS	0.5715
(SAL vs NIM) x (SAL vs LPS)	F (1, 282) = 0,0004	NS	0.9835
Tempo (dias) x (SAL vs NIM) x (SAL vs LPS)	F (5, 282) = 0,1565	NS	0.9780

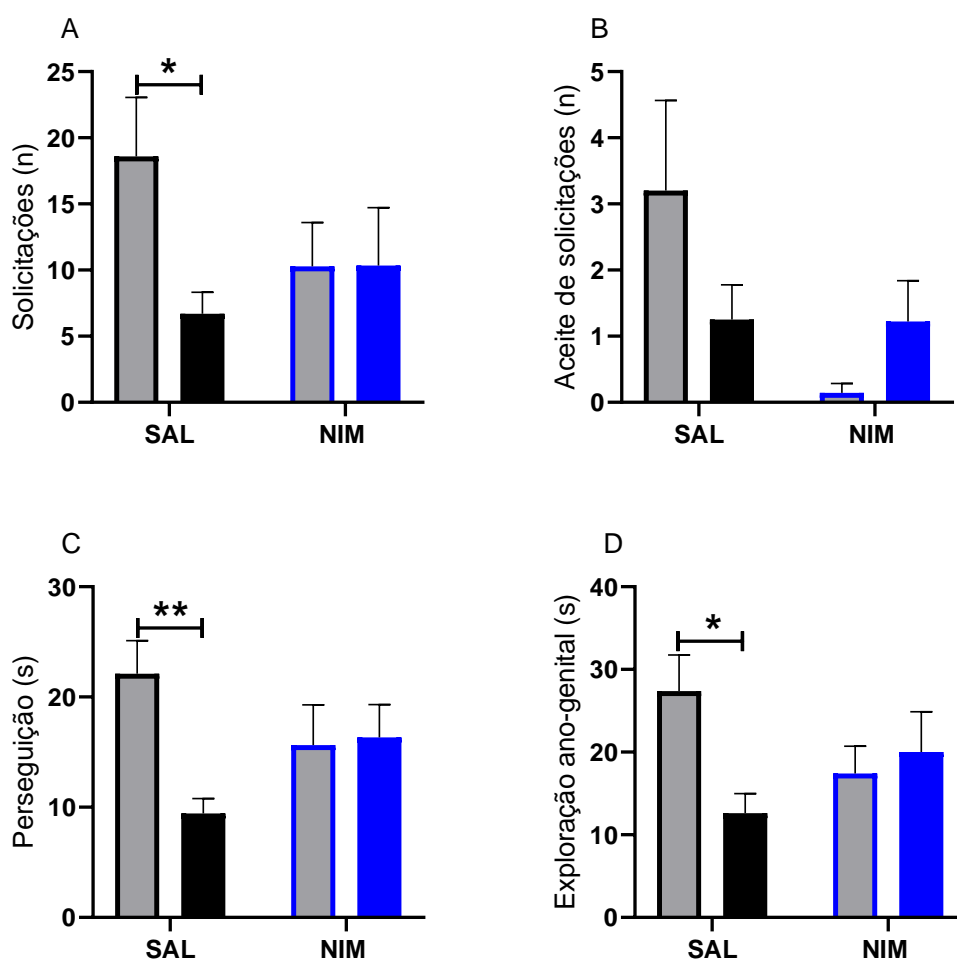
Fonte: do autor.

Nota: Curva de crescimento dos filhotes machos avaliadas nos DPN1, 5, 13, 21, 26 e 34 Valor de p referente a ANOVA de três vias.

Conforme demonstrado no gráfico 26 O NIM preveniu a redução na interação entre os filhotes durante os 10 min no teste de comportamento de brincar de ratas que receberam tratamento com LPS durante a gestação. Observamos que houve

interação entre os grupos pré-tratados e tratados quanto aos comportamentos de “perseguição” $p < 0.05$ “exploração ano-genital” $p < 0.05$.

Gráfico 26 - Resultados quanto ao comportamento de brincar dos filhotes machos de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Parâmetros observados durante o teste de comportamento de brincar no DPN33 dos filhotes machos de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16. (n=7-16 por grupo) quanto ao: A) número de vezes que o filhote “solicitou as brincadeiras”, B) número de vezes que o filhote “aceitou as brincadeiras”, C) tempo (s) que o filhote “perseguiu” o oponente e D) tempo (s) que o filhote “explorou” o oponente. Dados expressos em média ± EPM. Os símbolos representam significância * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ quando comparados entre o grupo LPS e controle.

Tabela 31 - Análise através do Anova de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos parâmetros no comportamento de brincar dos filhotes durante a adolescência, de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS.

Solic	ANOVA de duas vias	Ômega-quadrado		
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 38) = 3,054	NS	0.0886	0.04
Pré-tratamento	F (1, 38) = 0,4654	NS	0.4993	0.01
Tratamento	F (1, 38) = 3,006	NS	0.0911	0.04

AS				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 38) = 3,184	NS	0.0824	0.04
Pré-tratamento	F (1, 38) = 3,302	NS	0.0771	0.05
Tratamento	F (1, 38) = 0,2630	NS	0.6111	0.01

Pers				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 38) = 6,644	*	0.014	0.1
Pré-tratamento	F (1, 38) = 0,006211	NS	0.9376	0.01
Tratamento	F (1, 38) = 5,329	*	0.0265	0.07

Expl				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 38) = 5,250	*	0.0276	0.08
Pré-tratamento	F (1, 38) = 0,1149	NS	0.7365	0.01
Tratamento	F (1, 38) = 2,587	NS	0.116	0.03

Nota: (Solic) número de vezes que o filhote “solicitou as brincadeiras”, (AS) número de vezes que o filhote “aceitou as solicitações de brincadeiras”, (Pers) tempo (s) que o filhote “perseguiu” o oponente e (Expl) tempo (s) que o filhote “explorou” o oponente. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o “*Ômega-quadrado*”.

Fonte: do autor.

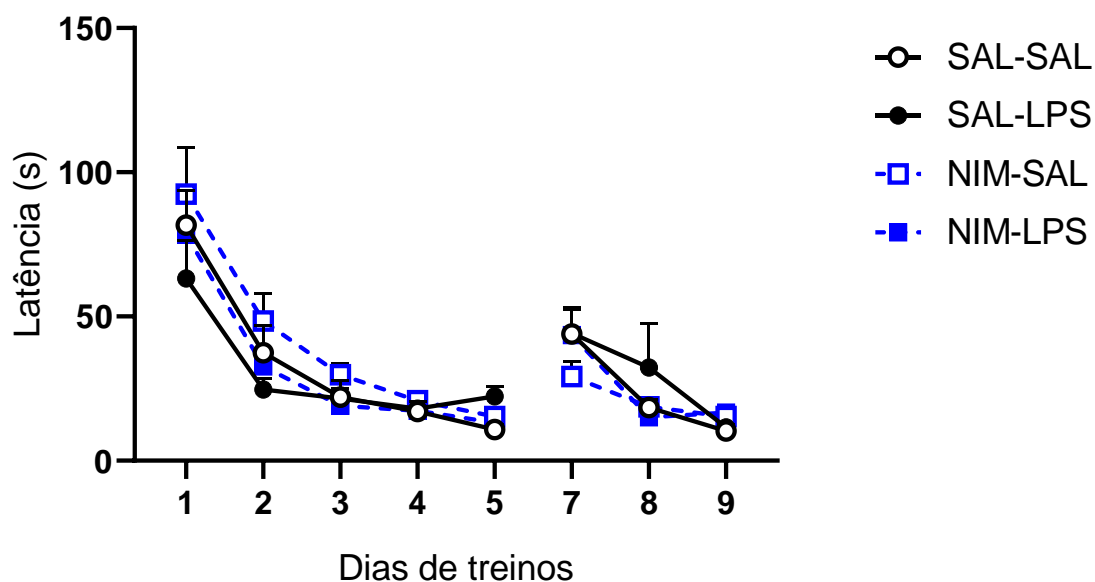
6.6 RESULTADOS QUANTO O COMPORTAMENTO DOS FILHOTES DURANTE A VIDA ADULTA DE RATAS QUE RECEBERAM PRÉ-TRATAMENTO COM SAL OU NIM E TRATAMENTO COM LPS OU SAL NO DG16.

6.6.1 Resultados quanto a memória espacial verificada pelo teste de Barnes.

6.6.1.1 Resultado quanto a aquisição e reversão do aprendizado durante os treinos.

O gráfico 27 mostra a evolução da aquisição de memória nos 5 primeiros dias treinos (dias 1 – 5), e nos 3 dias posteriores do teste de memória (dias 7 – 9) a reversão da memória de aprendizado. A evolução do aprendizado é evidenciada pela redução da latência para entrada no buraco onde está a caixa destino. Podemos observar que tanto o pré-tratamento quanto o tratamento não foram capazes de alterar o aprendizado espacial do filhote, demonstrando que, ambos os grupos aprenderam de forma semelhante onde estava a caixa destino, não havendo assim diferença significativa entre os grupos durante a aquisição da memória e da reversão da memória (n=6-13 por grupo).

Gráfico 27 - Resultados quanto a aprendizado durante os treinos no teste de barnes de filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Curva de aprendizado para entrada no buraco com a caixa destino dos filhotes machos durante a vida adulta, filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16 (n=6-13 por grupo). O gráfico mostra a latência para entrada no buraco com a caixa destino durante os dias de treino de aprendizado (dias 1, 2, 3, 4 e 5) e reversão do aprendizado (dias 7, 8 e 9). Dados expressos em média \pm EPM.

Tabela 32 - Análise através do Anova de três vias quanto a aquisição e reversão do aprendizado durante os treinos.

Treinos de Barnes (aprendizado)		
ANOVA de três vias	F (DFn, DFd)	Valor de p
Tempo (dias)	F (4, 185) = 47,65	**** <0.0001
(SAL vs NIM)	F (1, 185) = 0,6954	NS 0.4054
(SAL vs LPS)	F (1, 185) = 4,721	NS 0.0311
Tempo (dias) x (SAL vs NIM)	F (4, 185) = 0,7201	NS 0.5792
Tempo (dias) x (SAL vs LPS)	F (4, 185) = 1,244	NS 0.2939
(SAL vs NIM) x (SAL vs LPS)	F (1, 185) = 0,2895	NS 0.5912
Tempo (dias) x (SAL vs NIM) x (SAL vs LPS)	F (4, 185) = 0,4015	NS 0.8074
Treinos de Barnes (reversão do aprendizado)		
ANOVA de três vias	F (DFn, DFd)	Valor de p
Tempo (dias)	F (2, 111) = 23,86	**** <0.0001
(SAL vs NIM)	F (1, 111) = 2,614	NS 0.1088
(SAL vs LPS)	F (1, 111) = 0,5168	NS 0.4737
Tempo (dias) x (SAL vs NIM)	F (2, 111) = 2,288	NS 0.1063
Tempo (dias) x (SAL vs LPS)	F (2, 111) = 0,1834	NS 0.8327
(SAL vs NIM) x (SAL vs LPS)	F (1, 111) = 0,0564	NS 0.8127
Tempo (dias) x (SAL vs NIM) x (SAL vs LPS)	F (2, 111) = 1,348	NS 0.2639

Fonte: do autor.

Nota: Aprendizado durante o teste de Barnes durante os dias 1 – 5 e reversão do aprendizado durante os dias 7 – 9. Valor de p referente a ANOVA de três vias.

6.6.1.2 Resultados quanto ao aprendizado da localização da caixa destino

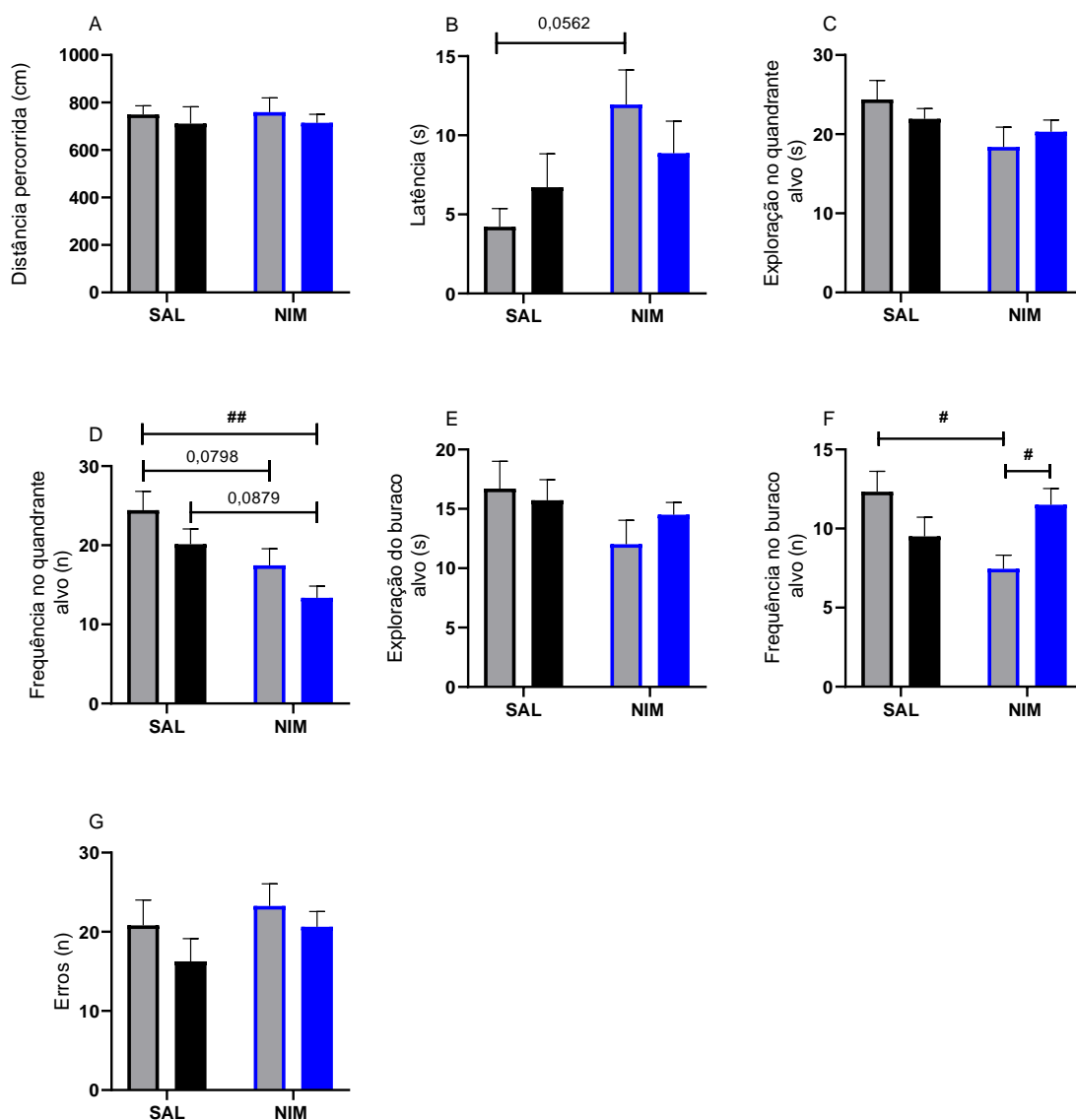
O gráfico 28 apresenta os parâmetros observados no 6^o dia durante o teste de aprendizado quanto a localização da caixa.

Observamos que não houve diferença quanto a memória espacial de aprendizado dos filhotes adultos dos grupos pré-tratados e tratados.

Não houve diferença quanto a distância percorrida no aparato, latência para chegada ao buraco alvo, o tempo de exploração do quadrante onde está localizado o buraco alvo, já com relação a frequência de exploração dos buracos deste quadrante

houve menor exploração pelos animais NIM+LPS em comparação ao grupo V+SAL $p < 0.01$, o tempo de exploração do buraco alvo, a frequência de exploração deste buraco e o número de vezes que exploram os buracos errados no dia do teste entre os grupos durante o 1 min e 30 seg de teste (n=8-14 por grupo).

Gráfico 28 - Resultados dos parâmetros avaliados no teste de aprendizado no dia 6 no teste de Barnes pelos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Parâmetros avaliados no dia do teste de aprendizado (dia 6) no teste de Barnes dos filhotes machos durante a vida adulta filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16 (n=6-13 por grupo) quanto a: A) distância percorrida (cm), B) latência para exploração do buraco alvo, C) exploração (s) no quadrante alvo, D) frequência de exploração dos buracos no quadrante alvo, E) exploração (s) do buraco alvo, F) frequência de exploração do buraco alvo, e G) número de vezes que frequentou o os buracos errados. Dados expressos em média ± EPM.

Tabela 33 - Análise através da Anova de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao aprendizado da localização da caixa destino.

(Continua)

Dist	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 39) = 0,003039	NS 0.9563	0.02	
Pré-tratamento	F (1, 39) = 0,01669	NS 0.8979	0.02	
Tratamento	F (1, 39) = 0,6693	NS 0.4183	0.008	
Lat				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 38) = 1,837	NS 0.1834	0.01	
Pré-tratamento	F (1, 38) = 5,752	* 0.0215	0.1	
Tratamento	F (1, 38) = 0,01927	NS 0.8903	0.02	
CQA				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 38) = 1,134	NS 0.2936	0.003	
Pré-tratamento	F (1, 38) = 3,475	NS 0.07	0.05	
Tratamento	F (1, 38) = 0,01464	NS 0.9043	0.02	
FQA				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 38) = 0,003141	NS 0.9556	0.01	
Pré-tratamento	F (1, 38) = 12,06	** 0.0013	0.19	
Tratamento	F (1, 38) = 4,513	* 0.0402	0.06	
CBA				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 38) = 0,9583	NS 0.3338	0.0009	
Pré-tratamento	F (1, 38) = 2,791	NS 0.103	0.04	
Tratamento	F (1, 38) = 0,1783	NS 0.6752	0.01	
FBA				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 38) = 9,397	** 0.004	0.16	
Pré-tratamento	F (1, 38) = 1,646	NS 0.2073	0.01	
Tratamento	F (1, 38) = 0,2918	NS 0.5922	0.01	

Tabela 33 - Análise através da Anova de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao aprendizado da localização da caixa destino.

(Conclusão)				
Erros				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 39) = 0,1271	NS	0.7234	0.02
Pré-tratamento	F (1, 39) = 1,625	NS	0.2099	0.01
Tratamento	F (1, 39) = 1,777	NS	0.1902	0.01

Fonte: do autor.

Nota: (Dist) distância percorrida (cm), (Lat) latência para exploração do buraco alvo, (EQA) exploração (s) no quadrante alvo, (FQA) frequência de exploração dos buracos no quadrante alvo, (EBA) exploração (s) do buraco alvo, (FBA) frequência de exploração do buraco alvo, e (Erros) número de vezes que frequentou o os buracos errados. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

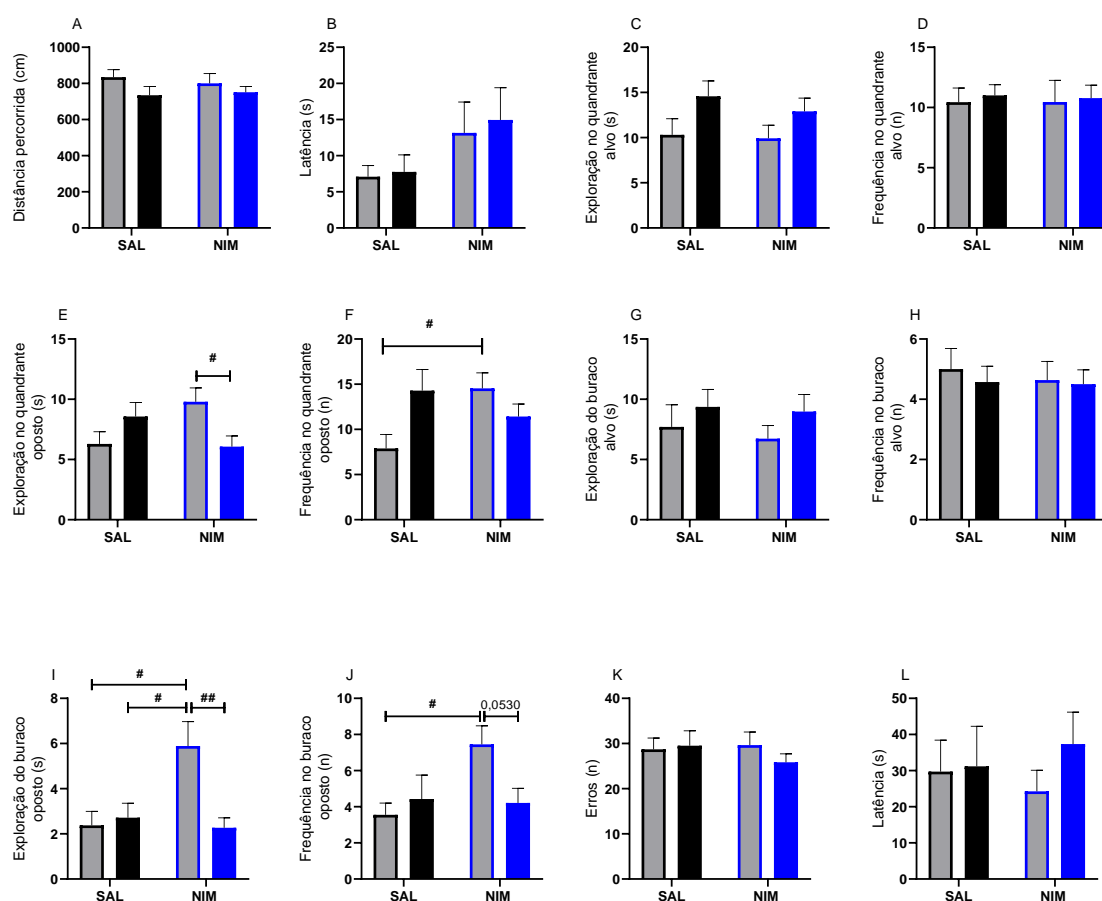
6.6.1.3 Resultados quanto a reversão do aprendizado da localização da caixa destino

O gráfico 29 apresenta os parâmetros observados no 10º dia durante o teste de reversão do aprendizado quanto a localização da caixa.

Observamos que quanto a memória espacial de reversão do aprendizado dos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL, houve uma tendência dos filhotes adultos de ratas que receberam NIM+SAL de explorarem por mais tempo (s) o quadrante oposto em comparação ao grupo NIM+LPS $p < 0.05$ e ao grupo NIM que recebeu LPS $p < 0.01$, e frequentaram mais o buraco oposto onde a caixa destino se encontrava anteriormente em comparação aos grupos NIM+LPS e V+SAL $p < 0.05$.

Não houve diferença entre os grupos pré-tratados e tratados durante o 1 mi e 30 seg de teste quanto, a distância percorrida (cm) no aparato, latência para chegada ao buraco alvo, tempo de exploração (s) do quadrante alvo, frequência de exploração no quadrante alvo, exploração (s) e frequência no quadrante oposto, tempo de exploração (s) no buraco alvo, frequência de exploração do buraco alvo e número de erros. (n=8-14 por grupo).

Gráfico 29 - Resultados dos parâmetros avaliados no teste de reversão do aprendizado no dia 10 no teste de Barnes pelos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Parâmetros avaliados no dia do teste de reversão do aprendizado (dia 10) no teste de Barnes dos filhotes machos de ratas que receberam pré-tratamento com SAL e NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16 (n=6-13 por grupo) quanto a: A) distância percorrida (cm), B) latência para exploração do buraco alvo, C) exploração (s) no quadrante alvo, D) frequência de exploração dos buracos no quadrante alvo, E) exploração (s) do quadrante oposto, F) frequência de exploração do buraco oposto, G) exploração (s) do buraco alvo, H) frequência de exploração do buraco alvo, I) exploração (s) do buraco oposto, J) frequência de exploração do buraco oposto, e G) número de vezes que frequentou o os buracos errados. Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância #p<0.05, ##p<0.01 quando comparados entre os grupos NIM, e o grupo controle.

Tabela 34 - Análise através do Anova de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto a reversão do aprendizado da localização da caixa destino.

(Continua)

Dist	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 39) = 0,3197	NS	0.575	0.01
Pré-tratamento	F (1, 39) = 0,03819	NS	0.8461	0.02
Tratamento	F (1, 39) = 2,758	NS	0.1048	0.04
Lat				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 39) = 0,02089	NS	0.8858	0.02
Pré-tratamento	F (1, 39) = 2,880	NS	0.0977	0.04
Tratamento	F (1, 39) = 0,09670	NS	0.7575	0.02
CQA				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 37) = 0,1512	NS	0.6996	0.01
Pré-tratamento	F (1, 37) = 0,3852	NS	0.5386	0.01
Tratamento	F (1, 37) = 4,771	*	0.0354	0.08
FQA				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 37) = 0,00639	NS	0.9367	0.02
Pré-tratamento	F (1, 37) = 0,00529	NS	0.9424	0.02
Tratamento	F (1, 37) = 0,09993	NS	0.7537	0.02

Tabela 34 - Análise através do Anova de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto a reversão do aprendizado da localização da caixa destino.

(Continuação)

CQO				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 37) = 7,683	**	0.0087	0.14
Pré-tratamento	F (1, 37) = 0,2174	NS	0.6438	0.01
Tratamento	F (1, 37) = 0,4446	NS	0.5091	0.01
FQO				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 37) = 7,501	**	0.0094	0.13
Pré-tratamento	F (1, 37) = 1,196	NS	0.2811	0.004
Tratamento	F (1, 37) = 0,8915	NS	0.3512	0.002
CBA				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 37) = 0,03858	NS	0.8454	0.02
Pré-tratamento	F (1, 37) = 0,2022	NS	0.6555	0.01
Tratamento	F (1, 37) = 1,656	NS	0.2062	0.01
FBA				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 37) = 0,05848	NS	0.8102	0.02
Pré-tratamento	F (1, 37) = 0,1296	NS	0.7208	0.02
Tratamento	F (1, 37) = 0,2186	NS	0.6429	0.02
CBO				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 37) = 6,689	*	0.0138	0.1
Pré-tratamento	F (1, 37) = 4,029	NS	0.0521	0.05
Tratamento	F (1, 37) = 4,607	*	0.0385	0.06

Tabela 34 - Análise através do Anova de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto a reversão do aprendizado da localização da caixa destino.

(Conclusão)				
FBO				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 37) = 4,462	*	0.0415	0.07
Pré-tratamento	F (1, 37) = 3,580	NS	0.0663	0.05
Tratamento	F (1, 37) = 1,478	NS	0.2318	0.009
Erros				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 39) = 0,7671	NS	0.3865	0.005
Pré-tratamento	F (1, 39) = 0,2680	NS	0.6076	0.01
Tratamento	F (1, 39) = 0,3247	NS	0.5721	0.01
LatBO				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 37) = 0,4159	NS	0.523	0.01
Pré-tratamento	F (1, 37) = 0,00174	NS	0.9669	0.02
Tratamento	F (1, 37) = 0,6519	NS	0.4246	0.008

Fonte: do autor.

Nota: (Dist) distância percorrida (cm), (Lat) latência para exploração do buraco alvo, (EQA) exploração (s) no quadrante alvo, (FQA) frequência de exploração dos buracos no quadrante alvo, (EQO) exploração (s) do quadrante oposto, (FQO) frequência de exploração do buraco oposto, (EBA) exploração (s) do buraco alvo, (FBA) frequência de exploração do buraco alvo, (EBO) exploração (s) do buraco oposto, (FBO) frequência de exploração do buraco oposto, (Erros) número de vezes que frequentou o os buracos errados e (LatBO) latência para o buraco oposto. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

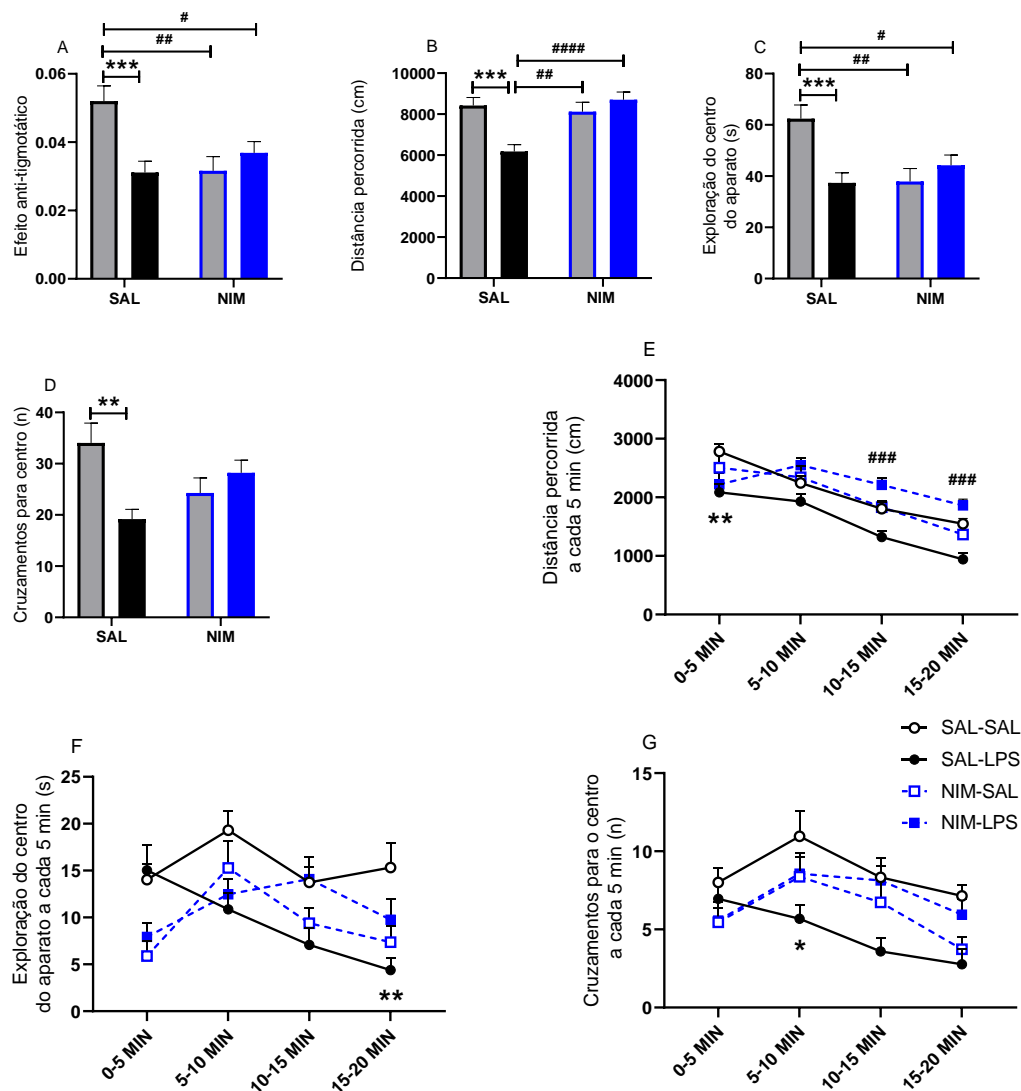
6.6.2 Resultados quanto ao teste de CA durante 20 min para verificação do comportamento tipo-ansioso.

No gráfico 30 apresentado podemos observar que o pré-tratamento com NIM preveniu alguns prejuízos causados pelo LPS aplicado nas mães durante a gestação quanto a mobilidade e nível ansiedade dos filhotes adultos.

Observamos que o NIM reverteu a menor exploração do aparato dos animais que receberam tratamento como LPS, demonstrado pelo aumento na distância total percorrida (cm) no aparato durante 20 min $p < 0.0001$, e da menor distância percorrida (cm) de 5 em 5 min durante os tempos entre 10 e 15 min $p < 0.001$ e 15 e 20 min $p < 0.001$. Não houve diferença quanto ao tempo (s) de exploração do centro do aparato e não houve diferença quanto ao número de cruzamentos para o centro do aparato durante 20 min. Da mesma maneira, não houve diferença quanto ao tempo (s) de exploração do centro do aparato a cada 5 min e número de cruzamentos para centro do aparato a cada 5 min, quando comparados ao grupo LPS (n=11-22).

O pré-tratamento com NIM não foi capaz de reverter o comportamento tipo-ansioso causado pelo LPS, conforme demonstrado pelo efeito anti-tigmotático.

Gráfico 30 - Resultados dos parâmetros avaliados durante o teste de campo aberto de 20 min pelos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto aos parâmetros avaliados no dia do teste CA durante 20 min dos filhotes machos adultos de ratas que receberam pré-tratamento com SAL e NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16 (n=11-22 animais por grupo) quanto ao: A) efeito anti-tigotático, B) distância percorrida (cm), C) tempo de exploração no centro do aparato e D) número de cruzamentos para o centro do aparato, parâmetros avaliados no dia do teste CA a cada 5 min e durante 20 min E) distância percorrida (cm), F) tempo de exploração no centro do aparato e G) número de cruzamentos para o centro do aparato. Dados expressos em média ± EPM. Os símbolos representam significância *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 quando comparados entre os grupos LPS e controle, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, ####p<0.0001 quando comparado entre os grupos NIM, e grupos LPS e controle.

Tabela 35 - Análise através do Anova de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao teste de CA durante 20 min para verificação do comportamento tipo-ansioso.

EAT				
ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado		
Varição	F (DFn, DFd)		Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 65) = 10,14	**	0.0022	0,1
Pré-tratamento	F (1, 65) = 3,197	NS	0.0785	0,02
Tratamento	F (1, 65) = 3,620	NS	0.0615	0,03
Dist				
Varição	F (DFn, DFd)		Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 65) = 12,35	***	0.0008	0.01
Pré-tratamento	F (1, 65) = 7,592	**	0.0076	0.006
Tratamento	F (1, 65) = 4,271	*	0.0428	0.003
EC				
Varição	F (DFn, DFd)		Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 65) = 10,14	**	0.0022	0.1
Pré-tratamento	F (1, 65) = 3,197	NS	0.0785	0.02
Tratamento	F (1, 65) = 3,620	NS	0.0615	0.03
FCC				
Varição	F (DFn, DFd)		Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 65) = 8,928	**	0.004	0.09
Pré-tratamento	F (1, 65) = 0,01447	NS	0.9046	0.01
Tratamento	F (1, 65) = 3,025	NS	0.0867	0.02

Fonte: do autor.

Nota: (EAT) efeito anti-tigmotático, (Dist) distância percorrida (cm), (EC) tempo de exploração no centro do aparato e (FCC) frequência de cruzamentos para o centro do aparato. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

Tabela 36 - Análise através do Anova de três vias quanto ao resultado do teste de CA a cada 5 min para verificação do comportamento tipo-ansioso.

Distância percorrida a cada 5 min			
Tabela ANOVA de 3 vias	F (DFn, DFd)	Valor de p	
Tempo (minutos)	F (3, 252) = 40,54	****	<0.0001
(SAL vs NIM)	F (1, 252) = 15,90	****	<0.0001
(SAL vs LPS)	F (1, 252) = 5,341	*	0.0216
Tempo (dias) x (SAL vs NIM)	F (3, 252) = 2,891	*	0.0360
Tempo (dias) x (SAL vs LPS)	F (3, 252) = 2,451	NS	0.0640
(SAL vs NIM) x (SAL vs LPS)	F (1, 252) = 27,03	****	<0.0001
Tempo (dias) x (SAL vs NIM) x (SAL vs LPS)	F (3, 252) = 1,277	NS	0.2828
Tempo de exploração do centro a cada 5 min			
Tabela ANOVA de 3 vias	F (DFn, DFd)	Valor de p	
Tempo (minutos)	F (3, 260) = 4,369	**	0.0051
(SAL vs NIM)	F (1, 260) = 4,277	*	0.0396
(SAL vs LPS)	F (1, 260) = 4,844	*	0.0286
Tempo (dias) x (SAL vs NIM)	F (3, 260) = 3,207	*	0.0237
Tempo (dias) x (SAL vs LPS)	F (3, 260) = 2,302	NS	0.0775
(SAL vs NIM) x (SAL vs LPS)	F (1, 260) = 13,58	***	0.0003
Tempo (dias) x (SAL vs NIM) x (SAL vs LPS)	F (3, 260) = 1,724	NS	0.1625
Cruzamentos para o centro a cada 5 min			
Tabela ANOVA de 3 vias	F (DFn, DFd)	Valor de p	
Tempo (minutos)	F (3, 264) = 6,190	***	0.0004
(SAL vs NIM)	F (1, 264) = 0,0443	NS	0.8333
(SAL vs LPS)	F (1, 264) = 6,275	*	0.0129
Tempo (dias) x (SAL vs NIM)	F (3, 264) = 1,514	NS	0.2112
Tempo (dias) x (SAL vs LPS)	F (3, 264) = 0,5876	NS	0.6236
(SAL vs NIM) x (SAL vs LPS)	F (1, 264) = 17,71	****	<0.0001
Tempo (dias) x (SAL vs NIM) x (SAL vs LPS)	F (3, 264) = 1,181	NS	0.3176

Fonte: do autor.

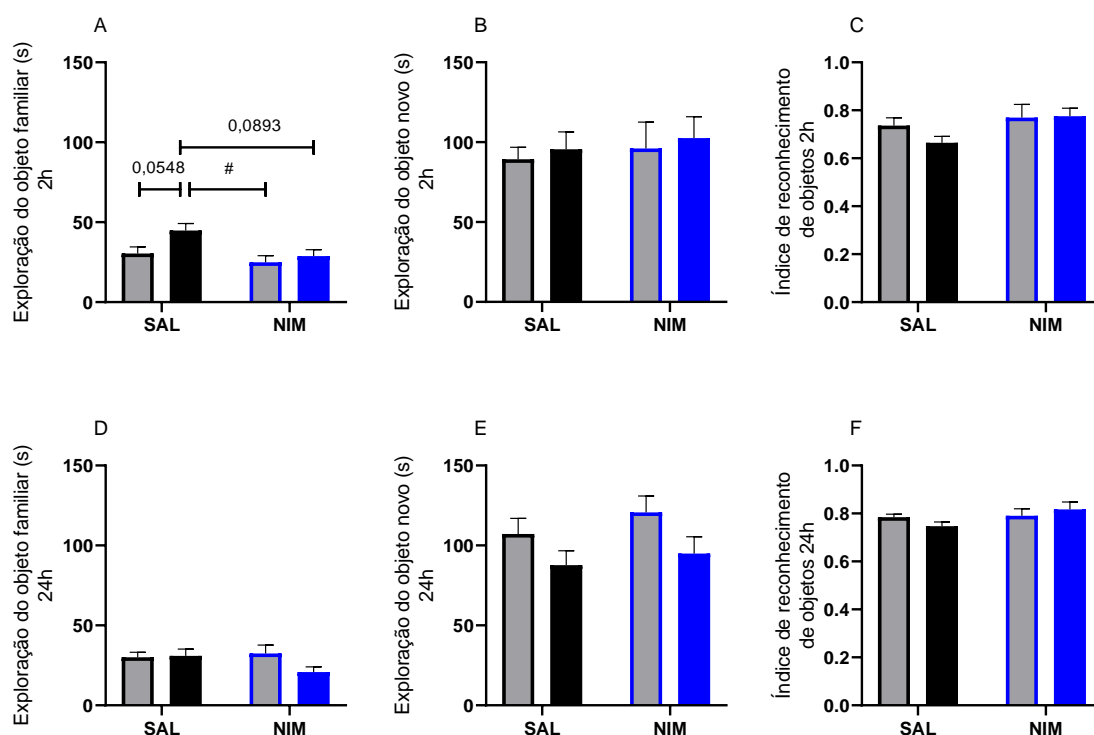
Nota: Distância percorrida a cada 5 min, tempo de exploração do centro do aparato a cada 5 min e frequência de cruzamentos para o centro do aparato a cada 5 min durante teste de CA de 20 min. Valor de p referente a ANOVA de três vias.

6.6.3 Resultados quanto ao teste de reconhecimento de objetos de 2h e 24h para verificação da memória de curto e longo prazo.

No gráfico 31 podemos observar que o LPS aplicado nas mães durante a gestação não alterou a exploração dos objetos em 2h e 24h conforme demonstrado pelo índice de reconhecimento a exploração. Porém, o grupo NIM tendeu a explorar menos o objeto familiar no teste de 2h.

Desta forma, não houve diferença entre os grupos pré-tratados com SAL ou NIM e com entre os grupos tratados com SAL ou LPS.

Gráfico 31 Resultados obtidos durante o teste de reconhecimento de objetos dos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto aos parâmetros avaliados nos dias dos testes reconhecimento de objetos de 2 e 24h dos filhotes adultos machos de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16 (n=9-9 animais por grupo) quanto ao: A) exploração (s) do objeto familiar de 2h, B) exploração (s) do objeto novo de 2h, C) índice de reconhecimento dos objetos de 2h, D) exploração (s) do objeto familiar de 24h, E) exploração do objeto novo de 24h e F) índice de reconhecimento dos objetos de 24h. Dados expressos em média \pm EPM.

Tabela 37 - Análise através do teste ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto os resultados do teste de reconhecimento de objetos de 2h e 24h para verificação da memória de curto e longo prazo.

(Continua)

EOF 2h				
Variação	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 44) = 1,309	NS	0.2588	0.005
Pré-tratamento	F (1, 44) = 5,536	*	0.0232	0.07
Tratamento	F (1, 44) = 3,941	NS	0.0534	0.05
EON 2h				
Variação	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 44) = 4,996	NS	0.9944	0.02
Pré-tratamento	F (1, 44) = 0,3352	NS	0.5656	0.01
Tratamento	F (1, 44) = 0,2813	NS	0.5985	0.01
IR 2h				
Variação	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 44) = 1,058	NS	0.3093	0.001
Pré-tratamento	F (1, 44) = 3,669	NS	0.0619	0.05
Tratamento	F (1, 44) = 0,7785	NS	0.3824	0.004
EOF 24h				
Variação	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 44) = 2,166	NS	0.1482	0.02
Pré-tratamento	F (1, 44) = 0,8134	NS	0.372	0.003
Tratamento	F (1, 44) = 1,573	NS	0.2164	0.01
EON 24h				
Variação	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 44) = 0,08940	NS	0.7663	0.01
Pré-tratamento	F (1, 44) = 0,9597	NS	0.3326	0.0007
Tratamento	F (1, 44) = 4,564	*	0.0383	0.07

Tabela 37 - Análise através do teste ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto os resultados do teste de reconhecimento de objetos de 2h e 24h para verificação da memória de curto e longo prazo.

(Conclusão)

Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 44) = 2,246	NS	0.1411
Pré-tratamento	F (1, 44) = 3,151	NS	0.0828
Tratamento	F (1, 44) = 0,07372	NS	0.7873

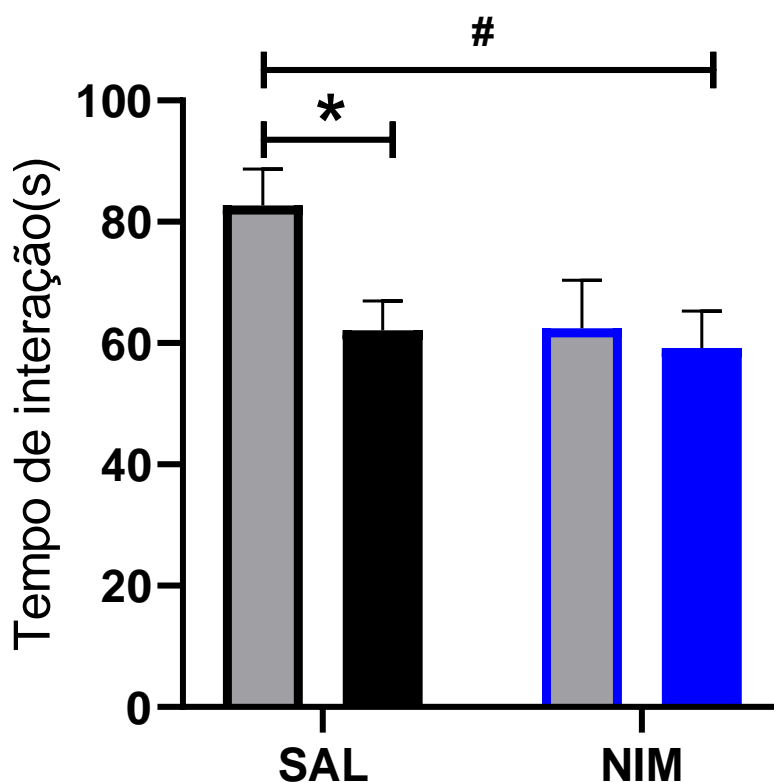
Fonte: do autor.

Nota: (EOF 2h) exploração (s) do objeto familiar de 2h, (EON 2h) exploração (s) do objeto novo de 2h, (IR 2h) índice de reconhecimento dos objetos de 2h, (EOF 24h) exploração (s) do objeto familiar de 24h, (EON 24h) exploração do objeto novo de 24h e (IR 24h) índice de reconhecimento dos objetos de 24h. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*."

6.6.4 Resultados quanto ao teste de interação social.

Como apresentado no gráfico 32 a NIM não foi capaz de prevenir a redução na interação social (s) nos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS $p < 0.05$, e causou a redução da interação entre os filhotes de ratas que receberam SAL $p < 0.05$, quando comparados ao grupo controle. (n=11-28).

Gráfico 32 - Resultados quanto a interação social dos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultado quanto o tempo (s) de interação social entre os filhotes adultos machos de ratas que receberam pré-tratamento com SAL e NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16 (n=11-28 por grupo). Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância * $p < 0.05$ quando comparados entre os grupos LPS e controle, # $p < 0.05$ quando comparado entre o grupo NIM e controle.

Tabela 38 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao teste de interação social.

IS	ANOVA de duas vias	Ômega-quadrado		
	Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 75) = 1,797	NS	0.1841	0,009
Pré-tratamento	F (1, 75) = 3,200	NS	0.0777	0,02
Tratamento	F (1, 75) = 3,373	NS	0.0702	0,02

Nota: Tempo (s) de interação social (IS) entre os filhotes adultos machos de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o “*Ômega-quadrado*”.

Fonte: do autor.

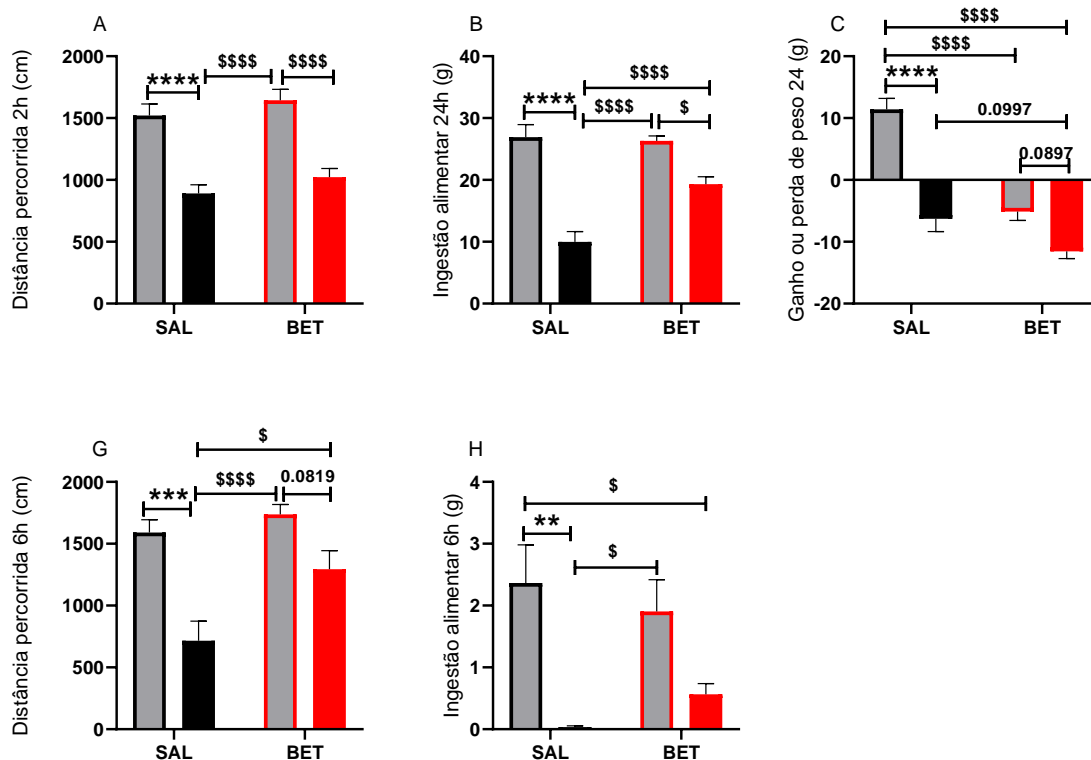
6.7 RESULTADOS DAS RATAS QUE RECEBERAM PRÉ-TRATAMENTO COM SAL OU BET E TRATAMENTO COM LPS OU SAL DURANTE A GESTAÇÃO

6.7.1 Resultados quanto ao desenvolvimento do comportamento doentio

Conforme mostrado no gráfico 33 o BET na dose de 1,3mg/kg foi capaz de prevenir alguns parâmetros do comportamento doentio causado pelo LPS na dose de 500 µg/kg no DG16 nas ratas.

Observamos que o BET não preveniu a baixa mobilidade das ratas tratadas com LPS evidenciado pela menor distância percorrida (cm) no CA durante 5 min 2h $p < 0.0001$ (n=15-34 por grupo) quando comparadas ao grupo que recebeu pré-tratamento com BET e tratamento com SAL, porém foi eficiente em prevenir a baixa mobilidade no teste de CA durante 5 min 6h $p < 0.05$ (n=7-9 por grupo), após receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS quando comparado ao grupo que recebeu tratamento com LPS. Não houve diferença no teste de ingestão alimentar durante 6h (n=7-9 por grupo) após o pré-tratamento com BET e tratamento com LPS em comparação ao grupo LPS. Quanto à ingestão alimentar durante 24h das ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS, observamos que houve um aumento na ingestão alimentar destas ratas em comparação ao grupo LPS $p < 0.0001$ (n=15-29 por grupo). No entanto, os grupos que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS $p < 0.0001$ ou SAL $p < 0.0001$ perderam peso da mesma forma que as ratas que receberam LPS $p < 0.0001$ quando comparados ao grupo controle (n=15-29 por grupo).

Gráfico 33 - Resultado quanto ao desenvolvimento do comportamento doentio das ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto a prevenção do desenvolvimento do comportamento doentio das ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16. A) distância percorrida (cm) durante no teste de CA 2h 5 min (n=15-34 por grupo), B) ingestão alimentar durante 24h (g) (n=15-29 por grupo), C) perda ou ganho de peso durante 24h (g) (n=15-29 por grupo), D) distância percorrida (cm) no teste de CA 6h (n=7-9 por grupo) e E) ingestão alimentar durante 6h (g) (n=7-9 por grupo) das ratas que receberam tratamento no G16 com LPS ou SAL (n=8-34 por grupo). Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 quando comparados entre os grupos LPS e controle, \$p<0.05, \$\$\$p<0.0001 quando comparados entre os grupos BET, e comparados aos grupos LPS e controle.

Tabela 39 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao comportamento doentio das ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

CA 2h				
Variação	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
	F (DFn, DFd)		Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 83) = 0,002767		NS	0.9582
Pré-tratamento	F (1, 83) = 2,281		NS	0.1347
Tratamento	F (1, 83) = 54,49		****	<0.0001
CA 6h				
Variação	F (DFn, DFd)		Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 29) = 3,098		NS	0.0889
Pré-tratamento	F (1, 29) = 8,646		**	0.0064
Tratamento	F (1, 29) = 28,65		****	<0.0001
IA 6h				
Variação	F (DFn, DFd)		Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 29) = 1,390		NS	0.248
Pré-tratamento	F (1, 29) = 0,006628		NS	0.9357
Tratamento	F (1, 29) = 19,00		***	0.0001
IA 24				
Variação	F (DFn, DFd)		Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 79) = 9,033		**	0.0036
Pré-tratamento	F (1, 79) = 7,001		**	0.0098
Tratamento	F (1, 79) = 52,71		****	<0.0001
G/P 24h				
Variação	F (DFn, DFd)		Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 78) = 8,891		**	0.0038
Pré-tratamento	F (1, 78) = 33,20		****	<0.0001
Tratamento	F (1, 78) = 40,51		****	<0.0001

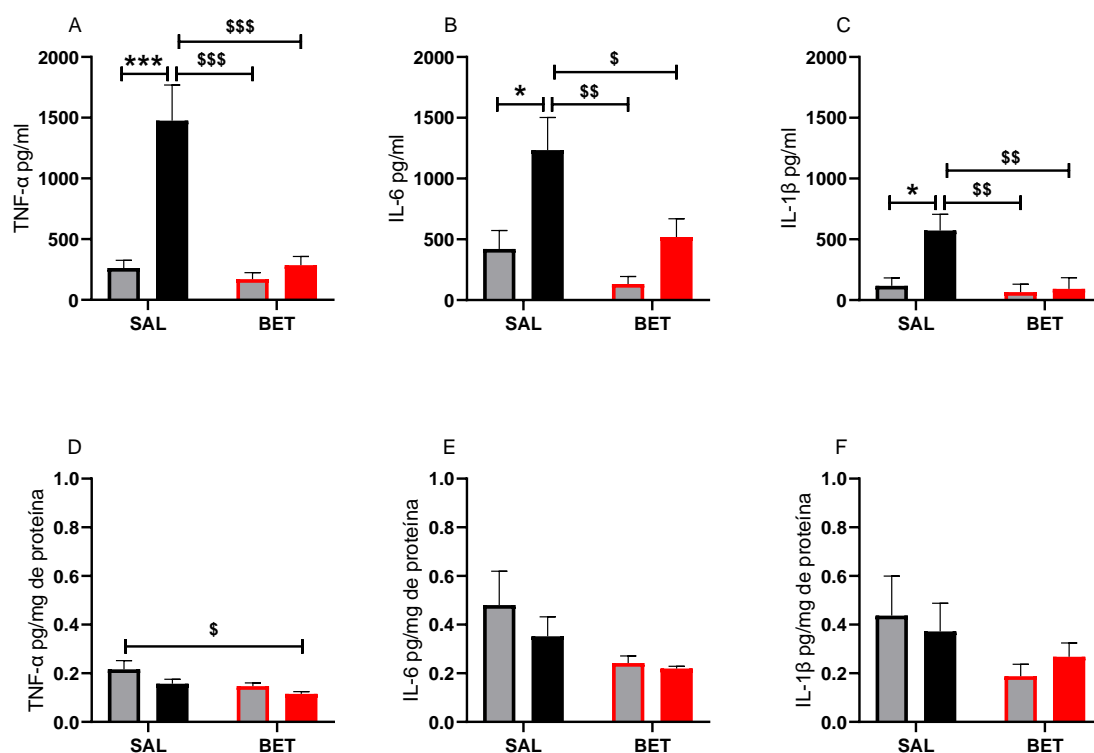
Fonte: do autor.

Nota: (CA 2h) distância percorrida (cm) no teste de campo aberto de 2h durante 5 min (IA 24h), (CA 6h) distância percorrida (cm) no teste de campo aberto de 6h durante 5 min, (IA 6h) ingestão alimentar durante 6h (g), ingestão alimentar durante 24h (g), (P/G 24h) perda ou ganho de peso durante 24h (g). Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

6.7.2 Resultados quanto as concentrações de citocinas no plasma materno, líquido amniótico e cérebro fetal.

Podemos observar no gráfico 34 que a BET foi eficiente em prevenir a elevação das concentrações de citocinas plasmáticas no sangue materno 2h depois receberem pré-tratamento com BET e tratamento com LPS. Observamos que houve uma redução níveis de TNF- α $p < 0.001$, IL-6 $p < 0.05$ e IL-1 β $p < 0.01$ no plasma das ratas 2h após receberem pré-tratamento com BET e tratamento com LPS durante a gestação, quando comparados ao grupo LPS (n=6-8 por grupo). Não houve detecção destas citocinas no líquido amniótico e não houve diferença nas concentrações destas citocinas no cérebro fetal entre os grupos 2h após receberem pré-tratamento e tratamento (n=5-8 por grupo).

Gráfico 34 - Resultados quanto as concentrações de citocinas plasmáticas das ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS no DG16 e do cérebro fetal.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto as concentrações de citocinas plasmáticas A) TNF- α (pg/ml), B) IL-6 (pg/ml) e C) IL-1 β (pg/ml), 2h após as ratas receberem pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16 (n=6-8 por grupo), e do cérebro fetal D) TNF- α (pg/mg de proteína) E) IL-6 (pg/mg de proteína) e F) IL-1 β (pg/mg de proteína) coletados no DG16 2h pós-tratamento com LPS ou SAL (n=5-8 por grupo). Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância *p<0.05, ***p<0.001. Quando comparados entre grupo controle e LPS, \$p<0.05, \$\$p<0.01, \$\$\$p<0.001. Quando comparados entre os grupos BET, os grupos LPS e controle.

Tabela 40 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos níveis de citocinas no plasma e cérebro fetal 2h após as ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

(Continua)

ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado		
TNF-α Plasma materno				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 25) = 10,09	**	0.0039	0.13
Pré-tratamento	F (1, 25) = 13,71	**	0.0011	0.18
Tratamento	F (1, 25) = 14,73	***	0.0008	0.20
IL-6 Plasma materno				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 24) = 1,413	NS	0.2462	0.009
Pré-tratamento	F (1, 24) = 7,817	*	0.01	0.15
Tratamento	F (1, 24) = 11,14	**	0.0028	0.22
IL-1β Plasma materno				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 25) = 4,693	*	0.04	0.08
Pré-tratamento	F (1, 25) = 7,320	*	0.0121	0.13
Tratamento	F (1, 25) = 5,971	*	0.0219	0.10
ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado		
TNF-α Cérebro fetal				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 23) = 0,3814	NS	0.5429	0.01
Pré-tratamento	F (1, 23) = 5,984	*	0.0225	0.14
Tratamento	F (1, 23) = 4,001	NS	0.0574	0.08
IL-6 Cérebro fetal				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 23) = 0,3879	NS	0.5395	0.02
Pré-tratamento	F (1, 23) = 4,734	*	0.0401	0.12
Tratamento	F (1, 23) = 0,7861	NS	0.3844	0.007

Tabela 40 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos níveis de citocinas no plasma e cérebro fetal 2h após as ratas que receberem pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

(Conclusão)

IL-1β Cérebro fetal				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 23) = 0,4198	NS	0.5234	0.02
Pré-tratamento	F (1, 23) = 2,498	NS	0.1277	0.05
Tratamento	F (1, 23) = 0,00423	NS	0.9487	0.03

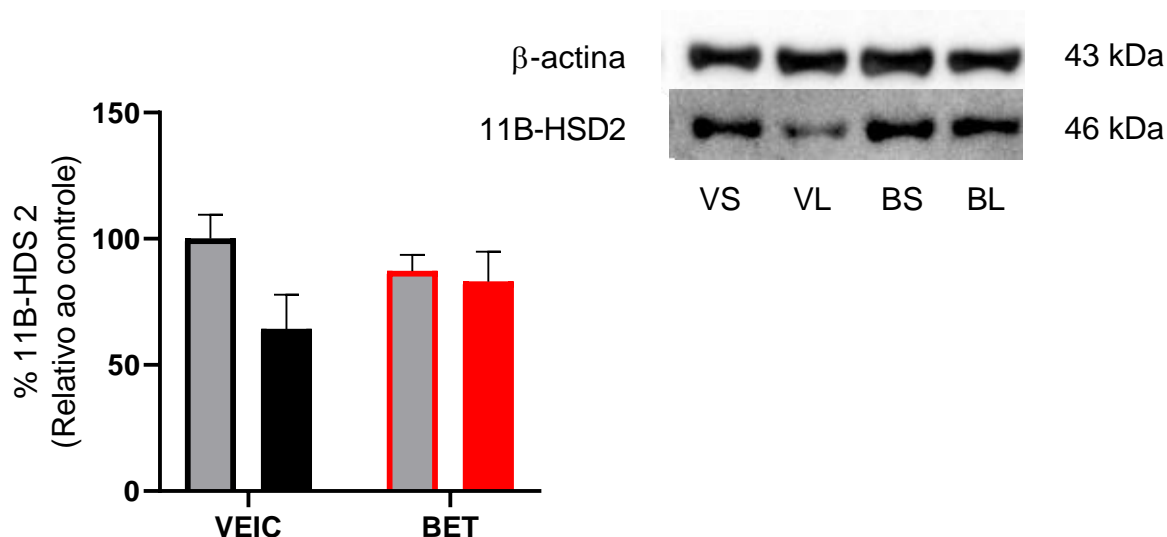
Fonte: do autor.

Nota: Valores de TNF- α , IL-6 e IL-1 β no plasma e no cérebro fetal 2h após o pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com SAL ou LPS. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

6.7.3 Resultado quanto a quantificação da enzima 11- β hidroxisteroide desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD-2) na placenta de ratas 6h após receberem pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com SAL ou LPS.

Podemos observar no gráfico 35 que o não houve diferença entre os grupos pré-tratados e tratados quanto da concentração da enzima 11 β -HSD-2 (n=5-4) na placenta das ratas após 6h.

Gráfico 35 - Quantificação da enzima 11 β -HSD-2 na placenta 6h após o pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com SAL ou LPS.



Fonte: do autor.

Nota: Resultado quanto a concentração da enzima 11 β -HSD-2 na placenta 6h após as ratas receberam tratamento com LPS ou SAL no DG16. Dados expressos em média \pm EPM onde $p=0.0735$. Quando comparados ao grupo controle.

Tabela 41 - Análise através da ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto a quantificação da enzima 11 β -HSD-2 na placenta 6h após o pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com SAL ou LPS.

11 β -HSD-2	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 17) = 2,267	NS	0.1505	0.05
Pré-tratamento	F (1, 17) = 0,0826	NS	0.7772	0.003
Tratamento	F (1, 17) = 3,640	NS	0.0735	0.11

Fonte: do autor.

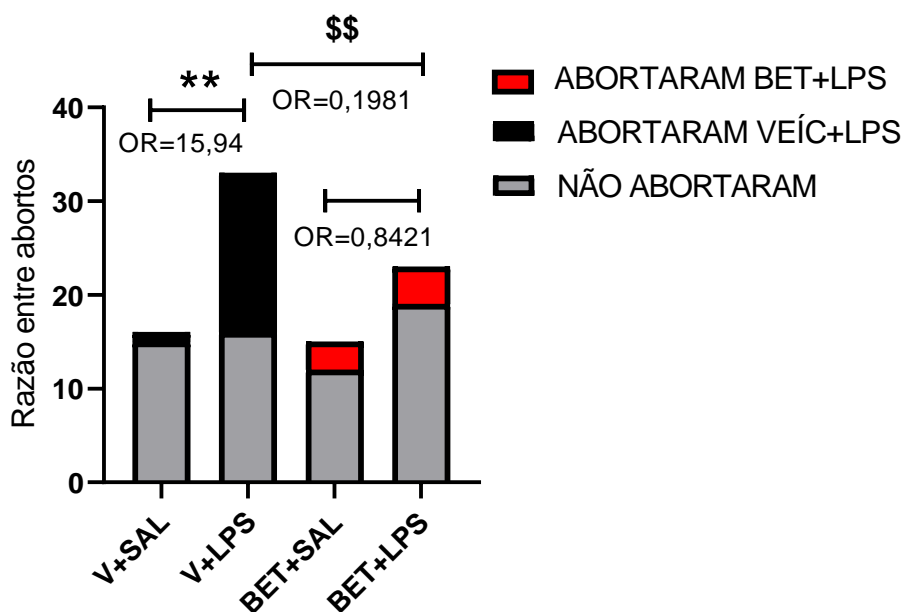
Nota: Quantificação da concentração da enzima 11 β -HSD-2 na placenta 6h após as ratas receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com SAL ou LPS no DG16. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

6.7.4 Resultado quanto as ratas que receberam pré-tratamento SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL e abortaram ou não.

Conforme demonstrado no gráfico 36, dentro dos grupos foi observado que as ratas que receberam BET+LPS no DG16 abortaram da mesma maneira que as ratas que receberam BET+SAL. Em contrapartida as ratas que receberam BET+LPS abortaram menos quando comparadas as ratas que receberam V+LPS.

Dentre as ratas prenhas o número de abortos do grupo que recebeu BET+LPS no DG16 $4/19=17,39\%$ $n=23$ quando comparado ao grupo BET+SAL $3/12=20\%$ $n=15$. Sendo esta, a relação das ratas que sofreram abortos ou não, e observamos que as ratas que receberam BET+LPS tiveram as mesmas chances de abortarem do que as ratas NIM+SAL, evidenciado pelo ODDS RATIO (OR=0,8421). Porém, as ratas que receberam BET+LPS tiveram menos chances de abortar que as ratas que receberam V+LPS conforme evidenciado pelo OR=0,1981.

Gráfico 36 - Resultado a razão quanto ao número de aborto ou não abortos causados pelo pré-tratamento com V ou BET e tratamento com LPS ou SAL.



Fonte: do autor.

Nota: Resultado quanto a razão do número de abortos ou não abortos causados pelo pré-tratamento com Veículo (V) ou BET e tratamento com LPS ou SAL. Dados expressos em valores absolutos de contingência. Os símbolos representam significância ** $p < 0.01$; \$\$ $p < 0.01$ e ODDS RATION (OR) é a chance de um evento ocorrer.

Tabela 42 - Análise dos dados de Qui-quadrado das ratas que abortaram ou não.

	BET+V	BET+LPS			
Abortos	3	4			
Não abortos	12	19			
Qui-quadrado	Valor de p		Odds Ratio	95% IC	
$\chi^2=0.04111,1$ $z=0.2028$	NS	0.8393	OD=0,8421	0,1978 to 3,822	

	V+LPS	BET+LPS			
Abortos	17	4			
Não abortos	16	19			
Qui-quadrado	Valor de p		Odds Ratio	95% IC	
$\chi^2=6,734, 1$ $z=2.595$	**	0.0095	OD=0,7964	0,2817 to 2,180	

Fonte: do autor.

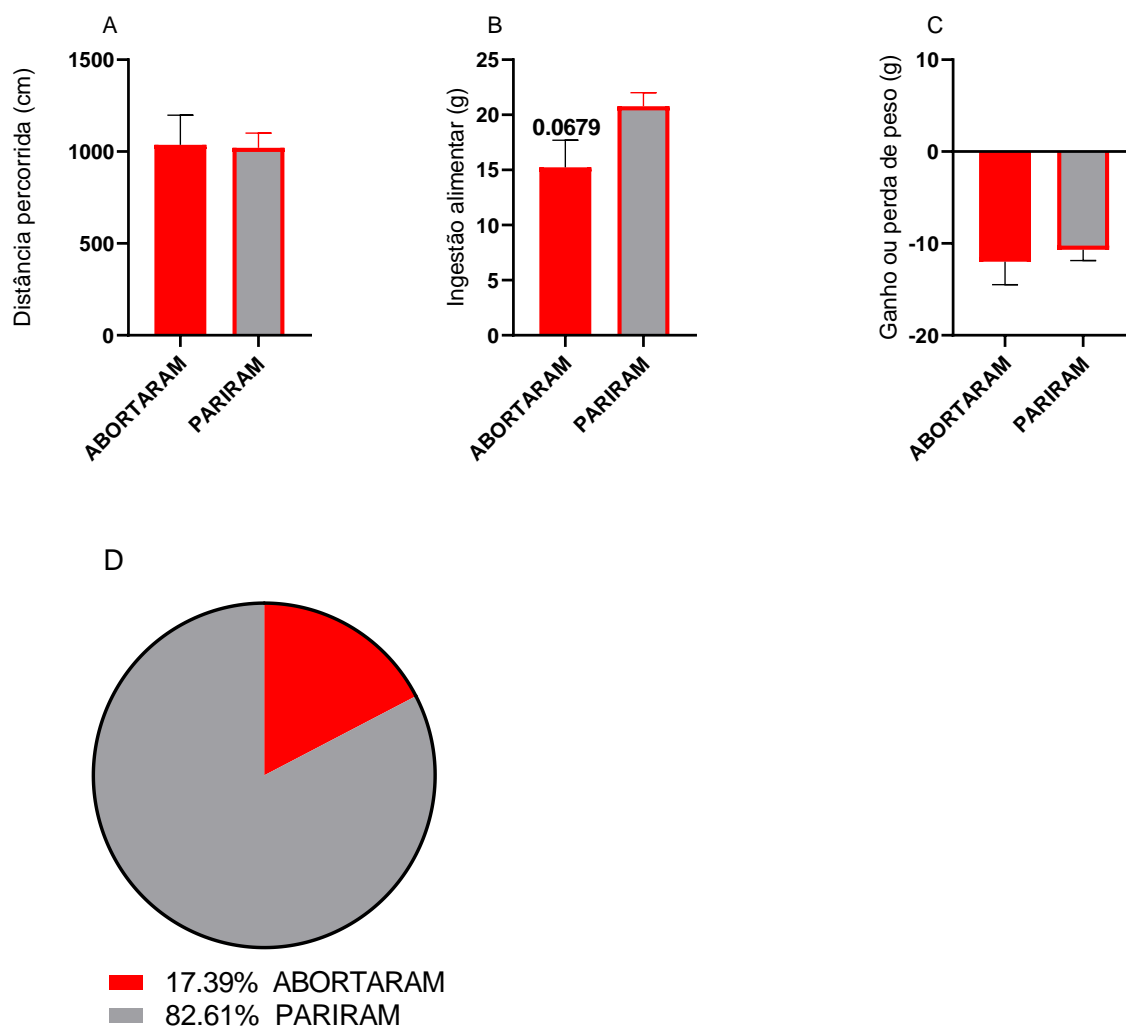
Nota: Valores de Qui-quadrado (χ^2), valores de p mostrando a significância, valores de odds ratio (OR) que é a chance de um evento ocorrer e intervalo de confiança (IC).

6.7.5 Resultado quanto as ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL durante a gestação e abortaram

Como apresentado no gráfico 37 dentro do grupo das ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS durante a gestação e desenvolveram comportamento doentio, foi observado que algumas ratas abortaram pós-tratamentos.

Observamos que do total de ratas pré-tratadas com BET e tratadas com LPS durante a gestação (n=23) que 17,39% (n=4) abortaram e 82,61% (n=19) levaram a prenhez a termo. Não houve diferença quanto a distância percorrida (cm) no teste de CA 2h depois de receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS. No entanto, as ratas que abortaram tenderam a ingerir menor quantidade de alimento durante 24h $p<0.0679$ e perderam peso em 24h de forma similar em comparação as ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS e não abortaram.

Gráfico 37 - Resultados quanto aos abortos causados pelo LPS de ratas pré-tratadas com BET.



Fonte: do autor.

Nota: Resultado quanto aos abortos causados pelo LPS nas ratas que receberam pré-tratamento com BET, A) distância percorrida (cm) pelas ratas que sofreram ou não aborto no campo aberto 2h após receberem pré-tratamento com BET e tratamento com LPS, B) ingestão alimentar (g) das ratas que sofreram ou não aborto, 24h após receberem pré-tratamento com BET e tratamento com LPS, C) perda de peso (g) das ratas que sofreram ou não aborto, 24h após receberem pré-tratamento com BET e tratamento com LPS e D) percentual de abortos das ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS (n=23 animais). Dados expressos em média \pm EPM.

Tabela 43 - Análise através do teste t de student das médias dos valores e do tamanho do efeito através do teste d de Cohen quanto ao comportamento doentio das ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS no DG16 e abortaram ou não.

	Abortos		Paridas		teste t		d de Cohen	
	Média	EPM	Média	EPM	Valor de p	d	Número	
CA 2h	1036	161,2	1020	80,03	NS	0.9327	0.05	n=4-19
IA 24h	15,24	2,456	20,79	1,215	NS	0.0679	1.09	n=4-19
P/G (g)	-12	2,483	-10,68	1,182	NS	0.6457	0.26	n=4-19
Ratas que abortaram			%	17.4				
Ratas que pariram			%	82.6				

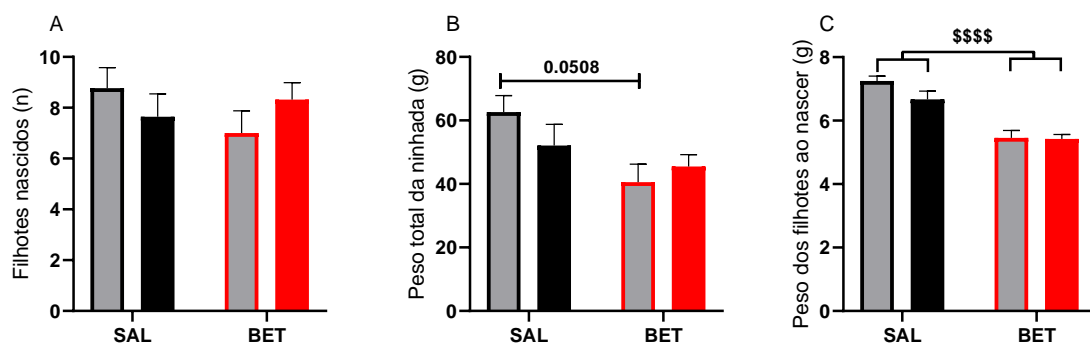
Fonte: do autor.

Nota: (CA 2h) distância percorrida (cm) no teste de campo aberto 2h durante 5 min (IA 24h), ingestão alimentar durante 24h (g), (P/G) perda ou ganho de peso durante 24h (g), e % de ratas que abortaram ou não. Valor de d referente ao teste d de Cohen sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($d < 0.2$), pequeno ($0.2 \leq d < 0.5$), moderado ($0.5 \leq d < 0.8$), grande ($0.8 \leq d < 1.2$), e muito grande ($1.2 \leq d < 2.0$).

6.7.4 Resultados quanto ao nascimento da prole de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

Como apresentado no gráfico 38 observamos que as ninhadas das ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com SAL tenderam a nascer mais leves em comparação a ninhada de ratas que receberam SAL $p=0.0508$. O peso dos filhotes das ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou SAL nasceram menores que os filhotes SAL $p<0.0001$ e LPS $p<0.0001$. Não houve diferença entre os grupos pré-tratados e tratados quanto ao número de filhotes nascidos ($n=13-22$ por grupo).

Gráfico 38 - Resultados quanto as ninhadas das ratas pré-tratadas com SAL ou BET e tratadas com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados das ninhadas quanto ao: A) número de filhotes que nasceram, B) peso total da ninhada (g) no DPN1 e C) peso do filhote (g) no DPN1, de filhotes machos e fêmeas de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16 (n=13-22 por grupo). Dados expressos em média ± EPM. O símbolo representa significância $p < 0.05$ quando comparado entre o grupo NIM e LPS.

Tabela 44 - Análise através do ANOVA duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao nascimento da prole de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

NFN				
	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 62) = 2,178	NS	0.145	0.01
Pré-tratamento	F (1, 62) = 0,4411	NS	0.5091	0.008
Tratamento	F (1, 62) = 0,01405	NS	0.906	0.01
PTN				
	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 61) = 2,031	NS	0.1592	0.01
Pré-tratamento	F (1, 61) = 6,987	*	0.0104	0.08
Tratamento	F (1, 61) = 0,2725	NS	0.6036	0.01
PFN				
	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 61) = 1,841	NS	0.1799	0.006
Pré-tratamento	F (1, 61) = 55,73	****	<0.0001	0.45
Tratamento	F (1, 61) = 2,252	NS	0.1386	0.01

Fonte: do autor.

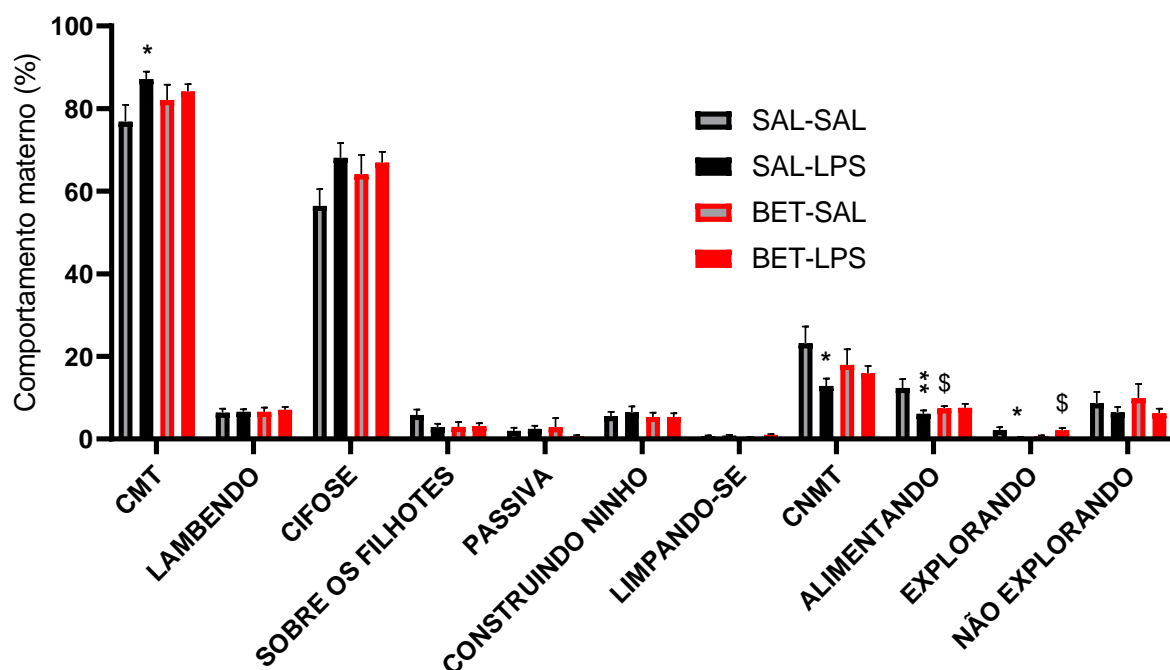
Nota: (NFN) número de filhotes que nasceram, (PTN) peso total da ninhada (g) no DPN1 e (PFN) peso do filhote (g) no DPN1. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

6.7.6 Resultados quanto aos cuidados maternos

O gráfico 39 mostra o percentual de tempo gasto cuidando dos filhotes das ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL. Observamos que não houve diferença entre os grupos pré-tratados com BET e tratados com LPS em relação ao grupo LPS no cuidado geral da prole no CMT. Não houve diferença entre os parâmetros, maternos de, "lambendo os filhotes," "em cifose alimentando os filhotes", "sobre os filhotes não alimentando", "em posição passiva alimentando os filhotes", "construindo o ninho" e "limpando-se", e da mesma forma no comportamento na materno geral da prole CNMT, e pelos parâmetros não maternos

“alimentando-se” e “fora do ninho não explorando” em comparação ao grupo LPS. O parâmetro não materno “explorando fora do ninho” aumentou em comparação ao grupo LPS $p < 0.01$ ($n = 9-18$).

Gráfico 39 - Resultados quanto aos cuidados maternos e não maternos de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou SAL durante a prenhez.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto ao % de tempo gasto com cuidados maternos e não maternos com a prole nos PND2, 3 e 4 das ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16. Parâmetros maternos: Comportamento materno total (CMT), “lambendo” os filhotes, em “cifose” amamentado, “sobre os filhotes” não amamentando, em posição “passiva”, “construindo o ninho” e “limpando-se”. Parâmetros não-maternos: Comportamento não materno total (CNMT), “alimentando”, “explorando fora do ninho” e fora do ninho “não explorando” ($n = 9-18$ por grupo). Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ quando comparados entre o grupo LPS e controle, \$ $p < 0.05$ quando comparado entre os grupos BET.

Tabela 45 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos cuidados maternos pós-nascimento da prole de ratas que receberam tratamento pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

(Continua)

CMT	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 50) = 2,240	NS	0.1408	0.02
Pré-tratamento	F (1, 50) = 0,1500	NS	0.7001	0.01
Tratamento	F (1, 50) = 5,023	*	0.0295	0.06
Lamb				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 50) = 0,01737	NS	0.8957	0.01
Pré-tratamento	F (1, 50) = 0,2001	NS	0.6565	0.01
Tratamento	F (1, 50) = 0,1505	NS	0.6997	0.01
Cif				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 50) = 1,451	NS	0.234	0.007
Pré-tratamento	F (1, 50) = 0,7712	NS	0.384	0.003
Tratamento	F (1, 50) = 3,916	NS	0.0533	0.05
Sob				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 50) = 2,679	NS	0.108	0.02
Pré-tratamento	F (1, 50) = 1,863	NS	0.1784	0.01
Tratamento	F (1, 50) = 2,004	NS	0.1631	0.01
Pass				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 50) = 1,864	NS	0.1782	0.01
Pré-tratamento	F (1, 50) = 0,2392	NS	0.6269	0.01
Tratamento	F (1, 50) = 0,8046	NS	0.374	0.003

Tabela 45 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos cuidados maternos pós-nascimento da prole de ratas que receberam tratamento pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

(Continuação)

CN				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 50) = 0,1239	NS	0.7264	0.01
Pré-tratamento	F (1, 50) = 0,3159	NS	0.5766	0.01
Tratamento	F (1, 50) = 0,1636	NS	0.6876	0.01
Limp				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 50) = 1,758	NS	0.1909	0.01
Pré-tratamento	F (1, 50) = 0,0509	NS	0.8224	0.01
Tratamento	F (1, 50) = 3,679	NS	0.0608	0.04
CNMT				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 50) = 2,240	NS	0.1408	0.02
Pré-tratamento	F (1, 50) = 0,1500	NS	0.7001	0.01
Tratamento	F (1, 50) = 5,023	*	0.0295	0.06
Alim				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 50) = 6,147	*	0.0166	0.07
Pré-tratamento	F (1, 50) = 1,890	NS	0.1753	0.01
Tratamento	F (1, 50) = 5,680	*	0.021	0.07
EFN				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 50) = 10,60	**	0.002	0.14
Pré-tratamento	F (1, 50) = 0,0909	NS	0.7643	0.01
Tratamento	F (1, 50) = 0,2060	NS	0.6519	0.01

Tabela 45 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos cuidados maternos pós-nascimento da prole de ratas que receberam tratamento pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

(Conclusão)

FNNE				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 50) = 0,1142	NS	0.7368	0.01
Pré-tratamento	F (1, 50) = 0,0715	NS	0.7902	0.01
Tratamento	F (1, 50) = 2,118	NS	0.1518	0.02

Fonte: do autor.

Nota: Parâmetros maternos: (CMT) Comportamento materno total, (Lamb) "lambendo" os filhotes, (Cif) em "cifose" amamentado, (Sob) "sobre os filhotes" não amamentando, (Pass) em posição "passiva", (CN) "construindo o ninho" e (Limp) "limpando-se". Parâmetros não-maternos: (CNMT) comportamento não materno total, (Alim) "alimentando", (EFN) "explorando fora do ninho" e (FNNE) fora do ninho "não explorando". Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

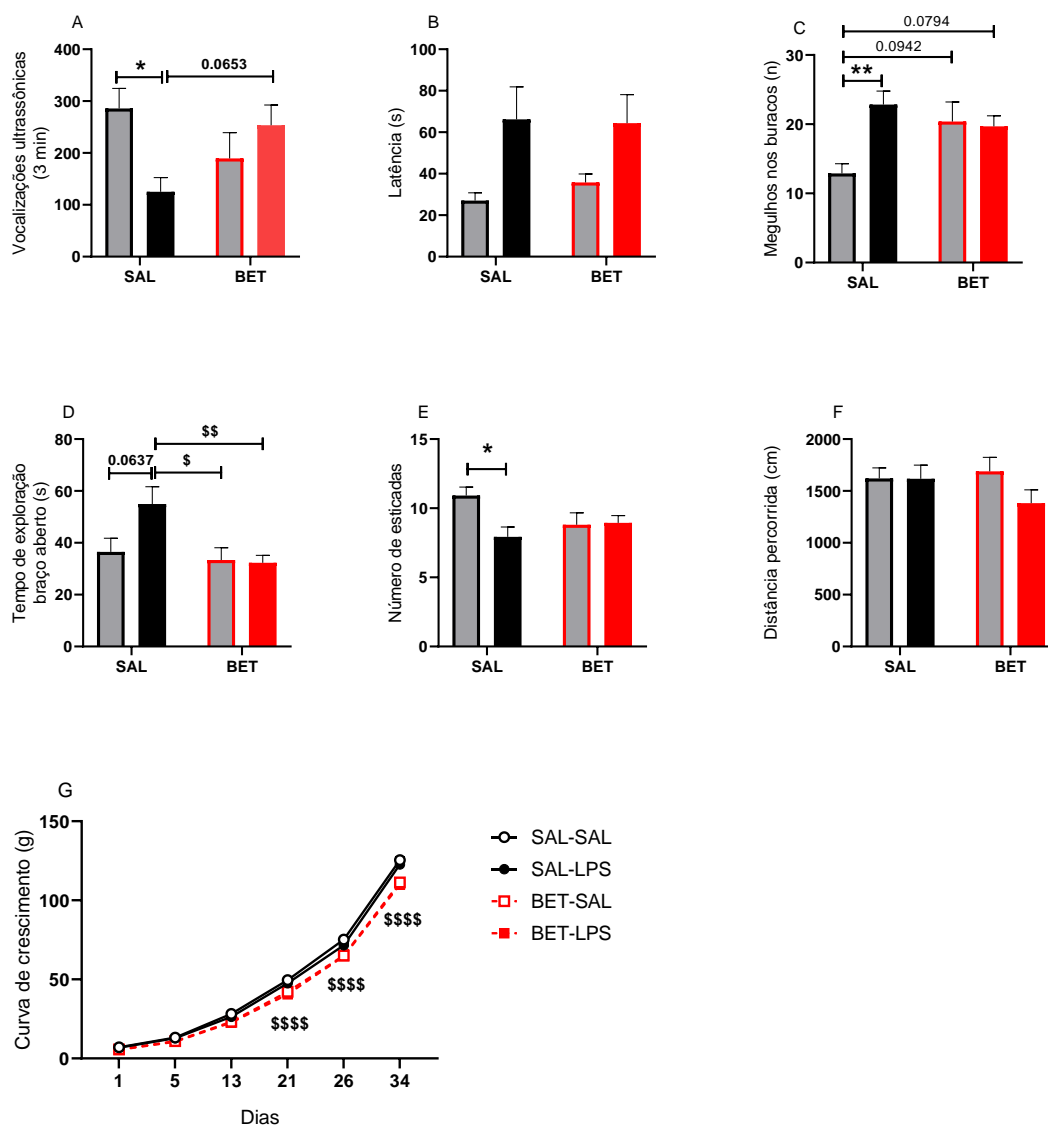
6.8 RESULTADOS QUANTO O COMPORTAMENTO DOS FILHOTES NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA

Conforme apresentado no gráfico 40 o pré-tratamento com BET durante a gestação preveniu alguns comportamentos tipo-autista, e prejudicou outros da mesma maneira que os induzidos pelo LPS aplicado durante a gestação, em comparação ao grupo LPS.

Podemos observar no gráfico 40 que os filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS tendeu a prevenir a redução nas emissões de vocalizações ultrassônicas $p=0.0653$ ($n=10-17$ por grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos quanto latência para alcançar a porção com a maravalha proveniente do ninho materno no teste de *homing* ($n=9-17$ por grupo). Já no teste de tábua de buracos observamos uma tendência ao aumento do comportamento repetitivo demonstrado pelo aumento no número de mergulhos com a cabeça nos buracos pelos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS $p=0.0794$ ou SAL $p=0.0942$ ($n=10-26$ por grupo), prejudicando o

comportamento tipo-repetitivo quando comparado ao grupo SAL. Houve diferença entre os grupos quanto a de avaliação de risco no teste de labirinto em cruz elevado. Os filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS $p < 0.01$ ou SAL $p < 0.05$ ($n=10-17$), reduziram o tempo de exploração no braço aberto do labirinto em cruz elevado quando comparado ao grupo LPS, porém não houve aumento do comportamento de esticar o corpo para avaliar a entrada nos braços abertos. Não houve diferença na mobilidade entre os grupos conforme mostrado pela distância percorrida (cm) no CA durante 5 min ($n=9-24$ por grupo). Além dos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS $p < 0.0001$ ou SAL $p < 0.0001$, ganharam menos peso durante o crescimento em comparação ao grupo controle ($n=7-15$ por grupo).

Gráfico 40 - Resultados quanto o comportamento dos filhotes machos durante a infância e adolescência, filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou LPS no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultado quanto ao comportamento dos filhotes machos de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16. A) quanto ao: número de vocalizações ultrassônicas durante 3 min no DPN5, B) latência (s) para entrada na porção com maravalha do ninho no teste de *homing* no DPN13, C) número de mergulhos no teste de tábua de buracos no DPN26, D) tempo gasto (s), e E) número de esticadas para entrada nos braços abertos no teste de labirinto em cruz elevado no DPN28, F) distância percorrida (cm) no campo aberto no DPN34 e G) curva de crescimento (g) dos filhotes pesados nos DPN1, 5, 13, 21, 26 e 34. (n=26-17 animais por grupo). Dados expressos em média ± EPM. Os símbolos representam significância *p<0.05, **p<0.01 quando comparados entre o grupo e controle, \$p<0.05, \$\$p<0.01, \$\$\$p<0.0001 quando comparados entre os grupos BET e grupos SAL e LPS.

Tabela 46 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao comportamento dos filhotes na infância e adolescência, de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

(Continua)

Vus	ANOVA de duas vias	Ômega-quadrado		
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 47) = 8,215	**	0.0062	0.12
Pré-tratamento	F (1, 47) = 0,1658	NS	0.6857	0.01
Tratamento	F (1, 47) = 1,513	NS	0.2249	0.008
Homing				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 47) = 0,1611	NS	0.6899	0.01
Pré-tratamento	F (1, 47) = 0,07003	NS	0.7925	0.01
Tratamento	F (1, 47) = 6,626	*	0.0133	0.10
TB				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 62) = 6,868	*	0.011	0.07
Pré-tratamento	F (1, 62) = 1,157	NS	0.2863	0.001
Tratamento	F (1, 62) = 5,156	*	0.0267	0.05
Est LEC				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 49) = 5,259	*	0.0262	0.07
Pré-tratamento	F (1, 49) = 0,6683	NS	0.4176	0.005
Tratamento	F (1, 49) = 4,373	*	0.0417	0.05
LEC				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 50) = 3,564	NS	0.0648	0.03
Pré-tratamento	F (1, 50) = 6,225	*	0.0159	0.08
Tratamento	F (1, 50) = 2,797	NS	0.1007	0.02

Tabela 46 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao comportamento dos filhotes na infância e adolescência, de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

(Conclusão)				
CA				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 63) = 1,177	NS	0.2822	0.002
Pré-tratamento	F (1, 63) = 0,3551	NS	0.5534	0.009
Tratamento	F (1, 63) = 1,231	NS	0.2713	0.003

Fonte: do autor.

Nota: (Vus) Vocalizações ultrassônicas durante 3 min no DPN5, *homing* no DPN13 (TB) tábua de buracos no DPN26, (LEC) labirinto em cruz elevado no DPN28, (CA) distância percorrida (cm) no campo aberto no DPN34. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*."

Tabela 47 - Análise através do ANOVA de três vias vias dos valores quanto ao crescimento dos filhotes na infância e adolescência, de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.

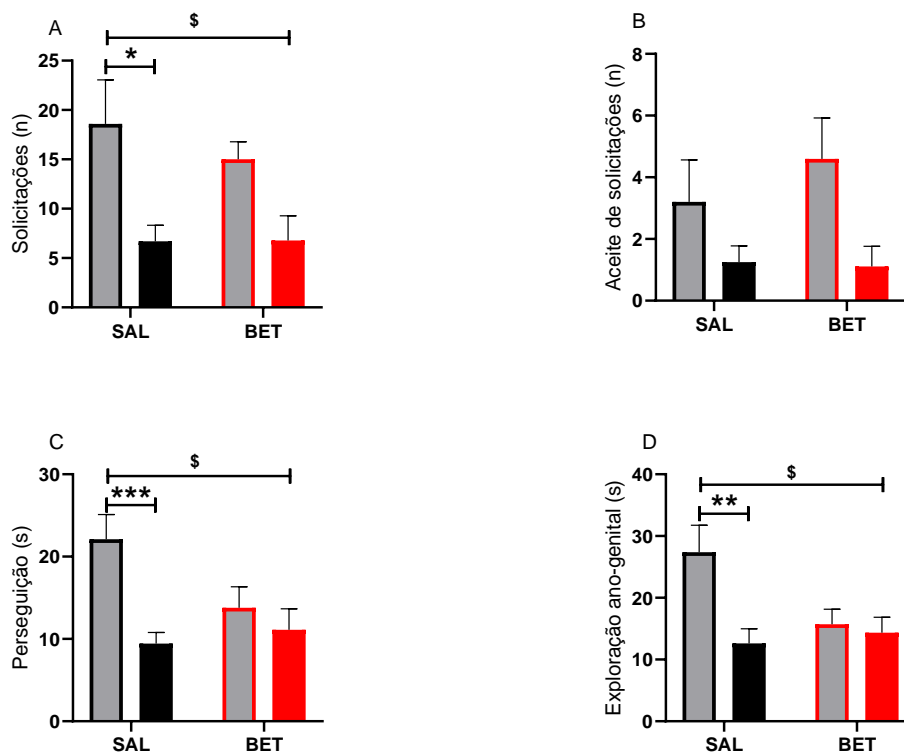
Curva de crescimento			
Tabela ANOVA de 3 vias	F (DFn, DFd)	Valor de p	
Tempo (dias)	F (5, 266) = 4670	****	<0.0001
(SAL vs BET)	F (1, 266) = 151,1	****	<0.0001
(SAL vs LPS)	F (1, 266) = 6,591	*	0.0108
Tempo (dias)x(SAL vs BET)	F (5, 266) = 13,55	****	<0.0001
Tempo (dias)x(SAL vs LPS)	F (5, 266) = 0,4569	NS	0.8081
(SAL vs BET)x(SAL vs LPS)	F (1, 266) = 1,168	NS	0.2808
Tempo (dias)x(SAL vs BET)x(SAL vs LPS)	F (5, 266) = 0,2670	NS	0.9309

Fonte: do autor.

Nota: Curva de crescimento dos filhotes machos avaliadas nos DPN1, 5, 13, 21, 26 e 34 Valor de p referente a ANOVA de três vias.

Conforme demonstrado no gráfico 41 a BET não foi eficiente em prevenir a redução na interação entre os filhotes durante os 10 min no teste de comportamento de brincar de ratas que receberam tratamento com LPS durante a gestação. Observamos que os filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS reduziram a interação da mesma maneira que o grupo LPS. Esta diferença foi evidente entre os grupos pré-tratados com BET e tratados com LPS quanto aos comportamentos de “solicitar” as brincadeiras $p < 0.05$, “perseguir” $p < 0.05$ e “explorar” o oponente $p < 0.05$, quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença entre os grupos quanto ao comportamento de “aceitar” as brincadeiras ($n = 5-16$ por grupo).

Gráfico 41 - Resultados quanto ao comportamento de brincar dos filhotes machos de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Parâmetros observados durante o teste de comportamento de brincar no DPN33 dos filhotes machos de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16. (n=5-16 por grupo) quanto ao: A) número de vezes que o filhote "solicitou as brincadeiras", B) número de vezes que o filhote "aceitou as brincadeiras", C) tempo (s) que o filhote "perseguiu" o oponente e D) tempo (s) que o filhote "explorou" o oponente. Dados em média ± EPM. Os símbolos representam significância *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 quando comparados entre o grupo LPS e controle, \$p<0.05 quando comparado entre o grupo NIM e controle.

Tabela 48 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto aos parâmetros no comportamento de brincar dos filhotes durante a adolescência, de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS

Solic	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 36) = 0,3517	NS	0.5569	0.01
Pré-tratamento	F (1, 36) = 0,3181	NS	0.5762	0.01
Tratamento	F (1, 36) = 10,47	**	0.0026	0.18

AS				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 36) = 0,5987	NS	0.4441	0.008
Pré-tratamento	F (1, 36) = 0,4020	NS	0.53	0.01
Tratamento	F (1, 36) = 7,478	**	0.0096	0.14

Pers				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 35) = 5,750	*	0.022	0.06
Pré-tratamento	F (1, 35) = 4,289	*	0.0458	0.04
Tratamento	F (1, 35) = 16,50	***	0.0003	0.22

Expl				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 36) = 3,753	NS	0.0606	0.05
Pré-tratamento	F (1, 36) = 2,069	NS	0.159	0.02
Tratamento	F (1, 36) = 5,432	*	0.0255	0.08

Fonte: do autor.

Nota: (Solic) número de vezes que o filhote “solicitou as brincadeiras”, (AS) número de vezes que o filhote “aceitou as solicitações de brincadeiras”, (Pers) tempo (s) que o filhote “perseguiu” o oponente e (Expl) tempo (s) que o filhote “explorou” o oponente. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o “*Ômega-quadrado*”.

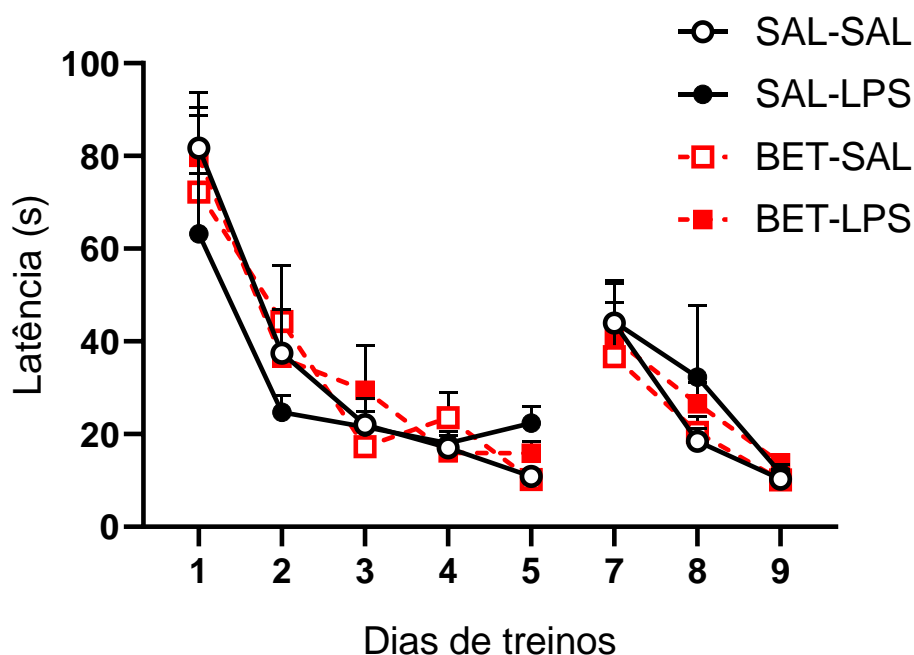
6.9 RESULTADOS QUANTO O COMPORTAMENTO DOS FILHOTES DURANTE A VIDA ADULTA

6.9.1 Resultados quanto a memória espacial verificada pelo teste de Barnes

6.9.1.1 Resultado quanto a aquisição e reversão do aprendizado durante os treinos

O gráfico 42 mostra a evolução da aquisição de memória nos 5 primeiros dias treinos (dias 1 – 5), e nos 3 dias posteriores do teste de memória (dias 7 – 9) a reversão da memória de aprendizado. A evolução do aprendizado é evidenciada pela redução da latência para entrada no buraco onde está a caixa destino. Podemos observar o pré-tratados e tratados não alteraram ao aprendizado espacial do filhote, demonstrando que, ambos os grupos aprenderam de forma semelhante onde estava a caixa destino, não havendo assim diferença significativa entre os grupos durante a aquisição da memória e da reversão da memória (n=5-12 por grupo).

Gráfico 42 - Resultados quanto a aprendizado durante os treinos no teste de Barnes de filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Curva de aprendizado para entrada no buraco com a caixa destino dos filhotes machos durante a vida adulta, filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16 (n=5-12 por grupo). O gráfico mostra a latência para entrada no buraco com a caixa destino durante os dias de treino de aprendizado (dias 1, 2, 3, 4 e 5) e reversão do aprendizado (dias 7, 8 e 9). Dados em média \pm EPM.

Tabela 49 - Análise através do ANOVA de três vias quanto a aquisição e reversão do aprendizado durante os treinos.

Treinos de Barnes (aprendizado)		
Tabela ANOVA de 3 vias	F (DFn, DFd)	Valor de p
Tempo (dias)	F (4, 185) = 37,84	**** <0.0001
(SAL vs BET)	F (1, 185) = 0,00274	NS 0.9583
(SAL vs LPS)	F (1, 185) = 0,3863	NS 0.535
Tempo (dias)x(SAL vs BET)	F (4, 185) = 0,1090	NS 0.9793
Tempo (dias)x(SAL vs LPS)	F (4, 185) = 1,039	NS 0.3883
(SAL vs BET)x(SAL vs LPS)	F (1, 185) = 0,9354	NS 0.3347
Tempo (dias)x(SAL vs BET)x(SAL vs LPS)	F (4, 185) = 1,058	NS 0.3787
Treinos de Barnes (reversão do aprendizado)		
Tabela ANOVA de 3 vias	F (DFn, DFd)	Valor de p
Tempo (dias)	F (2, 108) = 31,02	**** <0.0001
(SAL vs BET)	F (1, 108) = 0,1323	NS 0.7167
(SAL vs LPS)	F (1, 108) = 0,05192	NS 0.8202
Tempo (dias)x(SAL vs BET)	F (2, 108) = 0,2475	NS 0.7812
Tempo (dias)x(SAL vs LPS)	F (2, 108) = 0,5493	NS 0.579
(SAL vs BET)x(SAL vs LPS)	F (1, 108) = 0,06040	NS 0.8063
Tempo (dias)x(SAL vs BET)x(SAL vs LPS)	F (2, 108) = 0,1449	NS 0.8652

Fonte: do autor.

Nota: Aprendizado durante o teste de Barnes durante os dias 1 – 5 e reversão do aprendizado durante os dias 7 – 9. Valor de p referente a ANOVA de três vias.

6.9.1.2 Resultados quanto ao aprendizado da localização da caixa destino.

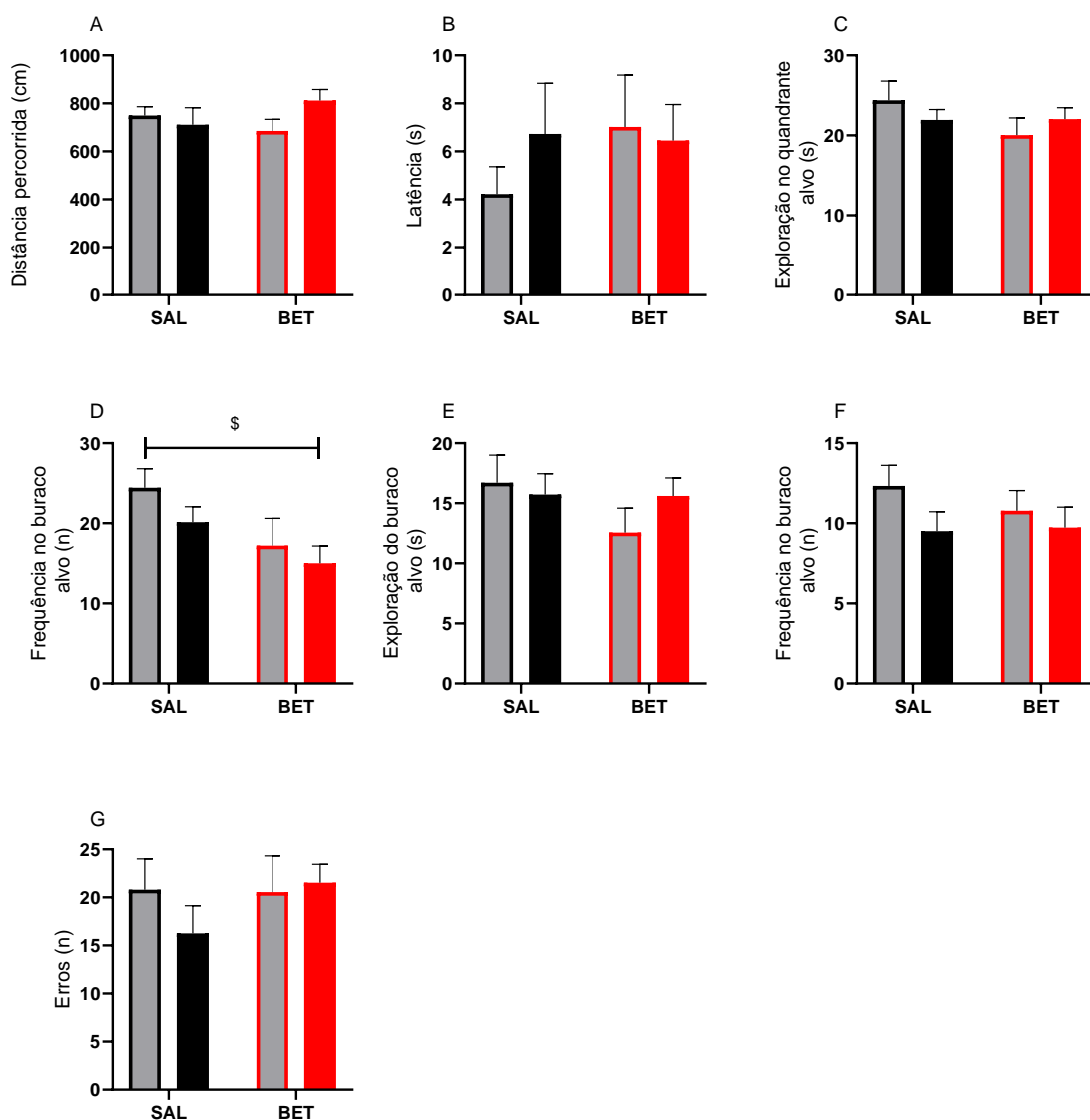
O gráfico 43 apresenta os parâmetros observados no 6º dia durante o teste de aprendizado quanto a localização da caixa.

Observamos que não houve diferença quanto a memória espacial de aprendizado dos filhotes adultos dos grupos pré-tratados e tratados.

Não houve diferença quanto a distância percorrida no aparato, latência para chegada ao buraco alvo, o tempo de exploração do quadrante onde está localizado o buraco alvo, a frequência de exploração dos buracos deste quadrante, o tempo de exploração do buraco alvo e o número de vezes que exploram os buracos errados no dia do teste entre os grupos durante o 1 min e 30 seg de teste, com exceção da

frequência de exploração do buraco alvo que foi menor no grupo que recebeu BET e LPS $p < 0.05$, ($n = 7-16$ por grupo).

Gráfico 43 - Resultados dos parâmetros avaliados no teste de aprendizado no dia 6 no teste de Barnes pelos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Parâmetros avaliados no dia do teste de aprendizado (dia 6) no teste de Barnes dos filhotes machos durante a vida adulta filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16 ($n = 5-12$ por grupo) quanto a: A) distância percorrida (cm), B) latência para exploração do buraco alvo, C) exploração (s) no quadrante alvo, D) frequência de exploração dos buracos no quadrante alvo, E) exploração (s) do buraco alvo, F) frequência de exploração do buraco alvo, e G) número de vezes que frequentou o os buracos errados. Dados em média \pm EPM.

Tabela 50 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao aprendizado da localização da caixa destino.

(Continua)

Dist	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 38) = 2,547	NS 0.1188	0.03	
Pré-tratamento	F (1, 38) = 0,1240	NS 0.7267	0.02	
Tratamento	F (1, 38) = 0,7215	NS 0.401	0.006	
Lat				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 37) = 0,7335	NS 0.3973	0.006	
Pré-tratamento	F (1, 37) = 0,4970	NS 0.4852	0.01	
Tratamento	F (1, 37) = 0,2908	NS 0.593	0.01	
CQA				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 37) = 1,372	NS 0.249	0.009	
Pré-tratamento	F (1, 37) = 1,263	NS 0.2684	0.006	
Tratamento	F (1, 37) = 0,01310	NS 0.9095	0.02	
FQA				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 37) = 0,1623	NS 0.6894	0.10	
Pré-tratamento	F (1, 37) = 5,626	* 0.023	0.10	
Tratamento	F (1, 37) = 1,579	NS 0.2168	0.01	
CBA				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 37) = 1,112	NS 0.2986	0.002	
Pré-tratamento	F (1, 37) = 1,238	NS 0.2731	0.005	
Tratamento	F (1, 37) = 0,2918	NS 0.5923	0.01	
FBA				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 37) = 0,4358	NS 0.5133	0.01	
Pré-tratamento	F (1, 37) = 0,2381	NS 0.6285	0.01	
Tratamento	F (1, 37) = 2,048	NS 0.1608	0.02	

Tabela 50 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao aprendizado da localização da caixa destino.

(Conclusão)				
Erros				
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 38) = 0,9068	NS	0.347	0.002
Pré-tratamento	F (1, 38) = 0,7535	NS	0.3908	0.006
Tratamento	F (1, 38) = 0,3787	NS	0.542	0.01

Fonte: do autor.

Nota: (Dist) distância percorrida (cm), (Lat) latência para exploração do buraco alvo, (EQA) exploração (s) no quadrante alvo, (FQA) frequência de exploração dos buracos no quadrante alvo, (EBA) exploração (s) do buraco alvo, (FBA) frequência de exploração do buraco alvo, e (Erros) número de vezes que frequentou o os buracos errados. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

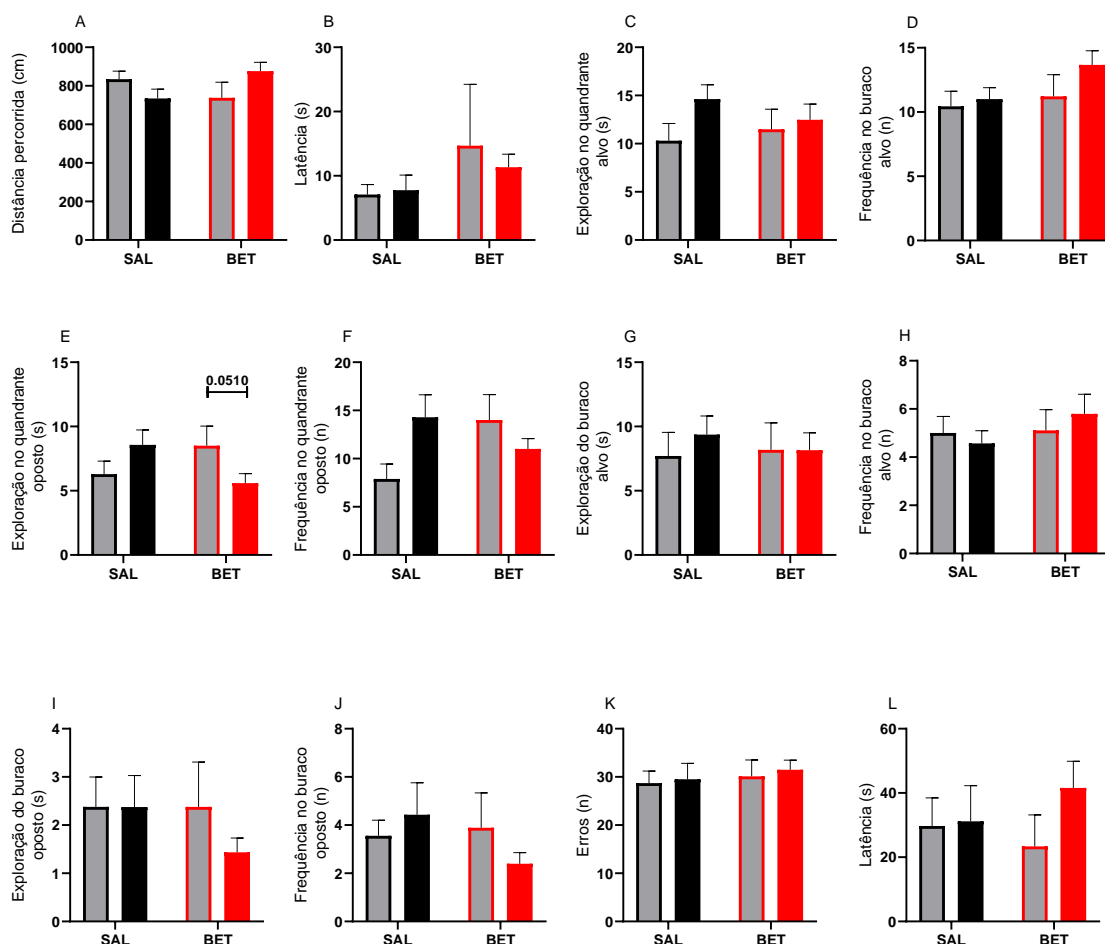
6.9.1.3 Resultados quanto a reversão do aprendizado da localização da caixa destino.

O gráfico 44 apresenta os parâmetros observados no 10º dia durante o teste de reversão do aprendizado quanto a localização da caixa.

Observamos que não houve diferença quanto a memória espacial de reversão do aprendizado dos filhotes das ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou SAL.

Não houve diferença entre os grupos pré-tratados e tratados durante o 1 mi e 30 seg de teste quanto, a distância percorrida (cm) no aparato, latência para chegada ao buraco alvo, tempo de exploração (s) do quadrante alvo, frequência de exploração no quadrante alvo, exploração (s) do quadrante oposto, frequência no quadrante oposto, tempo de exploração (s) no buraco alvo, exploração do buraco alvo, frequência de exploração do buraco alvo, exploração (s) do buraco oposto, frequência do buraco oposto e número de erros. (n=5-12 por grupo).

Gráfico 44 - Resultados dos parâmetros avaliados no teste de reversão do aprendizado no dia 10 no teste de Barnes pelos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Parâmetros avaliados no dia do teste de reversão do aprendizado (dia 10) no teste de Barnes dos filhotes machos de ratas que receberam pré-tratamento com SAL e BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16 (n=5-12 por grupo) quanto a: A) distância percorrida (cm), B) latência para exploração do buraco alvo, C) exploração (s) no quadrante alvo, D) frequência de exploração dos buracos no quadrante alvo, E) exploração (s) do quadrante oposto, F) frequência de exploração do buraco oposto, G) exploração (s) do buraco alvo, H) frequência de exploração do buraco alvo, I) exploração (s) do buraco oposto, J) frequência de exploração do buraco oposto, e G) número de vezes que frequentou o os buracos errados. Dados em média ± EPM.

Tabela 51 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto a reversão do aprendizado da localização da caixa destino.

(Continua)

Dist	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 38) = 4,419	*	0.0422	0.07
Pré-tratamento	F (1, 38) = 0,1593	NS	0.6921	0.01
Tratamento	F (1, 38) = 0,1176	NS	0.7336	0.01
Lat				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 38) = 0,1894	NS	0.6659	0.01
Pré-tratamento	F (1, 38) = 1,487	NS	0.2302	0.01
Tratamento	F (1, 38) = 0,0861	NS	0.7707	0.02
CQA				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 37) = 0,8047	NS	0.3755	0.004
Pré-tratamento	F (1, 37) = 0,0681	NS	0.7955	0.02
Tratamento	F (1, 37) = 2,051	NS	0.1605	0.02
FQA				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 36) = 0,4999	NS	0.4841	0.01
Pré-tratamento	F (1, 36) = 1,662	NS	0.2055	0.01
Tratamento	F (1, 36) = 1,261	NS	0.2689	0.006
CQO				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 36) = 5,459	*	0.0252	0.10
Pré-tratamento	F (1, 36) = 0,1153	NS	0.7361	0.02
Tratamento	F (1, 36) = 0,0814	NS	0.777	0.02
FQO				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 36) = 6,389	*	0.016	0.12
Pré-tratamento	F (1, 36) = 0,5776	NS	0.4522	0.009
Tratamento	F (1, 36) = 0,8349	NS	0.3669	0.003

Tabela 51 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto a reversão do aprendizado da localização da caixa destino.

(Continuação)

CBA				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 36) = 0,2290	NS	0.6351	0.02
Pré-tratamento	F (1, 36) = 0,0451	NS	0.833	0.02
Tratamento	F (1, 36) = 0,2194	NS	0.6423	0.02
FBA				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 36) = 0,4393	NS	0.5117	0.01
Pré-tratamento	F (1, 36) = 0,6314	NS	0.432	0.009
Tratamento	F (1, 36) = 0,0238	NS	0.8782	0.02
CBO				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 37) = 0,5985	NS	0.4441	0.009
Pré-tratamento	F (1, 37) = 0,5985	NS	0.4441	0.009
Tratamento	F (1, 37) = 0,6055	NS	0.4414	0.009
FBO				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 36) = 1,559	NS	0.2199	0.01
Pré-tratamento	F (1, 36) = 0,8030	NS	0.3762	0.004
Tratamento	F (1, 36) = 0,1060	NS	0.7467	0.02
Erros				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 38) = 0,0100	NS	0.9205	0.02
Pré-tratamento	F (1, 38) = 0,3729	NS	0.5451	0.01
Tratamento	F (1, 38) = 0,1519	NS	0.6989	0.02

Tabela 51 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto a reversão do aprendizado da localização da caixa destino.

(Conclusão)

LatBO			
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 36) = 0,7247	NS 0.4002	0.0
Pré-tratamento	F (1, 36) = 0,0426	NS 0.8376	0.0
Tratamento	F (1, 36) = 0,9999	NS 0.324	0.0

Fonte: do autor.

Nota: (Dist) distância percorrida (cm), (Lat) latência para exploração do buraco alvo, (EQA) exploração (s) no quadrante alvo, (FQA) frequência de exploração dos buracos no quadrante alvo, (EQO) exploração (s) do quadrante oposto, (FQO) frequência de exploração do buraco oposto, (EBA) exploração (s) do buraco alvo, (FBA) frequência de exploração do buraco alvo, (EBO) exploração (s) do buraco oposto, (FBO) frequência de exploração do buraco oposto, (Erros) número de vezes que frequentou os buracos errados e (LatBO) latência para exploração do buraco alvo. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

6.9.2 Resultados quanto ao teste de CA durante 20 min para verificação do comportamento tipo-ansioso.

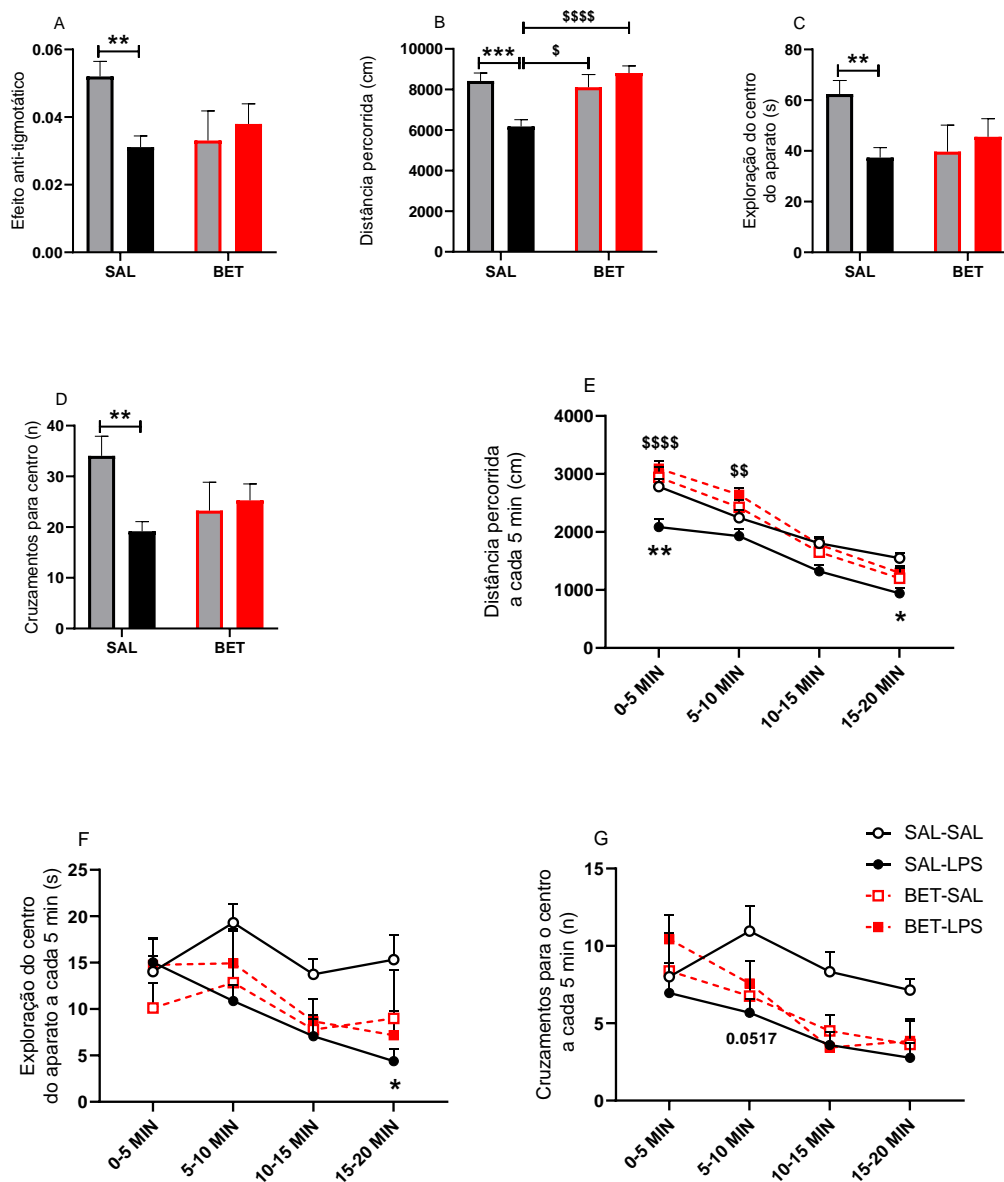
No gráfico 45 apresentado podemos observar que o pré-tratamento com BET preveniu em alguns aspectos os prejuízos aos filhotes adultos causados pelo LPS quando aplicado nas ratas durante a gestação, porém a BET causou outros prejuízos nos filhotes adultos de ratas que receberam LPS ou SAL, quando comparados ao grupo controle.

Observamos que o BET preveniu a redução na distância percorrida (cm) durante 20 min pelos animais que receberam tratamento com LPS $p < 0.05$ e SAL $p < 0.0001$, e da mesma forma preveniu a redução da distância percorrida nos tempos de 0-5 min $p < 0.0001$ e 5 a 10 min $p < 0.01$ em comparação ao grupo LPS.

Não houve diferença quanto ao tempo (s) de exploração do centro do aparato e não houve diferença quanto ao número de cruzamentos para o centro do aparato durante 20 min. Da mesma maneira, não houve diferença quanto ao tempo (s) de exploração do centro do aparato a cada 5 min e número de cruzamentos para centro do aparato a cada 5 min, quando comparados ao grupo LPS (n=8-22 por grupo).

O pré-tratamento com BET não foi capaz de reverter o comportamento tipo-ansioso causado pelo LPS, conforme demonstrado pelo efeito anti-tigmotático.

Gráfico 45 - Resultados dos parâmetros avaliados durante o teste de campo aberto de 20 min pelos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto aos parâmetros avaliados no dia do teste CA durante 20 min dos filhotes machos adultos de ratas que receberam pré-tratamento com SAL e NIM e tratamento com LPS ou SAL no DG16 (n=8-22 por grupo) quanto ao: A) efeito anti-tigotático, B) distância percorrida (cm), C) tempo de exploração no centro do aparato e D) número de cruzamentos para o centro do aparato, parâmetros avaliados no dia do teste CA a cada 5 min e durante 20 min E) distância percorrida (cm), F) tempo de exploração no centro do aparato e G) número de cruzamentos para o centro do aparato. Dados em média \pm EPM. Os símbolos representam significância * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ quando comparados entre os grupos LPS e controle, \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.0001$ quando comparado entre os grupos BET, e grupos LPS e controle.

Tabela 52 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao teste de CA durante 20 min para verificação do comportamento tipo-ansioso.

EAT				
	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 61) = 5,837	* 0.0187	0.06	
Pré-tratamento	F (1, 61) = 1,285	NS 0.2614	0.003	
Tratamento	F (1, 61) = 2,258	NS 0.1381	0.01	
Dist				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 61) = 11,48	** 0.0012	0.11	
Pré-tratamento	F (1, 61) = 7,098	** 0.0099	0.06	
Tratamento	F (1, 61) = 3,159	NS 0.0805	0.02	
EC				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 61) = 5,837	* 0.0187	0.06	
Pré-tratamento	F (1, 61) = 1,285	NS 0.2614	0.003	
Tratamento	F (1, 61) = 2,258	NS 0.1381	0.01	
FCC				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2	
Interação	F (1, 61) = 5,165	* 0.0266	0.05	
Pré-tratamento	F (1, 61) = 0,3984	NS 0.5303	0.008	
Tratamento	F (1, 61) = 2,977	NS 0.0895	0.02	

Fonte: do autor.

Nota: (EAT) efeito anti-tigotático, (Dist) distância percorrida (cm), (EC) tempo de exploração no centro do aparato e (FCC) frequência de cruzamentos para o centro do aparato. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*."

Tabela 53 - Análise através do ANOVA de três vias quanto ao resultado do teste de CA a cada 5 min para verificação do comportamento tipo-ansioso.

Distância percorrida a cada 5 min			
Tabela ANOVA de 3 vias	F (DFn, DFd)	Valor de p	
Tempo (minutos)	F (3, 240) = 92,40	****	<0.0001
(SAL vs BET)	F (1, 240) = 16,34	****	<0.0001
(SAL vs LPS)	F (1, 240) = 6,260	*	0.0060
Tempo (dias)x(SAL vs BET)	F (3, 240) = 4,155	**	0.0110
Tempo (dias)x(SAL vs LPS)	F (3, 240) = 0,4867	NS	0.6360
(SAL vs BET)x(SAL vs LPS)	F (1, 240) = 24,99	****	<0.0001
Tempo (dias)x(SAL vs BET)x(SAL vs LPS)	F (3, 240) = 0,2368	NS	0.8662
Tempo de exploração do centro a cada 5 min			
Tabela ANOVA de 3 vias	F (DFn, DFd)	Valor de p	
Tempo (minutos)	F (3, 244) = 4,577	**	0.0039
(SAL vs BET)	F (1, 244) = 1,876	NS	0.1721
(SAL vs LPS)	F (1, 244) = 3,297	NS	0.0706
Tempo (dias (SAL vs BET)	F (3, 244) = 0,0278	NS	0.9937
Tempo (dias)x(SAL vs LPS)	F (3, 244) = 2,089	NS	0.1022
(SAL vs BET)x(SAL vs LPS)	F (1, 244) = 8,531	**	0.0038
Tempo (dias)x(SAL vs BET)x(SAL vs LPS)	F (3, 244) = 0,3162	NS	0.8137
Cruzamentos para o centro a cada 5 min			
Tabela ANOVA de 3 vias	F (DFn, DFd)	Valor de p	
Tempo (minutos)	F (3, 244) = 8,983	****	<0.0001
(SAL vs BET)	F (1, 244) = 0,8250	NS	0.3646
(SAL vs LPS)	F (1, 244) = 6,181	*	0.0136
Tempo (dias)x(SAL vs BET)	F (3, 244) = 1,657	NS	0.1769
Tempo (dias)x(SAL vs LPS)	F (3, 244) = 1,236	NS	0.2973
(SAL vs BET)x(SAL vs LPS)	F (1, 244) = 10,51	**	0.0014
Tempo (dias)x(SAL vs BET)x(SAL vs LPS)	F (3, 244) = 0,2354	NS	0.8716

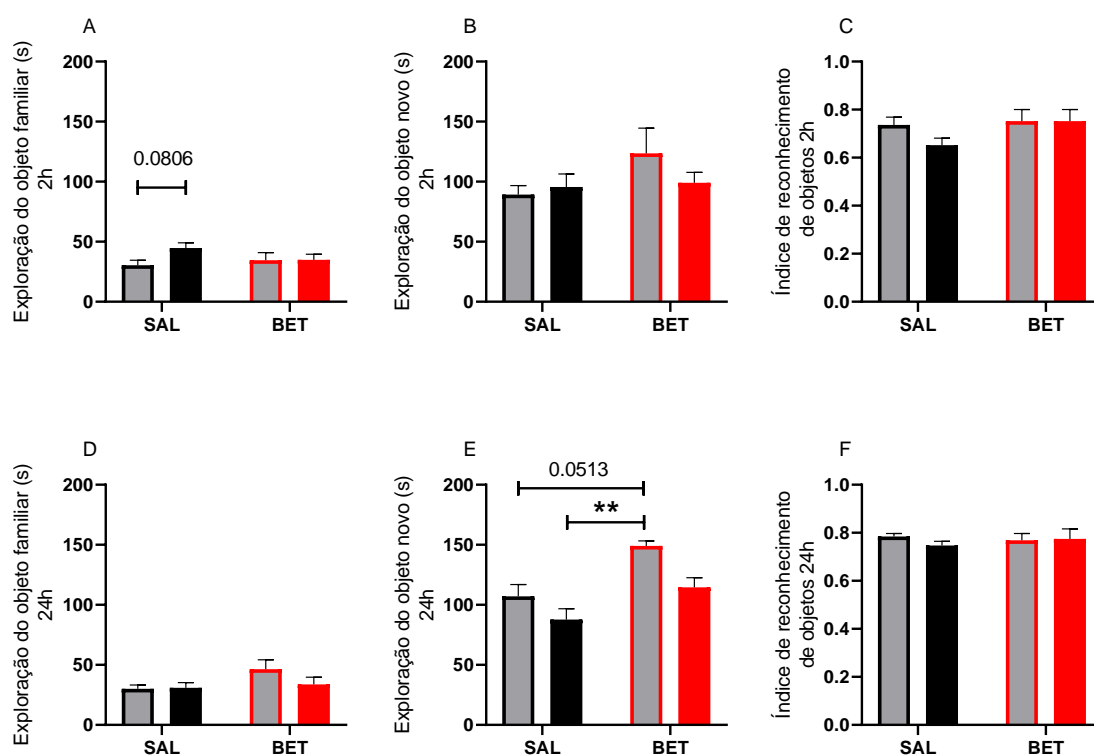
Fonte: do autor.

Nota: Distância percorrida a cada 5 min, tempo de exploração do centro do aparato a cada 5 min e frequência de cruzamentos para o centro do aparato a cada 5 min durante teste de CA de 20 min. Valor de p referente a ANOVA de três vias.

6.9.3 Resultados quanto ao teste de reconhecimento de objetos de 2h e 24h para verificação da memória de curto e longo prazo.

No gráfico 46 podemos observar que o LPS aplicado nas mães durante a gestação não alterou a exploração dos objetos em 2h e apesar dos animais BET explorarem mais o novo durante o tempo de 24h $p < 0.01$, não houve diferença quanto ao índice de reconhecimento. Desta forma, não houve diferença entre os grupos pré-tratados com SAL ou BET e com entre os grupos tratados com SAL ou LPS.

Gráfico 46 - Resultados obtidos durante o teste de reconhecimento de objetos dos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com SAL ou BET e LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultados quanto aos parâmetros avaliados nos dias dos testes reconhecimento de objetos de 2 e 24h dos filhotes adultos machos de ratas que receberam SAL ou BET e receberam LPS ou SAL no DG16 ($n=9-9$ animais por grupo) quanto ao: A) exploração (s) do objeto familiar de 2h, B) exploração (s) do objeto novo de 2h, C) índice de reconhecimento dos objetos de 2h, D) exploração (s) do objeto familiar de 24h, E) exploração do objeto novo de 24h e F) índice de reconhecimento dos objetos de 24h. Dados expressos em média \pm EPM. Os símbolos representam significância $**p < 0.01$ quando comparados entre os grupos LPS e controle.

Tabela 54 - Análise através do teste ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto os resultados do teste de reconhecimento de objetos de 2h e 24h para verificação da memória de curto e longo prazo.

(Continua)

EOF 2h	ANOVA de duas vias		Ômega-quadrado	
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 44) = 1,908	NS	0.1741	0.01
Pré-tratamento	F (1, 44) = 0,3330	NS	0.5668	0.01
Tratamento	F (1, 44) = 2,139	NS	0.1507	0.02
EON 2h				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 44) = 1,785	NS	0.1884	0.01
Pré-tratamento	F (1, 44) = 2,710	NS	0.1068	0.03
Tratamento	F (1, 44) = 0,6293	NS	0.4319	0.007
IR 2h				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 35) = 0,9785	NS	0.3294	0.0005
Pré-tratamento	F (1, 35) = 1,848	NS	0.1827	0.02
Tratamento	F (1, 35) = 0,9785	NS	0.3294	0.0005
EOF 24h				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 44) = 1,702	NS	0.1987	0.01
Pré-tratamento	F (1, 44) = 3,398	NS	0.072	0.04
Tratamento	F (1, 44) = 1,265	NS	0.2667	0.005
EON 24h				
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 44) = 0,5307	NS	0.4702	0.007
Pré-tratamento	F (1, 44) = 11,32	**	0.0016	0.17
Tratamento	F (1, 44) = 6,920	*	0.0117	0.09

Tabela 54 - Análise através do teste ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto os resultados do teste de reconhecimento de objetos de 2h e 24h para verificação da memória de curto e longo prazo.

(Conclusão)

IR 24h			
Variação	F (DFn, DFd)	Valor de p	ω^2
Interação	F (1, 44) = 0,6731	NS 0.4164	0.007
Pré-tratamento	F (1, 44) = 0,05558	NS 0.8147	0.02
Tratamento	F (1, 44) = 0,3697	NS 0.5463	0.01

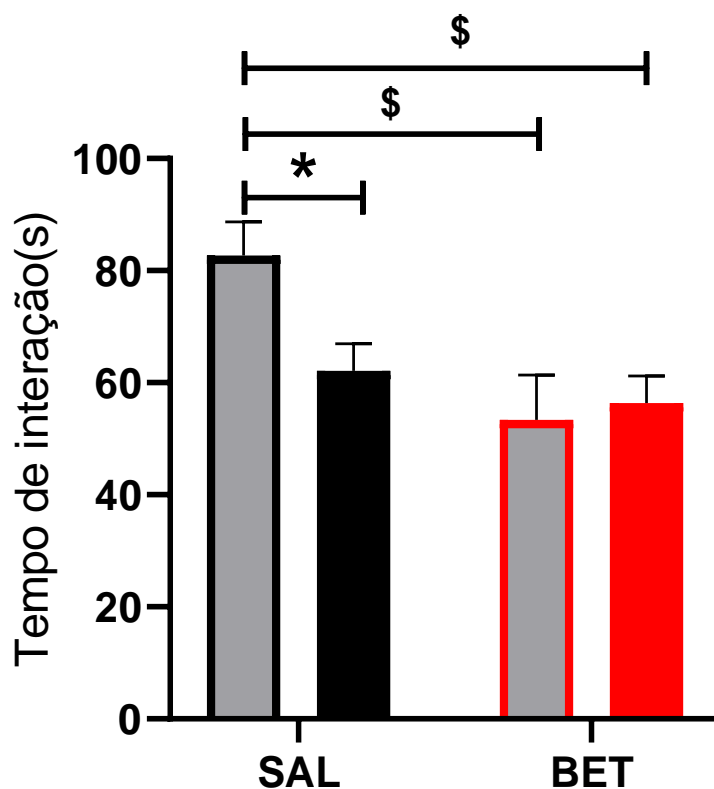
Fonte: do autor.

Nota: (EOF 2h) exploração (s) do objeto familiar de 2h, (EON 2h) exploração (s) do objeto novo de 2h, (IR 2h) índice de reconhecimento dos objetos de 2h, (EOF 24h) exploração (s) do objeto familiar de 24h, (EON 24h) exploração do objeto novo de 24h e (IR 24h) índice de reconhecimento dos objetos de 24h. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*".

6.9.4 Resultados quanto ao teste de interação social dos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS ou SAL durante a prenhez

Como apresentado no gráfico 46 a BET não foi capaz de prevenir a redução na interação social (s) nos filhotes de ratas que receberam tratamento com LPS, como reduziu a interação de ambos os filhotes pré-tratados com BET, e tratados com LPS $p < 0.05$ ou SAL $p < 0.05$, em comparação ao grupo controle (n=8-28 por grupo).

Gráfico 47 - Resultados quanto a interação social dos filhotes de ratas que receberam pré-tratamento com BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16.



Fonte: do autor.

Nota: Resultado quanto o tempo (s) de interação social entre os filhotes adultos machos de ratas que receberam pré-tratamento com SAL e BET e tratamento com LPS ou SAL no DG16 (n=8-28 por grupo). Dados em média ± EPM. Os símbolos representam significância * $p < 0.05$ quando comparados entre os grupos LPS e controle, # $p < 0.05$ quando comparado entre o grupo BET, e o grupo LPS e controle.

Tabela 55 - Análise através do ANOVA de duas vias e do tamanho do efeito através do teste ômega-quadrado quanto ao teste de interação social.

IS	ANOVA de duas vias	Ômega-quadrado		
Varição	F (DFn, DFd)	Valor de p		ω^2
Interação	F (1, 70) = 3,004	NS	0.0874	0.02
Pré-tratamento	F (1, 70) = 6,676	*	0.0119	0.06
Tratamento	F (1, 70) = 1,682	NS	0.1989	0.007

Fonte: do autor.

Nota: Tempo (s) de interação social (IS) entre os filhotes adultos machos de ratas que receberam LPS ou SAL no DG16. Valor de p referente a ANOVA de duas vias, e valor de ω^2 referente ao teste *Ômega-quadrado* sendo os valores obtidos considerados muito pequeno ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 \leq \omega^2 < 0.06$), moderado ($0.06 \leq \omega^2 < 0.14$) e grande ($\omega^2 \leq 0.14$) para o "*Ômega-quadrado*."

7 DISCUSSÃO

TEA é um transtorno do neurodesenvolvimento que afeta em maior proporção indivíduos do sexo masculino do que feminino, sendo caracterizado por déficits na comunicação, interação social, dificuldades em avaliar em situações de risco, apresentam movimentos repetitivos e estereotipados, ansiedade, obedecem rotinas rígidas de comportamento, apresentam interesse restrito a objetos e assuntos, e respondem de forma exacerbadas à estímulos sensoriais, podendo ser de sintomatologia leve ou grave, e com ou sem comprometimento intelectual.

No presente estudo visamos elucidar se a ativação imunomaterna com LPS em ratas durante a prenhez pode causar alguns destes comportamentos nos filhotes machos durante as fases pré-púberes, púberes e vida adulta. E verificar se anti-inflamatórios aplicados concomitantemente ao LPS podem prevenir ou minimizar estes comportamentos.

Para este fim, utilizamos anti-inflamatórios não esteroidais ou esteroidais para reverter ou prevenir a ativação imunomaterna e/ou minimizar os transtornos neurológicos que esta pode causar.

Como anti-inflamatório não esteroidal utilizamos o nimesulide (NIM) sendo este um inibidor seletivo da enzima COX-2 que atua de forma bloquear a síntese de PGE (DE PAIVA *et al.*, 2010). E Como anti-inflamatório esteroidal utilizamos a betametasona (BET), um potente inibidor da síntese de fosfolipase A2 (PLA2), (HANNA; HAFEZ, 2018; LIMA *et al.*, 2017) desta maneira inibindo a liberação de ácido aracdônico livre (AA), sendo este um precursor das PG.

A PLA2 hidrolisa a o fosfolípido da membrana liberando ácido (AA) que se difunde pela membrana e pode dar origem a leucotrienos através da via da lipoxigenase (LOX) ou PG através da via COX, bloqueando de forma não seletiva a síntese de PGE (HANNA e HAFEZ, 2018).

A PGE por sua vez, medeia no SNC os sintomas de comportamento doentio causados pelo LPS, como febre, hipolocomoção, anedonia e anorexia (DE PAIVA *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Os dados aqui apresentados mostram que as ratas que receberam LPS na dose de 500µg/kg no DG16 desenvolveram comportamento doentio, evidenciado pela diminuição na locomoção no teste de CA 2h e 6h, redução da ingestão alimentar durante 6h e 24h e perda de peso 24h após o tratamento com LPS. Observamos ainda que houve uma elevação nas concentrações das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β no plasma destas ratas 2h após o tratamento com LPS quando comparado ao grupo controle. No entanto não houve detecção destas citocinas no líquido amniótico e não houve alterações nas concentrações das mesmas no cérebro fetal. Estes achados nos mostram que as ratas que receberam LPS apresentaram comportamento doentio caracterizado pela redução da locomoção, anorexia e perda de peso, além do aumento das concentrações das citocinas inflamatórias. Observamos também que mais da metade das ratas tratadas com LPS durante a gestação abortaram e os filhotes das ratas paridas tenderam a ser menores em comparação aos controles.

O comportamento doentio é uma constelação de sintomas que incluem entre eles: febre, redução da locomoção, atividade exploratória, interação social, apetite sexual, anedonia, anorexia, perda de peso, ativação do sistema imune e do eixo HHA (DANTZER, 2004; KLUGER, 1986; OLIVEIRA, 2020; PECCHI *et al.*, 2009; YIRMIYA *et al.*, 1994). A ativação do sistema imune causa a elevação nos níveis de citocinas plasmáticas circulantes, dentre elas TNF- α , IL-6 e IL-1 β (ORNOY *et al.*, 2015). A ativação imunomaterna pode ser considerada como fator preponderante para surgimento de transtornos do neurodesenvolvimento como o autismo (BRAUN *et al.*, 2019; IZVOLSKAIA *et al.*, 2020; YASUMATSU *et al.*, 2020).

O NIM foi parcialmente eficiente em prevenir os sintomas de comportamento doentio causados pelo LPS nas ratas prenhas, como redução da locomoção no teste de CA 2h e 6h, perda de peso durante 24h, e elevação da concentração plasmática de TNF- α no plasma materno. Porém, o NIM não foi eficiente em prevenir a redução da ingestão alimentar durante 6h e 24h e elevação nas concentrações IL-6 e IL-1 β no plasma materno. E da mesma maneira em reduzir o número de abortos, onde quase metade das ratas pré-tratadas com NIM e tratadas com LPS abortaram.

De forma parecida a BET foi parcialmente eficiente em prevenir os sintomas de comportamento doentio causados pelo LPS nas ratas prenhas, como redução da locomoção no teste de CA de 6h, redução da ingestão alimentar de 6h e 24h, e

elevação das concentrações plasmáticas das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β no plasma. E foi eficiente em reduzir o número de abortos, onde pouco mais de 17% das ratas que receberam BET e LPS abortaram. Em contrapartida, as ratas que receberam BET e SAL ou BET e LPS perderam peso da mesma forma que as ratas LPS durante 24h.

Com relação as ninhadas de ratas que receberam BET e SAL e BET e LPS, estas não tiveram diferença quanto ao número de filhotes nascidos em comparação ao grupo LPS, porém, estas ninhadas nasceram mais leves e os filhotes nasceram menores, e continuaram menores durante todo o período acompanhado de crescimento.

Tanto o NIM quanto a BET foram parcialmente eficientes em atenuar os sintomas de comportamento doentio causados LPS. A PGE talvez não seja o único mediador da anorexia, pois observamos que o NIM não preveniu totalmente a anorexia, enquanto a BET sim. Não podemos afirmar no presente estudo qual citocina foi a mediadora juntamente com a PGE, e da mesma forma qual foi a via de ativação.

Apesar de Patterson (2009); Smith (2007), Urakubo (2001), descreveram que a ativação imunomaterna seja responsável por aumento nas concentrações de citocinas no cérebro fetal, e estas por alterações no neurodesenvolvimento, não foi observado diferença nas concentrações das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β no cérebro do fetal 2h após tratamento com LPS. As citocinas acima descritas nem ao menos foram detectadas no líquido amniótico. Porém, não podemos afirmar no presente estudo que as concentrações destas citocinas estejam alteradas em tempos posteriores ao realizado.

Infecções pré-natais estão associadas a eventos adversos que podem causar transtornos do neurodesenvolvimento, dentre eles restrição do crescimento fetal e baixo peso ao nascimento (URAKUBO, 2001). Ativação imunomaterna pode causar distúrbios interrompendo funções neurais importantes como, gliogênese, sinaptogênese, proliferação, migração e neuromodulação. (ASHWOOD *et al.*, 2006; BERBEL, *et al* 2014). Além de alterações dopaminérgicas no hipotálamo (KIRSTEN; BERNARDI, 2017).

A placenta parece desempenhar um importante papel na mediação da inflamação causada por patógenos, como na mediação de fatores de transcrição que

estão envolvidos desde a função sináptica, metabolismo celular e estresse oxidativo (AL-HADDAD *et al.*, 2019). Além do mais, patógenos podem prejudicar o SNC de forma indireta potencializando a resposta inflamatória fetal, ativando astrócitos e micróglias, e causando liberação de citocinas e neurotransmissores ou metabólitos excitotóxicos (AL-HADDAD *et al.*, 2019).

O receptor TLR-4 está presente na placenta e parece ser um dos mediadores da resposta imunomaterna sobre injúrias placentárias, estudo com ratos transgênicos que não expressam TLR-4 demonstraram resposta inflamatória reduzida durante a gestação (BROWN *et al.*, 2019; TULINA *et al.*, 2019).

Prejuízos mais severos são observados no feto masculino como hipóxia cortical fetal que leva a anomalias comportamentais como, déficit na interação social e aumento do comportamento repetitivo (SECKL e HOLMES, 2007; BRAUN., *et al* 2019). Da mesma forma, a placenta masculina sofre maior prejuízo em comparação a placenta feminina, como diminuição do seu crescimento durante injúrias (BRAUN., *et al* 2019; SECKL; HOLMES).

No presente trabalho observamos uma tendência de redução da enzima 11 β -HDS2 na placenta de ratas 6h depois de receberem LPS. A mesma redução não foi observada nas ratas que receberam BET, e não foi realizada a quantificação nas ratas que receberam NIM.

A desregulação provocada por estresse imunológico causado pelo LPS, causa inibição da 11 β -HDS2 possibilitando que grandes quantidades de glicocorticóides atravessem a placenta (FU *et al.*, 2013; SECKL; HOLMES, 2007).

Glicocorticóides são de extrema importância durante a gestação preparando o feto para vida extra-uterina. Porém em níveis acima dos fisiológicos podem causar retardo no crescimento fetal (SECKL; HOLMES, 2007; SECKL; MEANEY, 2004). Glicocorticóides sintéticos atravessam a barreira hemato-placentária e causam baixo peso ao nascimento, desregulam o eixo HHA, alteram comportamentos e causam ansiedade nos filhotes (SECKL; HOLMES, 2007; SECKL; MEANEY, 2004). A exposição fetal a esteroides endógenos ou sintéticos podem causar alterações durante a vida adulta (NAZZARI *et al.*, 2019). Apesar do feto estar protegido da alta exposição aos glicocorticóides pela 11 β -HDS2 na placenta, um comprometimento

desta enzima pode trazer consequências a longo prazo para o filhote (NAZZARI *et al.*, 2019).

Houve um maior número de abortos no grupo de ratas que receberam LPS em comparação ao grupo controle. Este número foi até 15 vezes maior no grupo LPS em relação ao controle. As ratas que receberam NIM+LPS abortaram tanto quanto as ratas LPS. Já as ratas que receberam BET+LPS tiveram menos abortos quando comparadas as ratas que receberam LPS. Demonstrando que a BET preveniu os abortos, porém causou baixo peso ao nascimento dos filhotes.

A redução das concentrações da 11β -HSD2 está associada a um maior número de abortos (FU *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2013) e glicocorticóides estão relacionados a baixo peso ao nascer assim como a redução no tempo de gestação (NAZZARI *et al.*, 2019; NI *et al.*, 2018; SECKL e HOLMES, 2007).

Os cuidados recebidos pela prole no início da vida são de extrema importância para um perfeito desenvolvimento do filhote, e podem modular diversos comportamentos durante toda a vida. O cuidado materno é certamente o mais importante comportamento entre mãe e filhote dentre os mamíferos, garantindo desenvolvimento e sobrevivência da prole (BRIDGES, 2015; MENDES-LIMA *et al.*, 2017; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2011). O cuidado materno facilita o desenvolvimento do SNC (CALDJI *et al.*, 1998). Filhotes separados das mães por período de 3h dia durante 2 semanas tiveram respostas aumentadas a dor e redução de respostas noradrenergicas e serotoninergicas. Outros estudos sugerem que ambiente adversos durante o início da vida, influenciam de forma negativa ao longo da vida causando modificações em vias como eixo HHA que regulam diversas respostas fisiológicas (BERNARDI *et al.*, 2010). Da mesma forma, proles de ratas que não são boas cuidadoras exibem comportamento tipo-ansioso durante a fase adulta (VITOR-VIEIRA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2021).

Com relação aos cuidados maternos, constatamos que as ratas que passaram pela ativação imunomaterna com LPS cuidaram melhor da prole durante os primeiros dias pós-nascimento. Tanto o NIM quanto o BET não reverteram o aumento no cuidado materno.

O que levou as ratas que passaram pela ativação imunomaterna com LPS terem cuidado melhor da prole segue desconhecido, podemos especular que ratas que passam por eventos adversos durante a prenhez tenham mais cuidado com a prole por medo natural da perda da mesma, e desta maneira tendem a cuidar melhor tentando dar maior suporte afetivo da mesma forma que mães humanas.

O fato dos filhotes de ratas LPS terem nascido menores não responde à pergunta do porquê destas ratas cuidarem melhor da prole, uma vez que os filhotes de ratas que receberam BET como pré-tratamento nasceram menores e estas ratas não cuidaram da prole da mesma maneira que as LPS.

Quanto ao comportamento dos filhotes, é descrito que o LPS aplicado durante a gestação é capaz de alterar o comportamento dos filhotes machos durante a infância e adolescência (VITOR-VIEIRA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2021).

O LPS causou sintomas clássicos tipo-autista em roedores como redução da comunicação, interação entre mãe e filhote, interação no comportamento de brincar, aumento do comportamento tipo repetitivo e dificuldade de avaliação de o risco eminente. Não houve diferença na distância percorrida no teste de CA, este é um dado importante, que nos indica que os animais não interagiram durante o teste de comportamento de brincar por falta de interesse, e não por baixa locomoção dos animais.

Um dos sintomas típicos de autismo é o prejuízo na comunicação entre os filhotes e a mãe (KIRSTEN *et al.*, 2012). Filhotes de roedores nascem com cérebro imaturo (FLEMING *et al.*, 1999, MEYER *et al.*, 2006), e quando isolados tendem a reduzir as taxas de vocalizações para não serem ouvidos por potenciais predadores (SPENCE *et al.*, 2016).

Modelos animais com roedores são importantes para entendermos a evolução da comunicação (RIEDE, 2014). Ratos tem um repertório particularmente rico em vocalizações e tem sido utilizada de forma sistemática como forma de investigação de modelos de autismos, e esta parece ser uma forma bastante confiável para detecção de déficits de comunicativos em ratos (KAS *et al.*, 2014; REYES *et al.*, 2020).

Percebemos no presente trabalho que os filhotes LPS vocalizaram menos do que os controle, neste caso os filhotes reduziram a emissão na vocalização por

desinteresse em comunicar-se e não por considerar o examinador um predador potencial.

O NIM quando aplicado nas ratas durante a gestação não preveniu a redução das vocalizações, porém, a BET foi eficiente em prevenir a deficiência na comunicação dos filhotes.

A redução das emissões de vocalizações dos filhotes machos de ratas que passaram pelo desafio imunomaterno com LPS, era algo esperado pois, vários estudos anteriores demonstraram que modelos de TEA em roedores tem sua comunicação prejudicada (KIRSTEN *et al.*, 2012, VIEIRA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2021; YASUMATSU *et al.*, 2020). Estudos com modelos que utilizaram VPA durante a gestação demonstraram que houve redução na quantidade de vocalizações emitidas pelos filhotes (GZIELO *et al.*, 2020; SERVADIO *et al.*, 2016). De maneira similar modelos com LPS em doses diferentes e em dias diferentes de gestação também demonstraram comunicação prejudicada dos filhotes (KIRSTEN *et al.*, 2012, YASUMATSU *et al.*, 2020).

O teste de *homing* explora de forma natural a motivação do filhote por manter contato com sua mãe e o ninho (MIKULECKA *et al.*, 2014).

No teste de *homing* os filhotes de ratas LPS levaram mais tempo para chegarem até a porção com maravalha do ninho materno. O NIM ou BET aplicados durante a gestação não preveniram a redução do tempo para chegada até a maravalha materna.

O afastamento do ninho traz consequências graves e adversas para os filhotes, assim é de grande importância que os filhotes reconheçam e sigam pistas olfativas deixadas pela mãe e reconheçam o cheiro do ninho materno. (FOLEY *et al.*, 2014; MELANCIA *et al.*, 2017; VITOR-VIEIRA; VILELA; GIUSTI-PAIVA; 2021).

Em outro modelo de autismo com VPA foi observado da mesma forma um maior tempo para entrada na porção com maravalha do ninho durante o teste de *homing* (SERVADIO, 2016). O prejuízo de discriminação olfativa causado pelo LPS pode ser uma das causas da incapacidade dos filhotes de reconhecerem o cheiro do ninho (KIRSTEN *et al.*, 2011; VITOR-VIEIRA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2021).

Um dos comportamentos típicos de TEA são os comportamentos tipo-repetitivos e estereotipados (MARKRAM *et al.*, 2008; SERVADIO *et al.*, 2015). O teste de tábua de buracos descrito em 1962 por Boisser e Simon, teve como objetivo avaliar a motivação do roedor por explorar novos ambientes (KUMAR; SHARMA, 2016b; TAKEDA *et al.*, 1998), bem como analisar movimentos repetitivos e estereotipados (BATISTA, 2018; MARTIN *et al.*, 2010; SERVADIO *et al.*, 2016).

Durante o teste de tábua de buracos, observamos um maior número de mergulhos realizados pelos filhotes LPS. Este dado sugere que estes filhotes tiveram comportamento tipo-repetitivo e estereotipado (VITOR-VIEIRA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2021). Outros pesquisadores encontraram resultados semelhantes em modelos com VPA (SERVADIO, 2015), de restrição proteica durante a gestação (BATISTA, 2018) de obesidade por redução de ninhada (NOVAIS *et al.*, 2021) e por estresse materno (CHAGAS *et al.*, 2021).

O NIM preveniu o comportamento tipo-repetitivo causado pelo LPS aplicado durante a gestação, em contrapartida a BET além de não prevenir acentuou estes comportamentos nos filhotes.

O teste de labirinto em cruz elevado aproveita-se do medo natural dos roedores por lugares abertos e altos, evocando medo e conflito nos animais em relação ao explorar um ambiente novo ou de esconder-se (PELLOW *et al.*, 1985).

Os filhotes de ratas LPS não avaliaram o risco em se expor a um ambiente novo e desconhecido evidenciado pela redução no número de esticadas antes de entrarem e permanecerem por mais tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. A dificuldade de avaliação de risco é um sintoma típico de autismo (VITOR-VIEIRA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2021). Pesquisadores utilizando roedores autistas knock-out também encontraram déficits de avaliação de risco nestes animais (ORON *et al.*, 2019). O quando aplicado nas ratas prenhas, o NIM não preveniu estes sintomas de entradas e esticadas, já a BET quando aplicada nas ratas prenhas preveniu o comportamento de entradas no braço aberto mas não as esticadas, evidenciando dificuldades de avaliação de risco nos dois grupos.

Muitos pesquisadores descrevem resultados diferentes em modelos com VPA (KUMAR; SHARMA, 2016a; b.; SERVADIO *et al.*, 2016) e LPS (DEPINO *et al.*, 2015;

KIRSTEN *et al.*, 2010). Estes relataram que roedores autistas tendem a explorar menos os braços abertos do labirinto em cruz, e desta maneira sugerem um aumento do comportamento tipo-ansioso. Porém, estes pesquisadores não relatam as esticadas que demonstram a avaliação de risco feita pelo animal antes da entrada nos braços abertos (VITOR-VIEIRA, VILELA, GIUSTI-PAIVA, 2021).

O comportamento de brincar é provavelmente o evento mais importante durante a infância de mamíferos. É sabido que todos mamíferos brincam durante a infância, desde os maiores, como baleias e elefantes, até os menores como roedores. Através das brincadeiras os filhotes adquirem habilidades sociais e cognitivas as quais serão importantes durante toda a vida (VANDERSCHUREN *et al.*, 2016). No caso dos roedores, o comportamento de brincar inicia-se com a solicitação da brincadeira por parte de um dos filhotes e a aceitação por parte do outro filhote, que caso aceite dá continuidade a brincadeira. Perseguição e exploração social do oponente também são parâmetros de interação social neste contexto (VANDERSCHUREN; TREZZA, 2014; VANDERSHUREN *et al.*, 2016).

Os filhotes de ratas LPS interagiram menos em comparação ao grupo controle. O quando aplicada durante a gestação, o NIM preveniu a redução no comportamento de brincar. Porém, a BET além de não prevenir, na verdade causou tanto prejuízo quanto o LPS. O comportamento de brincar talvez seja o teste mais relevante em modelos translacionais de TEA.

Vitor-Vieira e colaboradores em 2021 demonstraram que áreas da amígdala estão mais ativadas durante o comportamento de brincar, além de haver uma menor ativação de áreas como núcleo accumbens e córtex cingulado.

Déficits de interação social são sintomas típicos de TEA, incluindo desde dificuldades em iniciar e aceitar brincadeiras, e quando aceitam envolvem-se de forma passiva, e muitas das vezes de forma estereotipadas (MELANCIA *et al.*, 2017; VARDERSCHUREN; TREZZA, 2014; VARDERSCHUREN *et al.*, 2016).

Pesquisadores com o uso de outros modelos de indução de TEA encontraram resultados semelhantes como diminuição na interação social (CHAGAS *et al.*, 2021; CHOMIAK *et al.*, 2010; MARKRAM *et al.*, 2008; NOVAIS *et al.*, 2021; TAYLOR *et al.*,

2012), e diminuição das solicitações das brincadeiras (GZIELO *et al.*, 2020; SERVADIO *et al.*, 2016; VITOR-VIEIRA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2021).

O desenvolvimento natural do comportamento social em roedores, mostram que o comportamento de brincar é parte integrante do desenvolvimento de habilidades sociais, cognitivas, motoras e emocionais (VANDERSCHUREN *et al.*, 2016).

O teste de Barnes foi descrito pela primeira vez em 1979 por Carol A. Barnes sendo um teste baseado em terra seca para avaliação da memória espacial e aprendizado (PITTS, 2018). Apresenta semelhança com o labirinto aquático de Morris (MORRIS, 1984), utilizando pistas visuais para orientação espacial, porém sem o fator aversivo e estressante da água, e sem o medo de se afogar. Consiste de uma plataforma plana e levada com 20 buracos laterais, onde um deles tem uma caixa de escape, e uma luz forte (500W) é ligada sobre o aparato. Ambientes abertos e iluminados por si só já são aversivos para roedores (PITTS, 2018).

Durante os dias de treino de aprendizado do dia 1 ao 5, notamos que ambos os grupos aprenderam de forma similar o caminho para a caixa destino, e da mesma durante o treino de reversão do aprendizado dos dias 7 ao 9, indicando que estes animais não tem comprometimento da memória de aprendizado espacial.

Durante o teste de aprendizado realizado no 6º dia pós-treinos, também não houve diferença quanto a memória de onde estava a caixa destino. Já no 10º dia durante o teste de reversão do aprendizado quando a caixa é mudada de lugar, observamos que os filhotes adultos de ratas LPS tenderam a buscar o buraco onde estava a caixa anteriormente.

O comportamento dos filhotes LPS durante o teste no dia 10, demonstra que estes animais tenderam a procurar a caixa onde ela estava anteriormente, revelando um comportamento restrito e uma deficiência em adquirir novas memórias (GAWEL *et al.*, 2018).

Com relação aos filhotes adultos de ratas que receberam pré-tratamentos NIM, notamos que houve um aumento na exploração e frequência do buraco oposto dos animais controle, porém por serem controles de pré-tratamento são dados sem relevância neste trabalho. E da mesma maneira o comportamento dos filhotes adultos de ratas BET no teste de Barnes não foi diferente dos outros grupos.

O CA descrito em 1934 por Hall, é utilizado para verificação da atividade exploratória e de ansiedade em roedores (PRUT; BELZUNG, 2003). A ansiedade é um dos sintomas mais frequentes entre indivíduos autistas (DSM-5, 2013; SOUTH *et al.*, 2011). É muito bem conhecido que ativação imunomaterna cause comportamentos tipo ansioso na prole de roedores (DEPINO *et al.*, 2015; PENTEADO *et al.*, 2014)

As paredes da arena do CA fornecem certa segurança para os roedores que aproveitam desta para se locomover e se proteger, essa movimentação em contato com as paredes é chamada de tigmotaxia (LAMPREA *et al.*, 2008; PRUT; BELZUNG, 2003). Uma maior exploração do centro do aparato está relacionada como a uma atividade ansiolítica, e de forma contrária, hipomobilidade e redução da atividade exploratória é indicativo de uma atividade ansiogênica (PRUT; BELZUNG, 2003). Modelos de ansiedade em roedores que utilizam do CA são conhecidos e muito bem estabelecidos na literatura (LAMPREA *et al.*, 2008; PRUT; BELZUNG, 2003).

O LPS quando aplicado em ratas durante a gestação causou comportamentos tipo ansioso na prole (DEPINO *et al.*, 2015; PENTEADO *et al.*, 2014). E de forma semelhante em modelos com VPA (KATAOKA *et al.*, 2011).

Dados semelhantes em modelos diferentes de indução do autismo corroboram com nosso estudo onde os filhotes durante a vida adulta tiveram comportamentos tipo ansioso (HANSWIJK *et al.*, 2020).

O teste de CA de 20 min mostrou que filhotes machos de ratas que receberam LPS, quando adultos são mais ansiosos, como demonstrado pelo efeito anti-tigmotático, pela redução do tempo e frequência de cruzamentos para o centro do aparato, e também parecem ter comportamentos tipo depressivos, evidenciado pela menor distância percorrida durante o teste. A NIM preveniu a redução da distância percorrida, porém não eficaz em prevenir o comportamento tipo ansioso. Da mesma maneira a BET foi capaz de prevenir a redução da distância percorrida, mas não os outros parâmetros.

A ansiedade é um dos sintomas mais frequentes entre indivíduos autistas (AMARAL *et al.*, 2008; DSM-5, 2013; SOUTH *et al.*, 2011; UMEDA *et al.*, 2010). É muito bem descrito que ativação imunomaterna cause comportamentos tipo ansioso em roedores (HANSWIJK *et al.*, 2020).

Como o LPS afeta o SNC do filhote ainda é uma incógnita, mas sistemas serotoninérgicos parecem ser afetados durante a ativação imunomaterna durante a gestação (HANSWIJK *et al.*, 2020) Alterações no sistema serotoninérgico podem causar comportamentos tipo ansioso, depressivo e autista em modelos de roedores (HANSWIJK *et al.*, 2020; MAROTTA *et al.*, 2020; WÖHR; SCHWARTING, 2013).

O teste de reconhecimento de objetos visa avaliar a memória de reconhecimento de dos roedores. Primeiramente é apresentado dois objetos idênticos ao animal, 2h depois troca-se um dos objetos por outro diferente e 24 depois troca aquele objeto diferente por outro diferente novamente, um mesmo objeto é deixado desde o primeiro momento. Roedores tendem sempre a explorar objetos novos (BATISTA *et al.*, 2018; GRAYSON *et al.*, 2014; LIM *et al.*, 2005), quando estes animais não exploram objetos novos denota-se uma dificuldade destes animais em se lembrarem do objeto já explorado (GRAYSON *et al.*, 2014, NOVAIS *et al.*, 2021).

Observamos que os animais filhotes de ratas LPS tenderam a explorarem menos o objeto novo indicado pelo índice de reconhecimento, porém exploram mais o objeto conhecido no tempo de 2h.

Estes animais podem não ter déficit de memória e sim o comportamento de interesse restrito por algo. Interesse restrito é um comportamento típico de indivíduos autistas (BATISTA *et al.*, 2018; DSM-5, 2013).

Da mesma maneira, animais LPS tenderam a exploram menos o objeto novo indicado pelo índice de reconhecimento 24h depois de serem apresentados os objetos aos animais. Outros pesquisadores encontraram dados parecidos com outros modelos de indução de autismo em roedores (NOVAIS *et al.*, 2021).

Indivíduos autista reconhecem objetos e tendem a não procurar por novos objetos quando diante de um objeto já conhecido, desta forma mostrando interesse restrito por aquele objeto (BATISTA *et al.*, 2018). No entanto crianças autistas tendem a ter dificuldades em reconhecer rostos humanos (GRAYSON *et al.*, 2014). No caso dos roedores, uma das formas de interação com os objetos seria através do olfato e pelas vibrissas, uma vez que estes animais tem visão deficiente (GRAYSON *et al.*, 2014). Não houve diferença quanto os grupos NIM. Apesar de haver uma maior exploração do objeto novo no tempo de 24h pelos animais BET, o mesmo não foi

observado no índice de reconhecimento. Desta forma podemos afirmar que os animais LPS não reconheceram o objeto familiar sugerindo déficit de memória no tempo de 24h.

Quanto a interação social, já era esperado que estes filhotes adultos de ratas LPS interagissem menos, uma vez que houve redução no comportamento de brincar durante a fase púbere. Durante o teste de interação social durante a vida adulta houve uma menor interação entre os grupos NIM e também entre os BET, uma vez que o NIM preveniu a redução do comportamento de brincar durante a fase púbere não há relação com a redução durante a fase adulta. Quanto a BET, esta causou redução dos parâmetros até mesmo nos filhotes controle. É provável que como estes filhotes durante toda a vida tenham tido comportamentos sociais reduzidos e que este comportamento se mantivesse durante a vida adulta

Modelos de autismo induzido por VPA encontraram redução da interação social durante a vida adulta (GZIELO *et al.*, 2020), outros modelos também encontraram redução na interação social (ABRAMOVA, 2020), e da mesma maneira durante o teste de interação em três câmaras com modelo de LPS (OSKVIG *et al.*, 2012). O desinteresse em interagir com outras pessoas é um sintoma típico observado em indivíduos com TEA (DSM-5, 2013; VANDERSCHUREN *et al.*, 2016).

Já em relação ao medo condicionado ao contexto, observamos que os filhotes de ratas LPS se mantiveram durante um maior tempo em congelamento e emitiram mais vocalizações do tipo aversivas. O congelamento é um comportamento natural de roedores frente ao perigo eminente, é um comportamento tipo defensivo utilizado como estratégia por vários animais, incluindo os roedores. O estado de congelamento reflete o medo e aversão do roedor frente ao perigo. O ato de ficar imóvel é uma importante estratégia de sobrevivência quando não se sabe de onde vem o perigo, caso não haja algum esconderijo e rota de fuga (ARAKAWA; IGUCHI, 2018). Da mesma maneira, as vocalizações ultrassônicas de 22kHz são emitidas em caso de perigo. A emissão destas vocalizações nesta frequência serve de alerta para outros animais da mesma colônia (REYES *et al.*, 2020). Neste caso, o perigo é a caixa onde o animal recebeu os choques nas patas. Um maior tempo de congelamento indica que o animal se lembra da caixa e que algo aversivo aconteceu a ele naquele lugar. Neste caso parece que o animal tem a memória aversiva preservada, por se lembrar do

ocorrido na caixa. No entanto, a resposta a esta lembrança é algo muito mais exacerbado. Existe neste caso uma hiperresponsividade ao estímulo aversivo.

O medo é uma resposta fisiológica a uma ameaça eminente que prepara o indivíduo para uma resposta defensiva apropriada como, congelar, lutar ou fugir são respostas associadas a sentimentos afetivos e de pavor em humanos (SUN *et al.*, 2020).

Ratos exibem uma série chamados diferentes, que variam em intensidade, volume e complexidade. Estes chamados podem variar de 20KHz a 90KHz, sendo que os chamados de 22KHz estão associados a respostas aversivas (REYES *et al.*, 2020). Desta forma, chamados aversivos parecem ser bons indicadores para expressão da memória aversiva em roedores, juntamente com o comportamento de congelamento expresso durante o medo (REYES *et al.*, 2020; WHÖR *et al.*, 2015).

Muitas áreas cerebrais estão envolvidas durante a modulação do medo, sendo a amígdala a principal delas (AINCY *et al.*, 2017; ARAKAWA; IGUCHI, 2018; GIUSTINO; MAREN, 2015; SAH *et al.*, 2008; SOTRES-BOYON *et al.*, 2004; SOUTH *et al.*, 2011;). A amígdala é uma estrutura complexa que desempenha modulação do medo, durante a aprendizagem, aquisição e resposta, modula respostas autonômicas simpáticas mediadas por noradrenalina (NOR), que contribuem aumentando as respostas ansiogênicas. (AINCY *et al.*, 2017; ANISMAN; ZACHARKO, 1986; ARAKAWA; IGUCHI, 2018). Filhotes de ratas que receberam LPS durante a gestação apresentam uma maior ativação das amígdalas basol-lateral e baso-medial (VITOR-VIEIRA, VILELA, GIUSTI-PAIVA, 2021).

A inibição do córtex pré-frontal também modula o medo condicionado ao contexto, ratos que sofreram inibição córtex pré-frontal expressaram menos o comportamento de congelamento em comparação a ratos que não tiveram, demonstrando assim uma intensa modulação cortical antes da modulação amigdalar (GIUSTINO; MAREN, 2015; RESSTEL *et al.*, 2006). Da mesma forma filhotes de ratas que receberam LPS durante a gestação apresentaram menor ativação de áreas corticais como córtex cingulado.

Com relação aos parâmetros cardiovasculares, observamos que não houve diferença entre grupo de filhotes adultos de ratas tratadas com LPS ou controle

durante a aferição da PAM basal. No entanto ao serem colocados no aparato de contenção, houve uma maior elevação da PAM dos animais LPS em comparação aos controles. Já durante a aferição da FC, notamos que os animais saíram de uma condição basal para uma elevação dos bpm, porém a elevação e foi semelhante entre os grupos.

O coração não possui a regularidade de metrônomo, assim variações da FC e PA são comuns e indicam uma habilidade do coração em responder a diversos estímulos como a estresse físico e mental, atividade física e alterações hemodinâmicas (VANDERLEI *et al.*, 2009). Alterações fisiológicas quanto ao estresse durante a resposta aguda são transitórias enquanto resposta a estressores crônicos são duradouras ou permanentes. (DO VALE *et al.*, 2019). A respostas ao aumento da PAM e FC são despostas adaptativas ao estresse induzido pela câmara de contenção.

Em modelos utilizando de estresse por choque observou-se que animais que receberam choque tiveram uma elevação na PAM e FC, modulado pela ativação do SNA simpático (RESSTEL *et al.*, 2006). Respostas autonômicas simpáticas são comuns em indivíduos com TEA. Em um estudo de meta-análise foi observado que bebês com TEA tinha pupilas mais dilatadas, FC e PA mais elevada, além de sudorese aumentada (VRIES *et al.*, 2020).

No presente estudo, o objetivo foi verificar a resposta cardiovascular ao agente estressor, neste caso a câmara de contenção durante o período de estresse, e não se este estresse causa alguma mudança a curto ou longo prazo nos parâmetros cardiovasculares. As alterações observadas durante o estímulo estressor mostram que animais dos quais as mães passaram por ativação imunomaterna durante a gestação respondem de forma exacerbada a estes estímulos. Está ativação simpática pode ser devida à um desajuste na atividade de áreas moduladas pela resposta autonômica como locus coeruleos (LC) (FIRMINO *et al.*, 2019; VANDERLEI *et al.*, 2009). Parte do controle cardiovascular é realizado pelo sistema nervoso autônomo (SNA) através dos barorreceptores e quimiorreceptores que levam informação até as áreas cerebrais e que modulam a atividade simpática e parassimpática no NTS (FIRMINO *et al.*, 2019; VANDERLEI *et al.*, 2009). A atividade simpática medeia importantes circuitos cerebrais através do LC, como ativação da amígdala durante o

estado de medo e ativação do hipocampo durante a memória (AINCY *et al.*, 2017; ANISMAN; ZACHARKO, 1986; ARAKAWA; IGUCHI, 2018; VRIES *et al.*, 2020).

Respostas ao estresse agudo também causam uma hiperativação do eixo HHA (ILLIANO *et al.*, 2020). Alterações do eixo HHA e respostas aumentadas são sintomas clássicos de autismo (DSM-5, 2013; BERNARDI *et al.*, 2012). Indivíduos autista exibem ainda redução da atividade do córtex cingulado, desenvolvimento anormal das amígdalas além de disfunção neural desta área (MINSHEN *et al.*, 2010). Em estudos onde foram observados cérebros de indivíduos autista *post-mortem*, encontrou-se um aumento no número de neurônios, no entanto estes apresentavam tamanho menor (SOSA-DIAS *et al.*, 2014).

No presente estudo observamos uma maior ativação neural do LC em animais LPS durante o teste de estresse por contenção, evidenciado pelo aumento de neurônios imunorreativos para C-fos em comparação aos animais controle. O mesmo não foi observado quanto a área do NTS dos animais LPS ou controle.

LC é um centro noradrenérgico de modulação do estado de alerta e regulação da função autonômica, além de ser responsável pela resposta ao estresse, e faz conexões com hipotálamo, tálamo e amígdala (BENARROCH, 2018; GASPARINI *et al.*, 2020; SCHWARZ; LUO, 2015).

O NTS é um conhecido centro de integração barorreceptora e quimiorreceptora de aferentes cardíacos (DUAN *et al.*, 2009). Além de ser um centro regulatório de atividade autonômica que recebe projeções de diversas outras áreas e sofre regulação de várias destas áreas (GASPARINI *et al.*, 2020). Sendo o principal centro regulador cardiovascular sendo modulado por diversas áreas. Assim, é esperado que haja ativação parecida desta área entre os grupos testados, por ser uma área muito ampla e com vários subnúcleos que regulam funções diversas.

Vitor-Vieira e colaboradores em 2021 observaram uma maior ativação de regiões das amígdalas em filhotes de ratas que receberam LPS durante a gestação. A amígdala envia projeções gabaérgicas para o NTS e modula a atividade cardiovascular desta forma regulando sua ativação (SAHA, 2000).

O presente estudo demonstrou que ativação imunomaterna com LPS no GD16 na dose 500µg/kg causa comportamento doentio nas ratas evidenciado pelo aumento

das citocinas circulantes no plasma, e levou ao comprometimento dos filhotes machos com sintomas tipo-autista durante a infância como, diminuição na comunicação do filhote com sua mãe, redução da interação filhote-ninho, aumento de comportamento tipo-repetitivo, redução da interação social. O NIM preveniu os sintomas comportamentais do comportamento doentio, mas não as alterações das concentrações de citocinas. Por outro lado, a BET foi ainda mais eficiente em prevenir os sintomas e as alterações das concentrações de citocinas.

O LPS tendeu a reduzir a expressão da enzima 11β -HSD-2 na placenta 6h após o tratamento, enquanto a BET não alterou a expressão desta enzima, e causou abortos em mais de 50% das ratas tratadas, o que não foi prevenido pela NIM, mas foi sim prevenido pela BET, e causou ainda redução do peso dos filhotes que não foi observado após o pré-tratamento com NIM, porém tanto o tratamento com LPS quanto SAL nasceram menores quando a rata recebeu pré-tratamento com BET.

Desta maneira, parece que o estresse causado pela ativação imunomaterna e sua consequente estimulação do eixo HHA devem ser a causa dos prejuízos comportamentais na prole. Em um modelo de indução de estresse pós traumático pré-natal onde as ratas receberam choques nas patas foi observado um aumento da expressão de corticoides plasmáticos e da mesma forma os filhotes tiveram comportamentos tipo-autista (CHAGAS, 2021).

A redução da enzima 11β -HSD-2 na placenta pode estar associada a uma maior passagem de corticoides pela placenta provocando perda de peso ao nascer e comportamento tipo-autista e da mesma maneira corticoides exógenos podem facilmente passar pela placenta e programar o cérebro do filhote (CHAPMAN; HOLMES; SICKL, 2013).

Assim, a aplicação de corticoide exógeno provocou prejuízos na prole, como perda de peso ao nascer e comportamento tipo-autista mesmo este tendo reduzido as concentrações de citocinas e atenuando o comportamento doentio nas ratas.

Figura 6 - Prejuízos causados pelo LPS nas ratas prenhas e na prole.

RATAS PRENHAS

- ✓ COMPORTAMENTO DOENTIO
- ✓ PREJUÍZO AO NASCER
- ✓ ALTERAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO

FILHOTES PRÉ-PÚBERES E PÚBERES

- ✓ REDUÇÃO NA COMUNICAÇÃO
- ✓ PREJUÍZO NA DISCRIMINAÇÃO DE ODOR DO NINHO
- ✓ AUMENTO DO COMPORTAMENTO REPETITIVO
- ✓ REDUÇÃO DA AVALIAÇÃO DE RISCO
- ✓ REDUÇÃO DA INTERAÇÃO SOCIAL DURANTE O TESTE DE BRINCADEIRAS
- ✗ CRESCIMENTO

FILHOTES DURANTE A VIDA ADULTA

- ✓ REDUÇÃO DA INTERAÇÃO SOCIAL
- ✓ AUMENTO DO COMPORTAMENTO ANSIOSO
- ✓ AUMENTO DA RESPOSTA CARDIOVASCULAR DURANTE O ESTRESSE
- ✓ AUMENTO DA RESPOSTA AVERSIVA DURANTE O ESTRESSE
- ✓ INTERESSE RESTRITO POR OBJETOS CONHECIDOS E LOCAIS CONHECIDOS
- ✗ MEMÓRIA DE DISCRIMINAÇÃO DE OBJETOS
- ✗ MEMÓRIA DE ESPACIAL

Fonte: do autor.

Nota: A figura 6 mostrando os prejuízos causados pelo LPS na rata preta e na prole, onde o símbolo ✓ os prejuízos causados pelo LPS e o ✗ representa onde não houve prejuízo.

Figura 7 - Ratas que abortaram

RATAS QUE ABORTARAM

LPS	NIM+LPS	BET+LPS	
↓	■	■	MOBILIDADE
↓	↓	↓	INGESTÃO ALIMENTAR
↓	↓	↓	PERDA DE PESO
51,52%	45,83%	17,39%	ABORTOS

Fonte: do autor.

Nota: A figura 7 mostra a taxa de abortos das ratas que receberam pré-tratamento e tratamento, onde os símbolos: representam ↓ redução e ■ não houve diferença.

Figura 8 - Comparação entre os grupos pré-tratados e tratados quanto a prevenção dos comportamentos nas ratas prenhas e na prole.

RATAS PRENHAS

LPS	NIM+LPS	BET+LPS	
↑	↓	↓↓	COMPORTAMENTO DOENTIO
↓	↑	↓↓	PESO AO NASCER
↑	■	■	COMPORTAMENTO MATERNO

FILHOTES PRÉ-PÚBERES E PÚBERES

LPS	NIM+LPS	BET+LPS	
↓	■	↑	COMUNICAÇÃO
↓	■	■	DISCRIMINAÇÃO DE ODOR DO NINHO
↑	↓	↑↑	COMPORTAMENTO REPETITIVO
↓	■	↓	AVALIAÇÃO DE RISCO
↓	■	↓↓	INTERAÇÃO SOCIAL DURANTE O TESTE DE BRINCADEIRAS
■	■	↓↓	CRESCIMENTO

FILHOTES DURANTE A VIDA ADULTA

LPS	NIM+LPS	BET+LPS	
↓	↓	↓↓	INTERAÇÃO SOCIAL ADULTO
↑	↓	■	COMPORTAMENTO ANSIOSO
↑	■	■	INTERESSE RESTRITO POR OBJETOS CONHECIDOS E LOCAIS CONHECIDOS
■	■	■	MEMÓRIA DE DISCRIMINAÇÃO DE OBJETOS
■	■	■	MEMÓRIA DE ESPACIAL

Fonte: do autor.

Nota: A figura 8 mostra a comparação entre os grupos pré-tratados e tratados quanto a prevenção dos comportamentos nas ratas prenhas e na prole, onde os símbolos representação: ↓ redução, ↑ aumento e ■ não houve diferença.

Figura 9 - Expressão da enzima 11-β HSD-2 na placenta de ratas que receberam LPS e que receberam BET+LPS

EXPRESSÃO DE 11-β HSD-2

LPS	BET+LPS	
↓	■	PLACENTA

Fonte: do autor.

Nota: A figura 9 mostra a expressão de 11-β HSD-2 na placenta de ratas que receberam LPS ou BET+LPS onde, os símbolos representam: ↓ redução e ■ não houve diferença.

8 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que o LPS leva a ativação imunomaterna e causa comportamento tipo-autista na prole, e reduz a enzima 11 β -HSD-2 na placenta, sendo esta redução diretamente associada ao aumento no número de abortos e baixo peso ao nascimento.

O tratamento com anti-inflamatório esteroidal concomitante ao tratamento com LPS reduziu o número de abortos, preveniu a redução da 11 β -HSD-2 na placenta, mas causou redução do peso da ninhada, além de causar comprometimentos tipo-autistas na prole da mesma forma que o LPS. O tratamento com anti-inflamatório não esteroidal não previne os abortos, mas previne alguns comportamentos tipo-autistas na prole.

Desta forma, a desregulação placentária durante a injúria parece ser a causa dos prejuízos comportamentais tipo-autista causado pelo LPS, uma vez que o LPS causa ativação do eixo HHA aumentando a liberação de glicocorticoides, e da mesma maneira, glicocorticoides exógenos causaram prejuízos na prole da mesma forma que ativação imunomaterna pelo LPS.

REFERÊNCIAS

ABRAMOVA, O. V. *et al.* Social and Cognitive Impairments in Rat Offspring after Ultrasound-Induced Prenatal Stress. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. v. 168, n. 6, abr 2020. DOI 10.1007/s10517-020-04790-0. Acessado em: 10 jan. 22.

AINCY, M. *et al.* Synaptic dysfunction in amygdala in intellectual disorder models. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 84, p. 392-397, 31 jul 2017. doi:10.1016/j.pnpbp.2017.07.028. Acessado em: 10 jan. 22.

AMARAL, D. G.; SCHUMANN, C. M.; NORDAHL, C. W. Neuroanatomy of autism. **Trends Neurosci**, v. 31, n. 3, p. 137-45, mar 2008. ISSN 0166-2236. disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18258309>. Acessado em: 10 jan. 22.

ANISMAN, H. e ZACHARKO, R. M. Behavioral and Neurochemical Consequences Associated with Stressors". **ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES**. Nova York, v. 467, n. 1, p. 205-225, 1986. DOI:10.1111/j.1749-6632.1986.tb14630.x. Acessado em: 10 jan. 22.

ANOMAL, R. F. *et al.* Impaired Processing in the Primary Auditory Cortex of an Animal Model of Autism. **Front Syst Neurosci**. v. 9, p. 158, 2015. ISSN 1662-5137. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26635548>. Acessado em: 10 jan. 22.

AL-HADDAD, B. J. S. *et al.* The fetal origins of mental illness. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**. v. 221, n. 6 p. 549-562, jun 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.06.013>. Acessado em: 10 jan. 22.

ARAKAWA, H e YGUCHI, Y. Ethological and multi-behavioral analysis of learning and memory performance in laboratory rodent models. **Neuroscience Research**. v. 135, p. 1-12, out 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jeures.2018.02.001>. Acessado em: 10 jan. 22.

ASHDOWN, H. *et al.* The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. **Mol Psychiatry**. v. 11, n. 1, p. 47-55, jan 2006. ISSN 1359-4184. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16189509>. Acessado em: 10 jan. 22.

ASHWOOD, P.; VAN DE WATER, J. A review of autism and the immune response. **Clin Dev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 165-74, jun 2004. ISSN 1740-2522. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15330453>. Acessado em: 10 jan. 22.

ASHWOOD, P.; WILLS, S.; VAN DE WATER, J. The immune response in autism: a new frontier for autism research. **J Leukoc Biol**. v. 80, n. 1, p. 1-15, jul 2006. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16698940>. Acessado em: 10 jan. 22.

BERNARDI, M.M.; KIRSTEN, T.B.; TRINDADE, M.O. Sobre o Autismo, Neuroinflamação e Modelos Animais para o Estudo de Autismo: Uma Revisão. **Revista Neurociências**. São Paulo. v. 20, n1, p. 117-127, 2012. DOI: 10.34024/rnc.2012.20.8304. Acessado em: 10 jan. 22.

BAHARNOORI, M.; BHARDWAJ, S. K.; SRIVASTAVA, L. K. Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: a prenatal infection model for developmental neuropsychiatric disorders. **Schizophr Bull**. Oxford, v. 38, n. 3, p. 444-56, mai 2012. ISSN 1745-1701. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805287>. Acessado em: 10 jan. 22.

BAHARNOORI, M.; BHARDWAJ, S. K.; SRIVASTAVA, L. K. Effect of maternal lipopolysaccharide administration on the development of dopaminergic receptors and transporter in the rat offspring. **PLoS One**. São Francisco, v. 8, n. 1, e54439, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23349891>. Acessado em: 10 jan. 22.

BARON-COHEN, S. *et al.* The amygdala theory of autism. **Neurosci Biobehav Ver**. v. 24, n. 3, p. 355-64, mai 2000. ISSN 0149-7634. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781695>. Acessado em: 10 jan. 22.

BARNET, R. Case histories Autism. **THE LANCET**. Londres, v.387, p.2082, mai 21, 2016. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30530-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30530-X). Acessado em: 10 jan. 22.

BARTZOKIS, G. Neuroglialpharmacology: White matter pathophysiologies and psychiatric treatments. **Front Biosci (Landmark Ed)**. Cingapura, v. 16, p. 2695-733, jun 01 2011. ISSN 1093-4715. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21622204>. Acessado em: 10 jan. 22.

BATISTA, T. H.; GIUSTI-PAIVA, A.; VILELA, F.C. Maternal protein malnutrition induces autism-like symptoms in rat offspring. **Nutritional Neuroscience**. Inglaterra, v. 22, n. 19, 2018. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1427660>. Acessado em: 10 jan. 22.

BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. **Brain Behav Immun**. v. 24, n. 6, p. 881-97, ago 2010. ISSN 1090-2139. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20230889>. Acessado em: 10 jan. 22.

BRAUN, A. E. *et al.* “Females Are Not Just ‘Protected’ Males”: Sex-Specific Vulnerabilities in Placenta and Brain after Prenatal Immune Disruption. **ENEURO**. v. 6, n. 6, p. 1–25, nov 2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0358-19.2019>. Acessado em: 10 jan. 22.

BRIDGES, R. S. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. **Front Neuroendocrinol**. v. 36, p. 178–196, jan 2015. doi:10.1016/j.yfrne.2014.11.007. Acessado em: 10 jan. 22.

BROWN, A. G. *et al.* The tracking of lipopolysaccharide through the feto-maternal compartment and the involvement of maternal TLR4 in inflammation-induced fetal brain injury. **American Journal Reproductive Immunology**. ago 2019. DOI: 10.1111/aji.13189. Acessado em: 10 jan. 22.

CALDJI, C. *et al.* Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** Nova York, v. 95 p. 5335-5340, 1998. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5335>. Acessado em: 10 jan. 22.

CHAGAS, L. A. *et al.* Anxiety-like behavior and neuroendocrine changes in offspring resulting from gestacional pos-traumatic stress disorder. **Behavioural Brain Research**. v. 399. art.113026, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.113026>. Acessado em: 10 jan. 22.

CHAPMAN, K. HOLMES, M. SICKL, J. 11-hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. **Physiol Ver**. v. 93. p. 1139-1206, 2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2012>, Acessado em: 10 jan. 22.

CHAWN, N e HUGHES, L. History and First Descriptions of Autism: Asperger Versus Kanner Revisited. **J Autism Dev Disord**. v. 46, n. 6, p.2270–2272, 2016. DOI 10.1007/s10803-016-2746-0. Acessado em: 10 jan. 22.

CHEN, S.; XING, Y.; KANG, J. Latent and abnormal functional connectivity circuits in autism spectrum disorder. **Front Neurosci**. v. 11, p. 125, 2017. ISSN 1662-4548. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28377688>. Acessado em: 10 jan. 22.

CHOMIAK, T. *et al.* Altering the trajectory of early postnatal cortical development can lead to structural and behavioural features of autism. **Neuroscience**. v. 11, n. 102, 2010. <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/11/102>. Acessado em: 10 jan. 22.

CLANCY, B. *et al.* Extrapolating brain development from experimental species to humans. **Neurotoxicology**. v. 28, n. 5, p. 931-7, set 2007. ISSN 0161-813X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368774>. Acessado em: 10 jan. 22.

COURCHESNE, E. *et al.* Mapping early brain development in autism. **Neuron**. v. 56, n. 2, p. 399-413, out 25 2007. ISSN 0896-6273. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964254>. Acessado em: 10 jan. 22.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. **Eur J Pharmacol**. v. 500, n. 1-3, p. 399-411, out 01 2004. ISSN 0014-2999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464048>. Acessado em: 10 jan. 22.

DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Autistic children: a neuroimmune perspective. **Brain Behav Immun**. v. 22, n. 6, p. 804-5, ago 2008. ISSN 1090-2139. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18420377>. Acessado em: 10 jan. 22.

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. doi:10.1016/j.bbr.2010.07.015. Acessado em: 10 jan. 22.

DEPINO, A. M. Early prenatal exposure to lps results in anxiety- and depression-related behaviors in adulthood. **Neuroscience**. v. 299, p. 56–65, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.065>. Acessado em: 10 jan. 22.

DIETERT, R. R.; DIETERT, J.M.; DEWITT, J. C. Environmental risk factors for autism. **Emerging Health Threats Journal**. v. 4, p. 1-11, 2011. DOI: 10.3402/ehth.v4i0.7111. Acessado em: 10 jan. 22.

DI MARCO, B. *et al.* Neuro-Inflammatory Mechanisms in Developmental Disorders Associated with Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorder: A Neuro-Immune Perspective. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. v. 15, n. 4, p. 448-63, 2016. ISSN 1996-3181. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26996174>. Acessado em: 10 jan. 22.

DO VALE, G. T. *et al.* Acute restraint stress increases blood pressure and oxidative stress in the cardiorenal system of rats: a role for AT1 receptors. **The International Journal on the Biology of Stress**. v. 23, n. 3, 2019. <https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1675627>. Acessado em: 10 jan. 22.

DUAN, Y. C. *et al.* Nucleus of solitary tract mediates cardiac sympathetic afferent reflex in rats. **Eur J Physiol**. v. 459 p. 1-9. 2009. DOI 10.1007/s00424-009-0699-2. Acessado em: 10 jan. 22.

FIRMINO, E. M. S. *et al.* Effect of chronic stress on cardiovascular and ventilatory responses activated by both chemoreflex and baroreflex in rats. **Journal of Experimental Biology**. v. 222, 2019. doi:10.1242/jeb.204883. Acessado em: 10 jan. 22.

FU, L. *et al.* Lipopolysaccharide downregulates 11b-hydroxysteroid dehydrogenase 2 expression through inhibiting peroxisome proliferator - activated receptor-g in placental trophoblasts. **The Journal of Immunology**. v. 203, n. 5, p. 1198-1207, jul 2019. <http://www.jimmunol.org/content/early/2019/07/16/jimmunol.1900132>. Acessado em: 10 jan. 22.

ESNAFOGLU, E. *et al.* Evaluation of serum Neuron-specific enolase, S100B, myelin basic protein and glial fibrillary acidic protein as brain specific proteins in children with autism spectrum disorder. **Int J Dev Neurosci**. v. 61, p. 86-91, out 2017. ISSN 1873-474X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28711670>. Acessado em: 10 jan. 22.

FLEMING, A. S.; O'DAY, D. H.; KRAEMER, G. W. Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. **Neurosci Biobehav Ver**. v. 23, n. 5, p. 673-685, mai 1999. ISSN 0149-7634 0149-7634. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10392659>. Acessado em: 10 jan. 22.

FOLEY, K. A. *et al.* Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to propionic acid and lipopolysaccharide on social behavior in neonatal, adolescent, and adult rats: implications for autism spectrum disorders. **Int J Dev Neurosci**. Ontario, v. 39, p. 68-78, dez 2014. ISSN 1873-474X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24747144>. Acessado em: 10 jan. 22.

FOLEY, K. A. *et al.* Pre- and neonatal exposure to lipopolysaccharide or the enteric metabolite, propionic acid, alters development and behavior in adolescent rats in a sexually dimorphic manner. **PLoS One**. Ontario, v. 9, n. 1, e87072, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24466331>. Acessado em: 10 jan. 22.

FU, L. *et al.* Lipopolysaccharide downregulates 11b-hydroxysteroid dehydrogenase 2 expression through inhibiting peroxisome proliferator - activated receptor-g in placental trophoblasts. **The Journal of Immunology**. v. 203, n. 5, p. 1198-1207, jul 2019. <http://www.jimmunol.org/content/early/2019/07/16/jimmunol.1900132>. Acessado em: 10 jan. 22.

GASPARINI, S. *et al.* Pre-locus coeruleus neurons in rat and mouse. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 320, ed. 3, p. 342-361, dez 2020. DOI: 10.1152/ajpregu.00261.2020. Acessado em: 10 jan. 22.

GENTILE, S. Prenatal antidepressant exposure and the risk of autism spectrum disorders in children. Are we looking at the fall of Gods? **J Affect Disord**. v. 182, p. 132-137, ago 2015. ISSN 1573-2517. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25985383>. Acessado em: 10 jan. 22.

GILMORE, J. H.; JARSKOG, L. F.; VADLAMUDI, S. Maternal infection regulates BDNF and NGF expression in fetal and neonatal brain and maternal-fetal unit of the rat. **J Neuroimmunol**. v. 138, n. 1-2, p. 49-55, mai 2003. ISSN 0165-5728. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742653>. Acessado em: 10 jan. 22.

GIUSTINO, F. T. e MAREN, S. The role of the medial prefrontal cortex in the conditioning and extinction of fear. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**. v. 9, art. 298, nov 2015. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00298. Acessado em: 10 jan. 22.

GRAYSON, B. *et al.* Assessment of disease-related cognitive impairments using the novel object recognition (NOR) task in rodents. **Behavioural Brain Research**. v. 285, p. 176-193, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.10.025>. Acessado em: 10 jan. 22.

GZIELO, K. *et al.* Valproic acid exposure impairs ultrasonic communication in infant, adolescent and adult rats. **European Neuropsychopharmacology**. v. 41, p. 52-62, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2020.09.006>. Acessado em: 10 jan. 22.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. 1934. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**. v. 18, n. 3, p. 385-403, 1934. <https://doi.org/10.1037/h0071444>. Acessado em: 10 jan. 22.

HANNA, V. S e HAFEZ, E. A. A. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. **Journal of Advanced Research**. v. 11, p. 23–32, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.005>. Acessado em: 10 jan. 22.

HANSWIJK, S. I. *et al.* Gestational Factors throughout Fetal Neurodevelopment: The Serotonin Link. **Int. J. Mol. Sci**. v. 21, n. 16, 2020. doi:10.3390/ijms21165850. Acessado em: 10 jan. 22.

HARRIS, J. Leo Kanner and autism: a 75-year perspective. **International Review of Psychiatry**. Londres, p. 3-17, abr 2018. <https://doi.org/10.1080/09540261.2018.1455646>. Acessado em: 10 jan. 22.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neurosci Biobehav Rev**. v. 12, n. 2, p. 123-37, 1988. ISSN 0149-7634. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3050629>. Acessado em: 10 jan. 22.

HUGHES, J. E. A. *et al.* Is synaesthesia more prevalent in autism spectrum Conditions? Only where there is prodigious talent. **Multisensory Research**. fev 2017. DOI:10.1163/22134808-00002558 . Acessado em: 10 jan. 22.

ILLIANO, P. *et al.* Rats Lacking Dopamine Transporter Display Increased Vulnerability and Aberrant Autonomic Response to Acute Stress. **Biomolecules**. v. 10, n. 6, art. 842. doi:10.3390/biom10060842. Acessado em: 10 jan. 22.

IZVOLSKAIA, M; SHAROVA, V; ZAKHAROVA, L. Perinatal inflammation reprograms neuroendocrine, immune, and reproductive functions: profile of cytokine biomarkers. **Inflammation**, v. 43, n. 4, ago 2020. DOI: 10.1007/s10753-020-01220-1. Acessado em: 10 jan. 22.

KAS, M. J. *et al.* Assessing behavioural and cognitive domains of autism spectrum disorders in rodents: current status and future perspectives. **Psychopharmacology**. Utrecht, v. 231, n. 6, p. 1125-1146, mar 2014. ISSN 1432-2072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048469> >. Acessado em: 10 jan. 22.

KATAOKA, S. *et al.* Autism-like behaviours with transiente histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. **International Journal of Neuropsychopharmacology**. p. 1-13, 2011. doi:10.1017/S1461145711001714. Acessado em: 10 jan. 22.

KIRSTEN, T B e BERNARDI, M. M. Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: Repetitive self-grooming and stereotypies. **Behavioural Brain Research**. v. 331 p. 25-29, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.013>. Acessado em: 10 jan. 22.

KIRSTEN, T. B. *et al.* Lipopolysaccharide Exposure Induces Maternal Hypozincemia, and Prenatal Zinc Treatment Prevents Autistic-Like Behaviors and Disturbances in the Striatal Dopaminergic and mTOR Systems of Offspring. **PLoS ONE**. Canadá, v. 10, n. 7, 2015. doi:10.1371/ journal.pone.0134565. Acessado em: 10 jan. 22.

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**. v. 90, n. 10, p. 1903-1912, out 2012. ISSN 1097-4547. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22714803>. Acessado em: 10 jan. 22.

KIRSTEN, T. B. *et al.* Prenatal LPS exposure reduces olfactory perception in neonatal and adult rats. **Physiol Behav**. v. 104, n. 3, p. 417-422, set 01 2011. ISSN 1873-507X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570993>. Acessado em: 10 jan. 22.

KIRSTEN, T. B. *et al.* Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. **Neuroimmunomodulation**. v. 17, n. 4, p. 240-251, 2010. ISSN 1423-0216. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20203530>. Acessado em: 10 jan. 22.

KLUGER, M. J. Is fever beneficial? **Yale J Biol Med.** Yale, v. 59, n. 2, p. 89-95, abr 1986. ISSN 0044-0086. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3488621>. Acessado em: 10 jan. 22.

KOCOVSKA, E. *et al.* Vitamin-d deficiency as a potential environmental risk factor in multiple sclerosis, schizophrenia, and autism. **Front Psychiatry.** v. 8, p. 47, 2017. ISSN 1664-0640. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28396640>. Acessado em: 10 jan. 22.

KUMAR, H.; SHARMA, B. Minocycline ameliorates prenatal valproic acid induced autistic behaviour, biochemistry and blood brain barrier impairments in rats. **Brain Res.** v. 1630, p. 83-97, Jan 2016. ISSN 1872-6240. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26551768>. Acessado em: 10 jan. 22.

LAMPREA, M. R. *et al.* Thigmotactic responses in an open-field. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 41, p. 135-140, 2008. ISSN 0100-879X. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2008000200010>. Acessado em: 10 jan. 22.

LEE, A. S.; AZMITIA, E. C.; WHITAKER-AZMITIA, P. M. Developmental microglial priming in postmortem autism spectrum disorder temporal cortex. **Brain Behav Immun.** v. 62, p. 193-202, mai 2017. ISSN 1090-2139. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28159644>. Acessado em: 10 jan. 22.

LEEKAM, S. R. *et al.* Describing the sensory abnormalities of children and adults with autism. **J Autism Dev Disord.** v. 37, n. 5, p. 894-910, mai 2007. ISSN 0162-3257. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17016677>. Acessado em: 10 jan. 22.

LIM, M. M.; BIELSKY, I. F.; YOUNG, L. J. Neuropeptides and the social brain: potential rodent models of autism. **Int. J. Devl Neuroscience.** v. 23, p. 235-243, 2005. doi:10.1016/j.ijdevneu.2004.05.006. Acessado em: 10 jan. 22.

MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS - DSM-5. **American Psychiatric Association:** Tradução: Nascimento, M. I. C. *et al.* Revisão Técnica: Cordoli, A. V. *et al.* 5ª ed, p. 50-58, Porto Alegre. Artmed, 2014. ISBN 978-85-8271-089-0. Acessado em: 10 jan. 22.

MARKRAM, K. *et al.* Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**. Lausanne, v. 33, n. 4, p. 901-12, mai 2008. ISSN 0893-133X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507914>. Acessado em: 10 jan. 22.

MAROTTA, R. *et al.* The neurochemistry of autism. **Brain Sci.** v. 10, p. 163, 2020. doi:10.3390/brainsci10030163. Acessado em: 10 jan. 22.

MARTIN, L. A.; GOLDOWITZ, D.; MITTLEMAN, G. Repetitive behavior and increased activity in mice with Purkinje cell loss: a model for understanding the role of cerebellar pathology in autism. **Eur J Neurosci.** v. 31 n. 3 p. 544–555, fev 2010. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.07073.x. Acessado em: 10 jan. 22.

MELANCIA, F. *et al.* Testing the correlation between experimentally-induced hypothyroidism during pregnancy and autistic-like symptoms in the rat offspring. **Behav Brain Res.** v. 321, p. 113-122, mar 15 2017. ISSN 1872-7549. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28034801>. Acessado em: 10 jan. 22.

MENDES-LIMA, T. *et al.* Acute lipopolysaccharide switches the selection of maternal behavior to predatory behavior in female rats. **Neuroimmunomodulation.** 2017.

DOI: 10.1159/000469711. Acessado em: 10 jan. 22.

MEYER, U.; FELDON, J.; FATEMI, S. H. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 33, n. 7, p. 1061-1079, jul 2009. ISSN 1873-7528. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442688>. Acessado em: 10 jan. 22.

MEYER, U. *et al.* Prenatal and postnatal maternal contributions in the infection model of schizophrenia. **Exp Brain Res.** v. 173, n. 2, p. 243-57, ago 2006. ISSN 0014-4819. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16552558>. Acessado em: 10 jan. 22.

MIKULECKA, A. *et al.* Consequences of early postnatal benzodiazepines exposure in rats. I. Cognitive-like behavior. **Front Behav Neurosci.** v. 8, p. 101, 2014. ISSN 1662-5153. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24734010>. Acessado em: 10-01-2022. Acessado em: 10 jan. 22.

NAZZARI, S. *et al.* Beyond the hpa-axis: exploring maternal prenatal influences on birth outcomes and stress reactivity. **Psychoneuroendocrinology**. v. 101, p. 253–262, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.11.018>. Acessado em: 10 jan. 22.

NOVAIS, C. O. *et al.* Maternal overweight induced by reduced litter size impairs the behavioral neurodevelopment of offspring. **Life Sciences**. v. 277, art. 119511, 15 jul 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119611>. Acessado em: 10 jan. 22.

OHSAWA, K. *et al.* Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. **J Neurochem**. v. 88, n. 4, p. 844-856, fev 2004. ISSN 0022-3042. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14756805>. Acessado em: 10 jan. 22.

OLIVEIRA, M. K. *et al.* Simvastatin attenuated sickness behavior and fever in a murine model of endotoxemia. **Life Sciences**. v. 254, art. 117701, 2020 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117701>. Acessado em: 10 jan. 22.

ORNOY, A.; WEINSTEIN-FUDIM, L.; ERGAZ, Z. Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). **Reprod Toxicol**. Jerusalem. v. 56, p. 155-169, ago 2015. ISSN 1873-1708. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26021712>. Acessado em: 10 jan. 22.

O. ORON, D. GETSELTHER, S. SHOHAT, E. REUVENI, I. LUKIC, S. SHIFMAN, E. ELLIOTT. Gene network analysis reveals a role for striatal glutamatergic receptors in dysregulated risk-assessment behavior of autism mouse models, **Transl. Psychiatry**. v. 9, p. 257, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0584-5>. Acessado em: 10 jan. 22.

OSKVIK, D. B. *et al.* Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. **Brain Behav Immun**. v. 26, n. 4, p. 623-634, mai 2012. ISSN 1090-2139. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22310921>. Acessado em: 10 jan. 22.

PAINTLIA, M. K. *et al.* N-acetylcysteine prevents endotoxin-induced degeneration of oligodendrocyte progenitors and hypomyelination in developing rat brain. **J Neurosci Res**. v. 78, n. 3, p. 347-61, nov 2004. ISSN 0360-4012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15389835>. Acessado em: 10 jan. 22.

PAINTLIA, M. K. *et al.* Lipopolysaccharide-induced peroxisomal dysfunction exacerbates cerebral white matter injury: attenuation by N-acetyl cysteine. **Exp Neurol.** v. 210, n. 2, p. 560-576, abr 2008. ISSN 0014-4886. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18291369>. Acessado em: 10 jan. 22.

PARDO, C. A. e EBERHART, C. G. The neurobiology of autism. **Brain Pathol.** v. 17, n. 4, p. 434-47, out 2007. ISSN 1015-6305 1015-6305. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919129>. Acessado em: 10 jan. 22.

PATTERSON, P. H. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. **Behav Brain Res.** v. 204, n. 2, p. 313-321, dez 2009. ISSN 1872-7549. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136031>. Acessado em: 10 jan. 22.

PATTERSON, P. H. Maternal infection and immune involvement in autism. **Trends Mol Med.** v. 17, n. 7, p. 389-394, jul 2011. ISSN 1471-499X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21482187>. Acessado em: 10 jan. 22.

PECCHI, E. *et al.* Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. **Physiol Behav.** v. 97, n. 3-4, p. 279-92, jun 2009. ISSN 1873-507X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19275907>. Acessado em: 10 jan. 22.

PELLOW, S. *et al.* Validation of open" closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods.** v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7). Acessado em: 10 jan. 22.

PENTEADO, S. H. *et al.* Prenatal lipopolysaccharide disrupts maternal behavior, reduces nest odor preference in pups, and induces anxiety: studies of F1 and F2 generations. **Eur J Pharmacol.** v. 738, p. 342-51, set 2014. ISSN 1879-0712. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24927995>. Acessado em: 10 jan. 22.

PITTS, M. W. Barnes maze procedure for spatial learning and memory in mice. **Bio Protoc.** v.8, n.5, mar, 2018. doi:10.21769/bioprotoc.2744. Acessado em: 10 jan. 22.

PRUT, L. e 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. 463, p. 3-33, 2003. doi:10.1016/S0014-2999(03)01272-X. Acessado em: 10 jan. 22.

RESSTEL, L.B. M. *et al.* Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. **Neuroscience**. v. 143, n. 2, p. 377-385, 2006. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.08.002. Acessado em: 10 jan. 22.

REYES, K. A. E. *et al.* Rat Ultrasonic Vocalizations as an Index of Memory. **Neuroscience Letters**. v. 741, art. 135458, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135458>. Acessado em: 10 jan. 22.

RIEDE, T. Rat ultrasonic vocalization shows features of a modular behavior. **The Journal of Neuroscience**. v. 34, n. 20, p. 6874-6878, mai 2014. doi:10.1523/JNEUROSCI.0262-14.2014. Acessado em: 10 jan. 22.

SAH, P.; R. F. WESTBROOK, R. F.; UTHI, A.L. fear conditioning and long-term potentiation in the amygdala what really is the connection? **Annals New York Academy of Sciences**. Nova York, p. 88-95, 2008. doi: 10.1196/annals.1417.020. Acessado em: 10 jan. 22.

SAHA, S. BATTEN, T. F. C. HENDERSON, Z. A gabaergic projection from the central nucleus of the amygdala to the nucleus of the solitary tract: a combined anterogradetracing and electron microscopic immunohistochemical study. **Neuroscience** . v. 99, n. 4. p. 613-626, 2000. doi:10.1016/s0306-4522(00)00240-2.. Acessado em: 10 jan. 22.

SERVADIO, M. *et al.* Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autistic-like symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid. **Translational Psychiatry**. v. 6, n. 902, set 2016. doi:10.1038/tp.2016.182 27 September 2016. Acessado em: 10 jan. 22.

SERVADIO, M.; VANDERSCHUREN, L. J.; TREZZA, V. Modeling autism-relevant behavioral phenotypes in rats and mice: Do 'autistic' rodents exist? **Behav Pharmacol**. v. 26, n. 6, p. 522-540, set 2015. ISSN 1473-5849. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26226143>. Acessado em: 10 jan. 22.

SECKL, J. R. Glucocorticoids, feto-placenta 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, .and the early life origins of adult disease. **Steroids**. v. 62, n. 1, p. 89-94, jan 1997. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(96\)00165-1](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(96)00165-1). Acessado em: 10 jan. 22.

SECKL, J. R e MEANEY, M. Glucocorticoid Programming. **New York Academy of Sciences**. Nova York, p. 63-84, 2004. doi: 10.1196/annals.1314.006. Acessado em: 10 jan. 22.

SECKL, J. R. e HOLMES, M. C. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. **NATURE CLINICAL PRACTICE ENDOCRINOLOGY & METABOLISM**. v. 3, n. 6, p. 479-488, jun 2007. doi:10.1038/ncpendmet0515. Acessado em: 10 jan. 22.

SMITH, S. E. *et al.* Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. **J Neurosci**, v. 27, n. 40, p. 10695-702, out 2007. ISSN 1529-2401. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17913903>. Acessado em: 10 jan. 22.

SOSA-DIAZ, N. *et al.* Prefrontal cortex, hippocampus, and basolateral amygdala plasticity in a rat model of autism spectrum. **Synapse**. Puebla, v. 68, n. 10, p. 468-73, out 2014. ISSN 1098-2396. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24985713>. Acessado em: 10 jan. 22.

SOTRES-BAYON, F. BUSH.; D. E. A.; LEDOUX, J. E.; emotional perseveration: an update on prefrontal–amygdala interactions in fear extinction. **Learning & Memory**. v. 11 p. 525-535, 2004. <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/Im.79504>. Acessado em: 10 jan. 22.

SOUTH, M. *et al.* Better fear conditioning is associated with reduced symptom severity in autism spectrum disorders. **Autism Research**. v. 4 p. 412–421, 2011. DOI: 10.1002/aur.221. Acessado em: 10 jan. 22.

SPENCE, H. R. *et al.* Vocal coselection in rat pup ultrasonic vocalizations. **Ecol Evol**, v. 6, n. 7, p. 1922-1929, abr 2016. ISSN 2045-7758. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27066218>. Acessado em: 10 jan. 22.

SUN, Y.; GOOCH, H.; SAH, P.; Fear conditioning and the basolateral amygdala. **F1000Research**. p. 1-8, jun 2020. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21201.1>) Acessado em: 10 jan. 22.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 350, n. 1, p. 21–29, 1998. DOI: 10.1016/s0014-2999(98)00223-4. Acessado em: 10 jan. 22.

TAYLOR, P. V. *et al.* Sexually dimorphic effects of a prenatal immune challenge on social play and vasopressin expression in juvenile rats. **Biology of Sex Differences**. v. 3, n. 15, 2012. <http://www.bsd-journal.com/content/3/1/15>. Acessado em: 10 jan. 22.

TULINA, M. N. *et al.* The absence of tlr4 prevents fetal brain injury in the setting of intrauterine inflammation. **Reproductive sciences**. v. 26, n. 8, p. 1082-1093, 2019. DOI: 10.1177/1933719118805859. Acessado em: 10 jan. 22.

UMEDA, T. *et al.* Evaluation of Pax6 mutant rat as a model for autism. **PLoS One**. v. 5, n. 12, p. e15500, Dec 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21203536>. Acessado em: 10 jan. 22.

URAKUBO, A. *et al.* Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. **Schizophr Res**. v. 47, n. 1, p. 27-36, jan 2001. ISSN 0920-9964. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163542>. Acessado em: 10 jan. 22.

VANDERLEI, L. C. M *et al.* Basic notions of heart rate variability and its clinical applicability. **Rev Bras Cir Cardiovasc**. v. 24, n.2, p. 205-217, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-76382009000200018>. Acessado em: 10 jan. 22.

VANDERSCHUREN, L. J.; ACHTERBERG, E. J.; TREZZA, V. The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. **Neurosci Biobehav Rev**. Utrecht, v. 70, n. 16, p. 86-105, nov 2016. ISSN 1873-7528. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27587003>. Acessado em: 10 jan. 22.

VANDERSCHUREN, L. J.; TREZZA, V. What the laboratory rat has taught us about social play behavior: role in behavioral development and neural mechanisms. **Curr Top Behav Neurosci**. Utrecht, v. 16, p. 189-212, 2014. ISSN 1866-3370. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24338663>. Acessado em: 10 jan. 22.

VAN ROSMALEN, L.; VAN DER VEER, R.; VAN DER HORST, F.C.P. The nature of love: Harlow, Bowlby and Bettelheim on affectionless mothers. **History of Psychiatry**. v. 31, n. 2, p. 227-231, 2020. DOI: 10.1177/0957154X19898997. Acessado em: 10 jan. 22.

VILELA, F. C. *et al.* Maternal separation increases pain sensitivity by reducing the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus and noradrenergic neurons in locus coeruleus. **Neuroscience Letters**. v. 748, art. 135734, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135734>. Acessado em: 10 jan. 22.

VILELA, F. C. e GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid receptor agonist disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. **Behav Brain Res.** v. 263, p. 190-7, abr 2014. ISSN 1872-7549. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24495659>. Acessado em: 10 jan. 22.

VRIES, A *et al.* Prenatal dexamethasone exposure induces changes in non human primate offspring cardiometabolic and hypothalamicpituitary-adrenal axis function. **The Journal of Clinical Investigation.** v. 117, n. 4, abr 2007. doi:10.1172/JCI30982. Acessado em: 10 jan. 22.

XU, Z. *et al.* Spontaneous miscarriages are explained by the stress/glucocorticoid/lipoxin a4 axis. **The Journal of Immunology.** mai 2013. <http://www.jimmunol.org/content/190/12/6051>. Acessado em: 10 jan. 22.

WING, L. Clarification on asperger's syndrome. **Journal of autism and developmental disorders.** v. 16, n. 4, 1986. DOI:10.1007/BF01531716. Acessado em: 10 jan. 22.

YIRMIYA, R. *et al.* Behavioral effects of lipopolysaccharide in rats: involvement of endogenous opioids. **Brain Res.** v. 648, n. 1, p. 80-86, jun 1994. ISSN 0006-8993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7922530>. Acessado em: 10 jan. 22.

WÖHR, M e SCHWARTING, R. K. W. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. **Cell Tissue Res.** v. 354, p. 81-97, 2013. DOI 10.1007/s00441-013-1607-9. Acessado em: 10 jan. 22.

YASUMATSU, K. *et al.* Bacterial-induced maternal interleukin-17A pathway promotes autistic-like behaviors in mouse offspring. **Experimental Animals.** v .69, n. 2, p. 250-260, 2020. DOI:10.1538/expanim.19-0156. Acessado em: 10 jan. 22.

ZEIDAN-CHULIA, F. *et al.* The glial perspective of autism spectrum disorders. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 38, p. 160-72, jan 2014. ISSN 1873-7528. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24300694>. Acessado em: 10 jan. 22.

APÊNDICE

Behavioural Brain Research 414 (2021) 113503



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Hyperactivation of the amygdala correlates with impaired social play behavior of prepubertal male rats in a maternal immune activation model

Fernando Vitor-Vieira, Fabiana C. Vilela, Alexandre Giusti-Paiva*

Department of Physiological Sciences, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Alfenas-MG, Alfenas, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Autism
Lipopolysaccharide
Neurodevelopmental disorder
Neuroinflammation
Prefrontal cortex
Risk assessment
Striatum
Sickness behavior

ABSTRACT

Maternal infection during pregnancy is an environmental risk factor for neurodevelopmental dysfunction, such as autism spectrum disorder (ASD). This study investigated the effect of maternal immune activation (MIA) on the behavior profile of prepubertal offspring and whether MIA alters the neuronal activation pattern of brain areas related to social play behavior. Pregnant Wistar rats received 500 µg/kg of lipopolysaccharide or saline solution on gestational day 16. Their offspring were tested using behavioral tasks to capture some of the core and associated ASD-like symptoms. Neuronal activation, indexed via c-fos expression after social play behavior, was evaluated in several brain areas. MIA had a number of adverse effects on dams and reduced the number of successful births and litter size. MIA induced sex-specific autistic-like features by a reduction in ultrasonic vocalizations in response to separation from the mother and nest, reduction in discrimination between neutral odors and their nest odor, moderate effect in stereotypies in the hole-board test, impaired risk assessment phenotype, and reduction in social play behavior without changes in locomotor activity only in prepubertal male offspring. A decrease in social play behavior may be associated with a decrease in the number of c-fos-positive cells in the prefrontal cortex and striatum, but hyperactivation of the basolateral and basomedial amygdala. Prenatal immune challenge results in ASD-like symptoms such as impaired risk assessment behavior, communication, and social interactions in male prepubertal offspring. Impaired social play behavior is correlated with neuronal hyperactivation in the amygdala.

1. Introduction

Autism spectrum disorders (ASD) comprise a set of persisting neurodevelopmental conditions characterized by deficits in social interactions, persistent difficulties in verbal and nonverbal communication, and the presence of repetitive and stereotypical behaviors [1]. Symptoms appear in early childhood, persist throughout adulthood, and affect three times more males than females [2]. Although there are a number of genetic biomarkers associated with the severity of autism symptoms and co-morbidities [3], it is thought that ASD results from a complex interaction between genetic, environmental, and immunological factors [4,5].

There is increasing evidence that the immune system is involved in neuropsychiatric illnesses and that maternal infection or fever during pregnancy is a relevant environmental risk factor for neurodevelopmental brain dysfunction in offspring, including ASD marked by deficits in social interactions [6–8]. Social play is increasingly

recognized as an important social activity for humans and animals alike. It is intrinsically rewarding, supports social bonding, and in the long run, facilitates social, cognitive, and emotional development [9–12]. The ability to participate in social play is a principal indicator of healthy development [13]. However, the links between maternal immune activation (MIA)-mediated disturbances in fetal brain development, impaired brain function, and the occurrence of neuropsychiatric disorders are still unclear. Preclinical models of perinatal immune activation provide support for causal maternal physiological and offspring neural mechanisms of immune dysregulation in ASD [8,14,15]. Therefore, it is important to understand the brain mechanisms underlying social play behavior, not least because social deficits in child and adolescent psychiatric disorders remain very difficult to treat. Social behaviors are relevant to normal cognitive and social development and have been utilized as behavioral biomarkers for altered development in rodent models and humans [16]. Atypical or deficient social play behavior is often observed in children with ASD [17–22]. Similarly, social play is

* Corresponding author at: Laboratory of Translational Physiology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biomedical Sciences, Av. Jovino Fernandes Sales, 2600 Prédio E, Sala 300, 37133-840, Alfenas, MG, Brazil.

E-mail address: alexandre.paiva@unifal-mg.edu.br (A. Giusti-Paiva).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113503>

Received 18 March 2021; Received in revised form 12 July 2021; Accepted 26 July 2021

Available online 28 July 2021

0166-4328/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

impaired in several animal models of autism spectrum disorders [23–26], including models based on prenatal inflammation [27–31]. This study aimed to evaluate the effect of MIA on prepubertal offspring and whether the occurrence of MIA is correlated with the neuronal activation pattern of brain areas related to social play behavior.

This study aimed to evaluate the effect of MIA on prepubertal offspring. Using expression of the immediate-early gene *c-fos* as a marker, neuronal activity induced by social play behavior was mapped in the prefrontal cortex, striatum, and amygdala to evaluate whether the occurrence of MIA is correlated with the changes of neuronal activation pattern of brain areas related to social play behavior.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Nine-week-old adult Wistar nulliparous female rats were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Alfenas. Rats were housed in a temperature-controlled room (22 °C) on a 12 h light-dark cycle (lights on at 7:00 h) with access to water and food ad libitum. For the experiments, females were mated with sexually experienced males. Two females were housed with one male to allow for mating. Female rats were tested daily for the presence of sperm in the vaginal smear, and when the spermatozoa were found was designated as gestational day 0 (GD 0). Pregnant females were individually housed in transparent cages (42 cm × 34 cm × 16 cm). At GD 16, a single intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS, 500 µg/kg) from *E. coli* serotype 026:B6 (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) or saline (sterile NaCl 0.9 %, 1 mL/kg) was administered. Then, the pregnant rats' behavior was evaluated for 24 h (Baharnoori et al., 2012). These time points were chosen on the basis of previous behavioral, endocrine and neurochemical studies [32–34]. During gestation, each cage was checked for the presence of newborn pups to analyze the length of pregnancy. On the day of parturition, the number of living pups was recorded. Newborn litters found up to 05:00 p.m. were considered born on that day [postnatal day (PND) 1]. On PND 2, the litters were culled to eight animals (four males and four females). On PND 21, the pups were weaned and housed in groups of four. Experiments were carried out on male and female offspring during infancy (PNDs 5 and 13) and adolescence (PND 26–34). One male and one female pup per litter from different litters per treatment group were used in each experiment to avoid the litter effect [35]. All experimental procedures were approved by the Committee of Ethics in Animal Experimentation (#66/2017) of the Federal University of Alfenas, Minas Gerais State, Brazil. The following procedures were performed (Fig. 1).

2.2. Behavioral tests

2.2.1. Sickness behavior LPS-induced pregnant rats

Behaviors associated with sickness (anorexia and locomotor deficit)

were evaluated in pregnant rats after the administration of LPS. Food intake and weight loss were evaluated 24 h after the injection of LPS. Locomotor activity was evaluated at 2 h after LPS injection in a Plexiglass arena with a 60 cm diameter. The distance traveled and the time of immobility, which denote changes in motivational state, were analyzed using the EthoVision software (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA). Another set of animals were sacrificed and terminally anesthetized 2 h post LPS or saline. Blood samples from the animals were analyzed for plasma tumor necrosis factor α (TNF-α) using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits (PeproTech FunpecRP, Brazil) according to the manufacturer's instructions.

2.2.2. Maternal behavior

Maternal behavior was observed twice a day (from 09:00 to 10:30 a.m. and from 03:00 to 4:30 p.m.) on PNDs 3 and 4 and analyzed as previously described [36]. Data obtained from the observations on both days were pooled. The dam's behavior in the nest was observed and annotated (30 observations per period for a total of 120 observations per mother) every 3 min during each observation session. The maternal behaviors scored included licking the pups, arched behavior (the dam is on the offspring with the body arched: appropriate position for lactation), blanket behavior (the dam is on the offspring, but the body is not arched), passive behavior (the dam is lying on the side with the pups laterally positioned, or the dam is lying on its back with the pups on its lap: appropriate positions for lactation), and nest building. The non-maternal behaviors scored included feeding, self-grooming, non-exploration (e.g., sleeping), and exploration (e.g., rearing and wall rearing). Behavioral data are reported as percentages of the total number of behavioral observations (number of target behavior observations divided by the total number of all behavior observations × 100).

2.2.3. Isolation-induced ultrasonic vocalizations

On PND 5, one male and one female pup from each litter were assessed for ultrasonic vocalizations (USVs), as previously described [37]. Briefly, each pup was separated from its littermates and placed in a sound-attenuating and temperature-controlled chamber. Pup USVs were detected for 3 min using an ultrasonic microphone sensitive to frequencies between 10 and 100 kHz, connected to a computerized acquisition system (ML 221 PowerLab, ADInstruments, Australia).

2.2.4. Homing behavior test

On PND 13, one male and one female pup from each litter were separated from the dam and kept for 30 min in a temperature-controlled holding cage. Then, each pup was placed into a Plexiglas box whose floor was 1/4 covered with bedding from the pup's home cage and 3/4 covered with clean bedding. The pup was located at the side of the box covered with clean bedding, and its behavior was recorded for 4 min to analyze the latency to reach the nest bedding area [37,38].

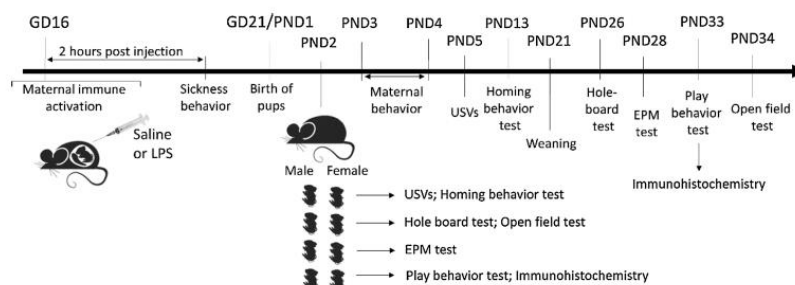


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental design. EPM: Elevated plus-maze; GD: gestational day; LPS: lipopolysaccharide; PND: postnatal day; USV: Ultrasonic vocalizations.

2.2.5. Hole-board test

On PND 26, the rats were individually placed in the hole-board apparatus, which consisted of a square arena (40 cm × 40 cm) with a black background and 16 equidistant holes that were 3 cm in diameter. Their behavior was recorded for 5 min. Head dips were counted when the animal dipped its head to the medial third of the ear, covering the eyes with the hole of the plaque [37].

2.2.6. Elevated plus-maze (EPM) test

On PND 28, the rats were placed in the center of the EPM apparatus, comprising a central part (10 × 10 cm), two opposing open arms (50 × 10 cm), and two opposing closed arms (50 × 10 × 50 cm), facing an open arm to initiate a 5 min session test. During the 5 min trial, the time spent in the open arms and the number of stretched-attend postures were measured to evaluate anxiety-like behavior and risk-assessing behavior [39,40].

2.2.7. Social play behavior test

The testing arena was a Plexiglas cage (40 cm × 40 cm × 60 cm), with approximately 2 cm of wood shavings covering the floor. On PND 30–32, pups from the saline (n = 8) and LPS-exposed groups (n = 8) were individually habituated to the test cage for 10 min each day. On the test day (PND 33), half of the pups were socially isolated for 3.5 h before testing, and the other half were kept in their normal groups. The isolation period was used to induce an increase in the amount of social play behavior [41]. The test consisted of placing two animals belonging to the same experimental group in the test cage for 15 min. Pups were paired with an unfamiliar partner (i.e., not a cage mate) and did not differ in body weight by more than 10 g [42]. In rats, social play behavior typically starts with one rat soliciting (“pouncing”) another rat by attempting to nose or rub the nape of its neck. The animal that is pounced upon can respond in different ways: if the animal that is pounced upon fully rotates to its dorsal surface, “pinning” is the result (i.e., one animal lies in a supine position while the other animal stands over it) [38]. Pouncing and pinning frequencies can be easily quantified and are the most characteristic parameters of social play behavior in rats. However, animals may also display social behaviors during a social encounter that are not directly associated with play, such as sniffing or grooming of the partner [43].

After 90 min, the isolated offspring were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg) and then transcardially perfused with ice-cold 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.2). The brains were removed, post-fixed for 4 h in the perfusion solution, and stored at 4 °C in PB containing 30 % sucrose.

2.2.8. Locomotor activity

On PND 34, the locomotor activity was quantified for 5 min in a Plexiglass arena (60 cm diameter). Each rat was individually placed in the center of the apparatus, and the distance traveled was analyzed using EthoVision software installed on a compatible computer located in an adjacent room [37]. The arena was carefully cleaned with a 5 % ethanol solution after each test.

2.3. Immunohistochemistry

Coronal sections that were 30 μm thick were obtained using a cryostat. Subsequently, immunohistochemistry was performed to stain for c-fos. Specifically, sections were processed for fos immunoreactivity (fos-ir) after overnight incubation at room temperature with rabbit anti-fos antibody (AB-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA) and diluted 1:10,000 in 0.1 M PB containing 2 % normal goat serum and 0.3 % Triton X-100. Free-floating sections were washed with PB and incubated first with goat biotin-labeled anti-rabbit immunoglobulin (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA, 1:200 in PB) for 1 h at room temperature. Immunoperoxidase labeling was detected using diaminobenzidine hydrochloride intensified with 1% cobalt chloride

and 1 % nickel ammonium sulfate, which generates a blue-black reaction product [44]. The sections were mounted on gelatinized slides, air-dried overnight, dehydrated, cleared in xylene, and placed under a coverslip with Entellan (New Jersey, USA). The areas of interest for our analysis were anterior cingulate cortex (ACC), prelimbic cortex (PrL), anterior piriform cortex (APC), agranular insular dorsal cortex (AId), agranular insular ventral cortex (AIV), nucleus accumbens shell (NAS), nucleus accumbens core (NAc), habenula (Hb), basomedial amygdala (BMA), and basolateral amygdala (BLA). The fos-IR areas were quantified using a computerized system that included a Nikon Eclipse 80i microscope equipped with a DS-R1 Nikon digital video camera attached to a contrast enhancement device. The sections that were counted were selected based on similarities between the experimental and control groups according to neuroanatomical clues provided by a rat brain atlas [45]. Fos-IR neurons in the area were counted at only one level because of the neuroanatomical and neurofunctional differentiation found within the anteroposterior axis. Counts were performed unilaterally in one section per animal. The threshold for positive staining was individually established by two investigators who were blinded to the experimental conditions.

2.4. Data analysis

Data were analyzed using GraphPad version 8.0 and are expressed as the mean ± standard error of the mean. Data normality was analyzed using the Shapiro-Wilk test followed by the Student's *t*-test. To evaluate the weight gain of offspring, dam treatment (saline and LPS) and age factors were subjected to a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Tukey post hoc test. A *p*-value of < 0.05 was considered statistically significant. Cohen's *d* analysis was used to evaluate the effect sizes (ES) between the groups. The ES were interpreted as trivial ($d < 0.2$), small ($0.2 \leq d < 0.5$), moderate ($0.5 \leq d < 0.8$), large ($0.8 \leq d < 1.2$), very large ($1.2 \leq d < 2.0$), and large ($d > 2.0$). For the two-way ANOVA test statistic, we calculated eta-squared (η^2) as the ES. η^2 was calculated by dividing the Type III sum of squares of the factors of interest by the total sum of squares. The ES were interpreted as follows: $0.01 \leq \eta^2 < 0.06$ indicates a small effect, $0.06 \leq \eta^2 < 0.14$ indicates a moderate effect, and $\eta^2 \geq 0.14$ indicates a large effect (Hopkins, 2000). Pearson correlations were used to test for correlations between *c*-fos staining data and frequency of social play behavior (pouncing and pinning). Spearman's correlation was used for the visual inspection of scatter plots indicating heteroscedasticity. Correlations were evaluated as follows: small (0.10–0.29), moderate (0.30–0.49), large (0.50–0.69), very large (0.70–0.89), nearly perfect (0.90–0.99), and perfect (1.0) [35,46,47].

3. Results

The MIA with LPS induced a suite of sickness responses, including reduction in food intake ($P < 0.001$; Fig. 2A), weight loss ($P = 0.004$; Fig. 2B), and reduction in locomotor activity characterized by a reduction in the distance traveled ($P = 0.022$; Fig. 2C) and increased immobility time ($P = 0.038$; Fig. 2D) in the open field arena compared to control dams. These responses were associated with an increase in the plasma levels of TNF- α ($P < 0.001$; Fig. 2E). The number of successful births was reduced in those treated with LPS (47 % successful pregnancies) compared to the control group (100 % successful pregnancies). Pregnancy success was defined as the birth of at least one live pup. The dams submitted to MIA showed reduced litter size ($P = 0.006$; Fig. 3A) relative to litters born of control dams, and pup weight at PND 1 ($P = 0.02$; Fig. 3B). However, no differences in weight gain were found in both males (treatment factor: $F_{1,146} = 2.47$, $P = 0.11$, $\eta = 0.011$; age factor: $F_{6,146} = 931.8$, $P < 0.001$, $\eta = 2.2$; interaction: $F_{6,146} = 0.33$; $p = 0.91$; $\eta = 0.01$; Fig. 3C) and females (treatment factor: $F_{1,147} = 10.7$, $P = 0.001$, $\eta = 0.039$; age factor: $F_{6,147} = 889.9$, $P < 0.001$, $\eta = 19.5$; interaction: $F_{6,147} = 0.70$; $p = 0.64$; $\eta = 0.01$; Fig. 3D) during the

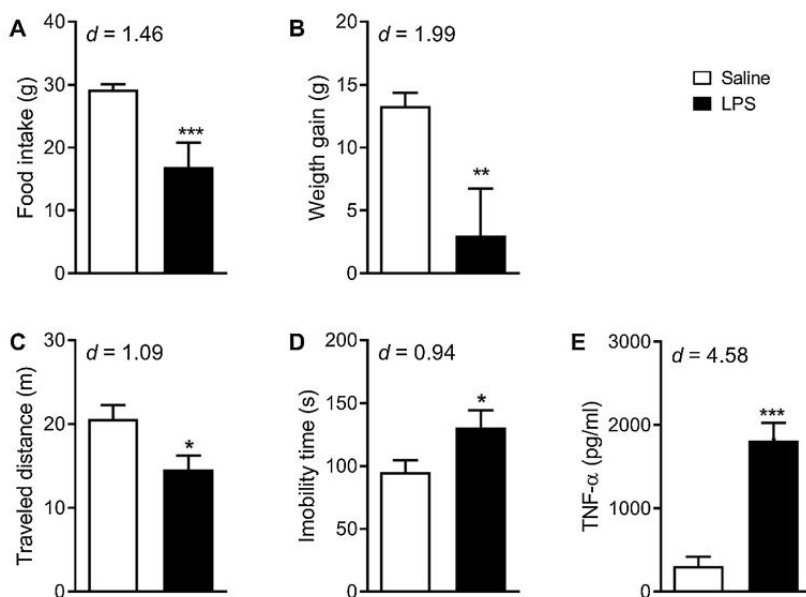


Fig. 2. Lipopolysaccharide (LPS) induces sickness behavior in pregnant rats. LPS (500 µg/kg b.w.) or sterile saline was injected intraperitoneally to pregnant rats on gestation day 16. The food intake, body weight, and activity in the open field were recorded. A second set of animals treated the same way were terminally anesthetized 2 h post LPS or saline for plasma tumor necrosis factor α (TNF-α) determination. Food intake (A) and change in body weight (B) 24 h post the injection of LPS or saline. TNF-α plasma levels (E). Data are presented as the mean ± SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to the control group using a *t*-test. The effect sizes were interpreted as small ($0.2 \leq d < 0.5$), moderate ($0.5 \leq d < 0.8$) and large ($d \geq 0.8$).

evaluation period.

Maternal behavior was observed twice daily on PNDs 3 and 4. The data obtained from the observations of both days revealed that LPS-exposed dams showed an increased percentage of total maternal behaviors ($p = 0.016$) and decreased total non-maternal behaviors ($P = 0.016$, Fig. 3E). The total maternal behavioral analysis revealed that LPS-exposed dams showed a significant increase and a large effect in arched ($P = 0.018$) and blanket ($P = 0.031$) nursing compared to control dams. In contrast, the analysis of total non-maternal behaviors showed that LPS-exposed dams displayed a significant decrease in the percentage of total exploration ($P = 0.043$) and non-exploring ($P = 0.035$) behaviors (Fig. 3E).

Male offspring from LPS-exposed dams showed a decrease in USVs when separated from their littermates ($P = 0.019$; Fig. 4A), an increase in latency to reach the nest bedding in the homing test ($P = 0.006$; Fig. 4B), a moderate effect in head dipping in the hole-board test ($P = 0.09$; Fig. 4C), an increase in the percentage of time spent in the open arms ($P = 0.04$; Fig. 4D), and reduction in stretched-attend postures ($P < 0.001$; Fig. 4E) on EPM compared to the male offspring of control dams. We observed a negative correlation between the number of stretched-attend postures (index of risk assessment behavior) and the time spent in the open arm ($r = -0.44$; $P = 0.012$). In these tests, female offspring showed a small effect and were not significantly different between the groups (Fig. 4G-K). Neither male nor female offspring showed a change in locomotor activity in the open field test (Fig. 4G and L, respectively, male and female offspring), indicating that differences in behavior between the saline and LPS groups cannot be attributed to a locomotor deficit.

In the social play behavior test, male offspring from LPS dams presented a large effect and significant reduction in pouncing ($P = 0.006$; Fig. 5A) and pinning ($P = 0.017$; Fig. 5B) compared with control rats, which is considered the most characteristic posture of social play behavior in rats. The male offspring from LPS dams showed reduced following behavior ($P = 0.004$; Fig. 5C). However, no reductions were found in the time spent sniffing the test partner ($P = 0.76$; Fig. 5D). There was a trivial or small effect and no significant difference in the respective analyzed parameters in female offspring (Fig. 5E-H). For this reason, we also examined c-fos staining in the central processing regions

of play behavior only in the male offspring of both LPS- and saline-exposed dams.

Table 1 shows the number of c-fos-labeled neurons in the cerebral areas of male offspring from control and LPS-exposed dams after the play behavior test. The LPS group showed a large effect with a reduced number of c-fos labeled neurons in the anterior cingulate cortex (ACC), agranular insular dorsal cortex (Ald), agranular insular ventral cortex (AIV), nucleus accumbens shell (NAs), and nucleus accumbens core (NAc), a moderate effect in the prelimbic cortex (PrL) and anterior piriform cortex (APC), and a small effect on the habenula. The pattern of c-Fos in the prefrontal cortex, striatum, and amygdala of male adolescent offspring after the social play behavior test of representative coronal sections from each group is presented in Fig. 6. On the other hand, there was a large effect and a significantly higher number of c-fos-labeled cells in the basomedial amygdala (BMA) and basolateral amygdala (BLA). The frequency of a specific behavioral activity (pouncing and pinning) may be expected to correlate with the number of c-fos labeled in the brain regions driving this activity. Pearson correlations showed a significant positive correlation between c-fos-labeled and play behavior [moderate: ACC, PrL, APC, Ald, AIV, Hab (Fig. 7A, B, C, D, E and H respectively); large: NAs (Fig. 7F); very large: NAc (Fig. 7G)]. A large inverse correlation was detected between c-fos-labeled BMA (Fig. 7I) and BLA (Fig. 7J) and the frequency of play behavior.

4. Discussion

This study describes the acute effects of the systemic administration of LPS-induced sickness syndrome in pregnant rats and autism-like behavioral outcomes in prepubertal offspring, such as impaired communication, and social interactions. In addition, we correlated the activation of brain areas with a reduction in social play behavior parameters in the male offspring of rats subjected to prenatal immune challenge. The MIA model provides a translational tool for exploring the effects of prenatal immune challenge on the brain and behavioral impairments in offspring [33,48–52].

The activation of the immune response by LPS elevated the maternal serum concentration of TNF-α and induced a suite of sickness responses in pregnant rats, including a reduction in motor activity and weight loss

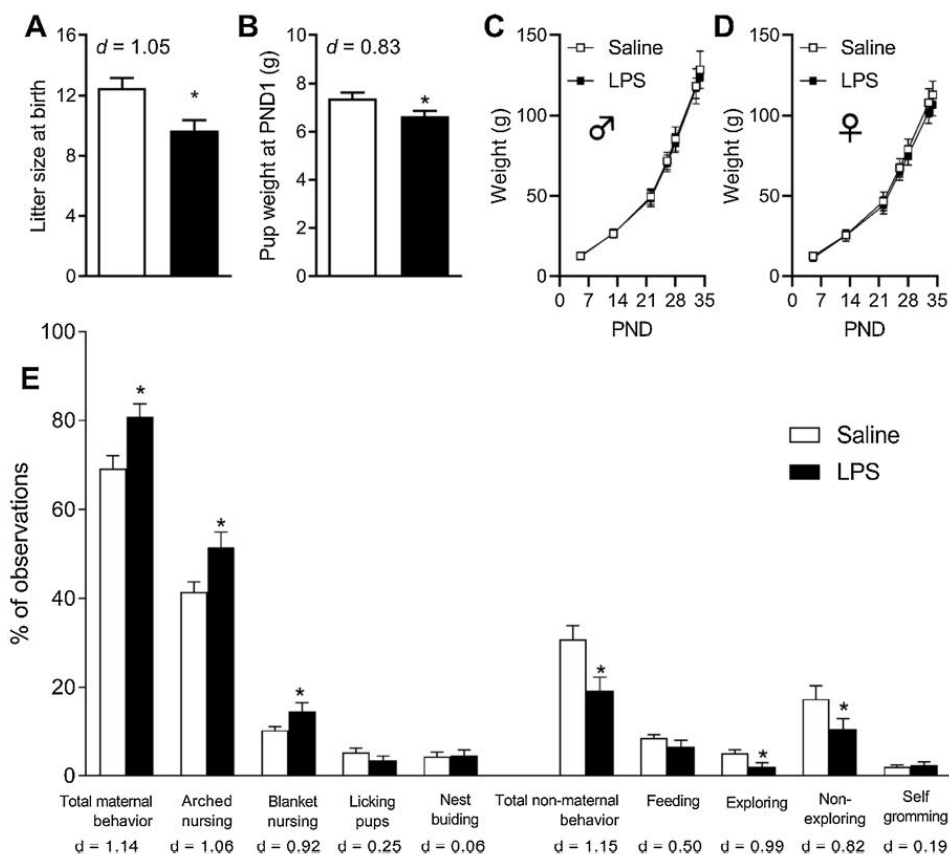


Fig. 3. Effects of maternal immune activation induced by saline or lipopolysaccharide (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) at GD 16 on litter size at birth (A) and pup weight at PND 1 (B). On PND 2, the litters were culled to eight animals (four males and four females) to evaluate the time course of weight gain of male (C) and female (D) offspring and maternal behavior at PND 3 and PND 4 (E). Data are presented as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared to the control group using a t -test. The effect sizes were interpreted as small ($0.2 \leq d < 0.5$), moderate ($0.5 \leq d < 0.8$) and large ($d \geq 0.8$).

as a result of the anorexic behavior. Due to its early increase in the blood during systemic inflammation, TNF- α is a good candidate for mediating the onset of LPS-induced sickness behavior [53,54]. Furthermore, the above studies linked LPS-induced pro-inflammatory cytokines (e. g., TNF- α) to pregnancy success and fetal death [55–60]. In fact, the number of successful births and litter size was reduced. Therefore, even those females that had successful pregnancies had impaired reproductive output compared to the control group.

Numerous sensory cues regulate maternal behavior, and the sensing of infant cues is greatly enhanced at parturition [61]. Arched-back nursing represents the major form of active nursing and plays a crucial role in neonatal thermoregulation and cellular metabolism for the adequate development of offspring [62]. Maternal behavior is regulated by olfactory and auditory stimuli associated with the pups. Dodecyl propionate from pups' preputial glands has been demonstrated to provide chemosignals regulating maternal behavior [63]. The rat mothers may discriminate the sex of their offspring, and maternal behavior toward individual pups varies according to the sex of the pup, such that males usually receive more attention from their mother than females [61,64]. In addition to olfactory stimuli, ultrasonic calls emitted by pups when they are isolated from their mother and/or littermates, or by changes in body temperature, are thought to trigger maternal behavior [63,65,66]. The long-term consequences of maternal care

should be considered as a putative factor that mediates the behavioral consequences on offspring [67].

The offspring of dams that showed high levels of pup licking, grooming, and arched-back nursing showed increased hippocampal synaptogenesis, increased expression of NMDA receptor subunit and brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus, and enhanced spatial learning and memory [68,69]. Furthermore, the offspring of low-licking/grooming dams display more anxiety- and depression-like behaviors, suggesting that differences in early maternal care may be considered as modulators of mood disorder development [70–73]. We cannot identify the cues by which low-birth-weight pups from mothers treated with LPS demand greater maternal care. However, the offspring phenotype was not associated with poor maternal care.

We found that MIA, an environmental risk factor for neurodevelopmental disorders, induced sex-specific autistic-like features by a reduction in USVs in response to separation from the mother and the nest, reduction in discrimination between a neutral odor and their nest odor, moderate effect in stereotypies in the hole-board test, impaired risk assessment phenotype, and reduction in social play behavior without affecting locomotor activity only in prepubertal male offspring.

The analysis of the USVs emitted by rodent pups in response to separation from the mother and the nest is useful, and this can have implications for the knowledge and identification of

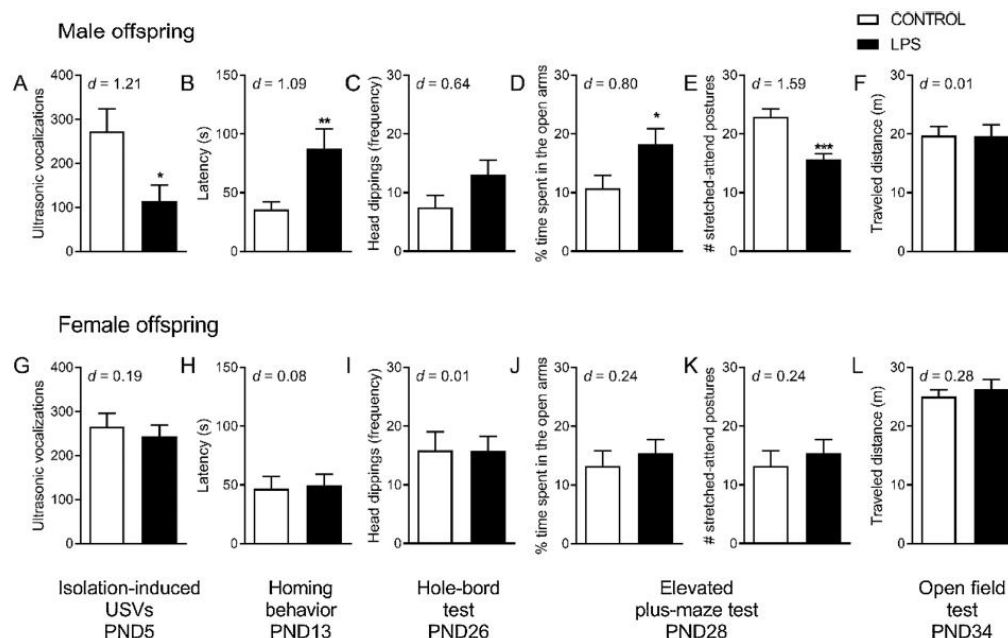


Fig. 4. Effect of maternal immune activation (MIA) on the behavior profile of male (A-F) and female (G-L) prepuberal offspring. MIA induced sex-specific autistic-like behaviors from the following tests: ultrasonic vocalizations in response to separation from the mother and the nest (A and G) at PND 5, reduction in the discrimination between a neutral odor and their nest odor in the homing behavior test at PND 13 (B and H), stereotypies (head dipping) in the hole-board test at PND 26 (C and I), percentage of time spent in the open arms (D and J) and stretched-attend postures (E and K) on the elevated plus-maze test at PND 28. Both male (F) and female (L) offspring did not show any locomotor activity changes in the open field test at PND 34. Data are presented as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to the control group using a *t*-test. The effect sizes were interpreted as small ($0.2 \leq d < 0.5$), moderate ($0.5 \leq d < 0.8$) and large ($d \geq 0.8$).

neurodevelopmental disorders, including rodent models of ASD-like symptoms [59,74,75]. These USVs play an essential communicative role in mother-offspring interactions and are crucial for pup survival. Furthermore, the homing behavior test evaluates the ability of mice to discriminate their home cage odor from a neutral odor, an early indicator of social discrimination [38]. Our results indicate that male pups from LPS-exposed dams show deficits in social communication and social discrimination. The sex-related differences observed in the behavioral tests may be due to sex-specific alterations of the nervous system during development. Previous reports have shown that the behavioral indications of olfactory impairments in infant rats prenatally treated with LPS can be related to decreased dopamine levels in the olfactory bulb [76]. The sex differences in anti-inflammatory responses (higher levels of mRNA for IL-10 and its receptor IL-10ra) in female mouse pups from maternal immune activation induced by polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C) raise the possibility of protective (resilience-related) processes that reduce the prevalence of ASD-like signs in females [77]. However, genes linked to sex chromosomes and hormonal changes may underlie these differences.

Stereotypies and/or restricted interests are the second core symptoms of ASD [78,79]. Accordingly, LPS-exposed male rats, but not female rats, showed a moderate effect, but not significant, on stereotypies on the hole-board test. Furthermore, anxiety is a common co-morbid feature displayed by patients with autism [80,81], and studies have outlined sub-optimal risk assessment in individuals with ASD, partially explaining the rate of higher mortality and self-injury [82]. We found that LPS-exposed male, but not female, rats showed an anxiolytic-like and impaired risk assessment phenotype. Risk assessment behavior comprises information-gathering behaviors displayed in potentially threatening situations, the function of which is to optimize the most adaptive behavioral strategy. Similarly, Oron and colleagues showed

that genetic models of ASD [CASPR2 KO, SHANK3b KO (exon 13–16), Chr16p11.2df, and BTBR] exhibit anxiolytic behavior and deficient risk assessment behavior [83]. South and colleagues suggest that high anxiety in children and adolescents with ASD leads to increased motivation due to a fear of failure, indicating that anxiety associated with ASD may manifest differently from classic anxiety [80,82]. Risk assessment behavior has not previously been characterized in MIA induced ASD-like symptoms in rats.

Social play behavior has been observed in most mammalian species, including humans [84]. Social interactions in adolescent rodents help guide the practice of behaviors in a mock form that will later form part of the adult behavioral repertoire (e.g., sexual and aggressive behaviors) [85,86]. In the laboratory, it is easy to see if animals have been deprived of playful social interactions for some time prior to being observed [41, 84]. When such rat pups are placed together in a non-threatening environment, they rapidly begin to exhibit vigorous social interaction in that animals chase and pounce on each other, sometimes unilaterally, sometimes mutually, with rapid role reversals. They repeatedly poke and nip each other, often at the nape of the neck, but also on the ventral surface when one animal is pinned [41,84]. Our results showed a sexually dimorphic effect since only males from LPS-exposed dams exhibited reduced social play behavior characterized by a reduction in pouncing and pinning frequency compared to those from control offspring.

Social play is a rewarding behavior, and information about the neural substrates involved in social play behavior deficits of the offspring of MIA-dams is limited. Therefore, to understand the neurobiology of social play in this model, the cellular activity after social play using the immediate early gene *c-fos* as a marker was utilized. Social play behavior alters *c-fos* expression in several brain regions [85]. Previous studies have reported that social play behavior induces a

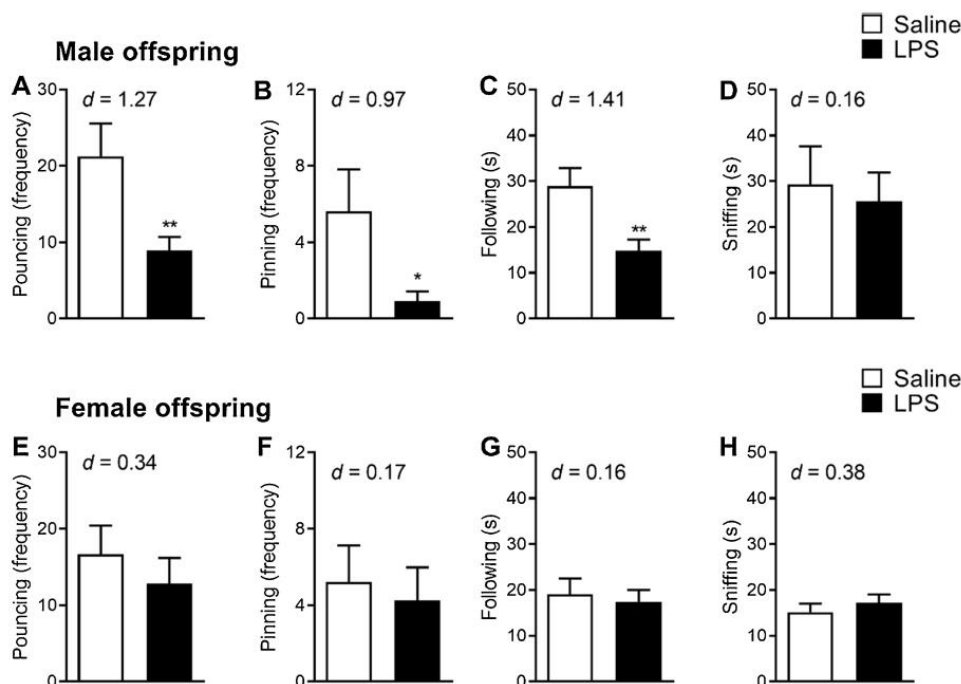


Fig. 5. Lipopolysaccharide (LPS)-exposed rats showed the sex-specific effect on social play behavior. Male LPS-exposed rats showed a reduced frequency of pouncing (A), pinning (B), and following time (C) but did not alter their sniffing behavior (D) compared to the control group. No behavioral changes were observed in LPS-exposed females compared to the control group (E-H). Data are presented as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to the control group using a *t*-test. The effect sizes were interpreted as small ($0.2 \leq d < 0.5$), moderate ($0.5 \leq d < 0.8$) and large ($d \geq 0.8$).

Table 1

Number of c-Fos-labeled neurons induced by social play behavior in the cerebral areas of the offspring of control dams or dams prenatally submitted to maternal immune activation (MIA).

Cerebral areas	Experimental groups		<i>t</i> -test P-value	Effect size Cohen's <i>d</i>
	Control	MIA		
ACC	294.7 \pm 66.0	118.4 \pm 23.8*	0.03	1.21
PrL	247.1 \pm 50.4	156.3 \pm 41.6	0.18	0.73
APC	370.1 \pm 96.6	248.3 \pm 28.1	0.24	0.60
Ald	31.0 \pm 8.22	12.8 \pm 5.8	0.09	0.90
Alv	53.6 \pm 11.5	30.5 \pm 8.3	0.13	0.81
NAs	132.4 \pm 38.3	42.8 \pm 11.4*	0.03	1.19
NAC	79.3 \pm 25.6	33.0 \pm 14.9	0.13	0.83
Hb	35.7 \pm 8.1	29.0 \pm 4.1	0.48	0.38
BMA	7.4 \pm 2.3	30.7 \pm 7.2*	0.01	1.54
BLA	19.5 \pm 6.4	49.1 \pm 11.0*	0.04	1.25

Values are the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ when compared to the control group using a *t*-test. The effect sizes were interpreted as small ($0.2 \leq d < 0.5$), moderate ($0.5 \leq d < 0.8$), and large ($d \geq 0.8$). $n = 6$ per group. ACC, anterior cingulate cortex; PrL, prelimbic cortex; APC, anterior piriform cortex; Ald, agranular insular dorsal cortex; Alv, agranular insular ventral cortex; NAs, nucleus accumbens shell; NAC, nucleus accumbens core; Hb, habenula; BMA, basomedial amygdala; BLA, basolateral amygdala.

heterogeneous c-fos expression pattern in several prefrontal regions, including the dorsal region of the medial prefrontal cortex (ACC and PrL) and agranular insular regions, Ald and Alv, compared with naive animals, suggesting that the various prefrontal subregions may have a different role in modulating social play behavior [35,86,87]. Similar to the prefrontal cortex, the different subregions of the striatum, including the NAC and NAs, were activated by social play behavior. Correlations

between the c-fos activity of the medial prefrontal/agranular insular regions and striatal regions were reported by van Kerkhof et al. [87], who suggested a corticostriatal projection that is activated during social play behavior. Rats with neonatal ablations of the medial prefrontal cortex exhibited fewer playful responses and evaded when pinned compared to sham-lesioned rats [86]. Furthermore, neonatal dopamine depletion in the striatum causes rats to use less complex defense strategies during a playful encounter and be more likely to switch to other behavior types [88], resembling the effect of neonatal lesions of the medial prefrontal cortex. Temporary pharmacological inactivation using GABA agonists decreases pinning, pouncing, and total play duration when administered to the PrL infralimbic cortex, orbitofrontal cortex, and habenula but increases the total time spent on social play behavior when administered in the NAC [42,89]. Methylphenidate, an inhibitor of dopamine and norepinephrine reuptake transporters, is a psychostimulant drug used as a first-line treatment for attention-deficit hyperactivity disorder and suppresses play behavior when administered in the ACC, habenula, and BLA [42,90]. Social play is a rewarding activity that affects both the habenula and BLA. Therefore, inhibition of these and the prefrontal regions with methylphenidate may have influenced the cognitive aspects of social play behavior [42,90,91]. The prelimbic and infralimbic cortices reciprocally innervate the ACC, and both have reciprocal connections with the BLA and BMA. The infralimbic cortex also sends innervation to the habenula. Both the basolateral amygdala and habenula innervate the prefrontal cortex via the mediodorsal thalamus [92]. The insular cortex estimates risk and guides decision-making under uncertainty. Moreover, lesions of the human and rodent insula result in changes in decision-making under circumstances that involve uncertain rewards and risks [93]. In humans, the insular cortex is a neuronal substrate for empathy [93]. We observed a moderate or large

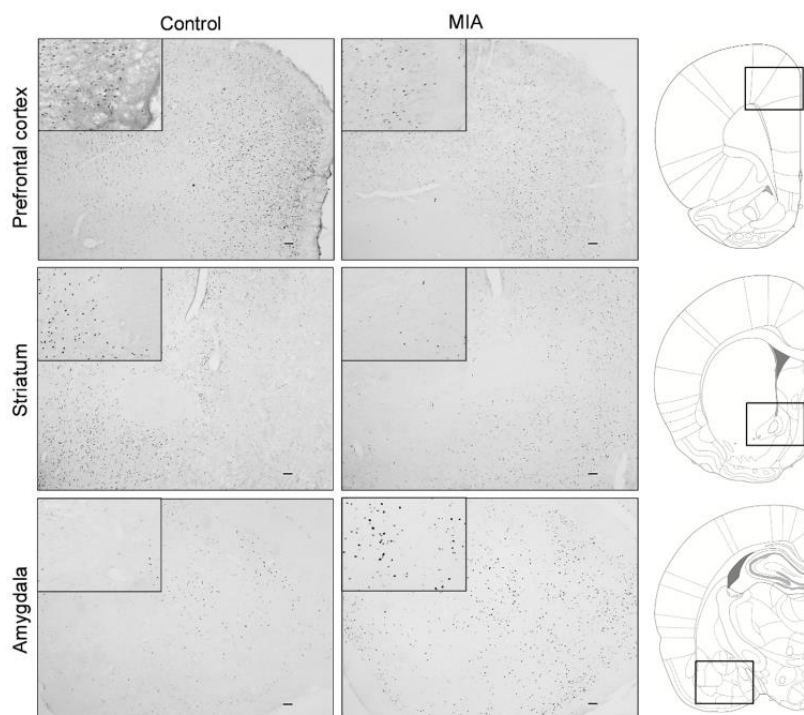


Fig. 6. Representative photomicrographs showing immunoreactivity for c-fos in the prefrontal cortex (bregma 3.00 mm), striatum (bregma 0.72 mm), and amygdala (bregma -2.52 mm) of male adolescent offspring after the social play behavior test and respective diagrammatic representations of the coronal sections. Scale bar: 100 μ m. The coordinates were based on the rat brain atlas of Paxinos and Watson [45].

effect reducing c-fos activation in brain areas (ACC, PrL, APC, AId, Alv, NAS, and NAc) after the social play section in offspring from dams subjected to MIA compared to control animals. Furthermore, the c-fos activation pattern was positively correlated with the expression of play behavior in several brain regions, except for the BLA and BMA. Our present data supports our hypothesis that the reduction of social play behavior in offspring from dams subjected to MIA is not exerted through a single neural substrate once the pattern of neural activation of several cerebral areas and relevant neurobiological substrates for social play behavior differs from the activation pattern observed in control animals. Furthermore, we observed an increase in the c-fos activation of BLA and BMA in offspring from dams subjected to MIA compared to control animals, which was negatively correlated with the expression of play behavior.

The amygdala has been implicated as a key component of the social cognitive circuitry, and the role of the amygdala in determining the core social characteristics in ASD has been demonstrated in pediatric sMRI studies that have found increased total amygdala volumes in young children with ASD relative to controls [94,95]. Abnormalities within the fronto-limbic networks, including the amygdala, have been associated with social communication deficits, and structural abnormalities in these regions have been linked to ASD symptomatology [96–99]. Previous studies have shown that in rodents, the social play section does not induce c-fos activity expression in the entire amygdala in rats [87,100] but increases the BLA of mice [101]. In addition, electrolytic lesions of the amygdala in juvenile rats (PND 21) reduced social play behavior [102], and pharmacological modulation of social play behavior with psychomotor stimulants such as methylphenidate inhibits social play [90]. Previous findings in heterozygous PTEN mutant mice (Pten+/-), a model of macrocephaly/autism syndrome, showed hyperconnectivity

and hyperactivity in the medial prefrontal cortex-amygdala circuitry characterized by excessive c-fos reactivity on the prefrontal cortex and BLA in response to social cues that contribute to social interaction deficits [101]. Impaired social play behavior in valproate-induced rat autistic phenotypes has been attributed to GABA dysfunction or alterations in inhibitory/excitatory balance in limbic structures, including the amygdala [103,104]. These studies support our hypothesis that hyperactivation of the amygdala is involved in social play behavior deficits in the offspring of MIA-dams.

The lack of specific pharmacological treatments for neuropsychiatric diseases, such as ASD, highlights the need for a greater understanding of the neural mechanisms that mediate social behaviors. Overall, our study demonstrates that prenatal immune challenge results in ASD-like symptoms such as impaired risk assessment behavior, communication, and social interactions in male prepubertal offspring. In addition, this study provides new evidence that impaired social play behavior is correlated with neuronal hyperactivation in the amygdala.

CRedit authorship contribution statement

FV-V participated in study concept and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript for important intellectual content. FCV and AG-P participated in study concept and design, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript for important intellectual content, administrative, technical, or material support, and study supervision.

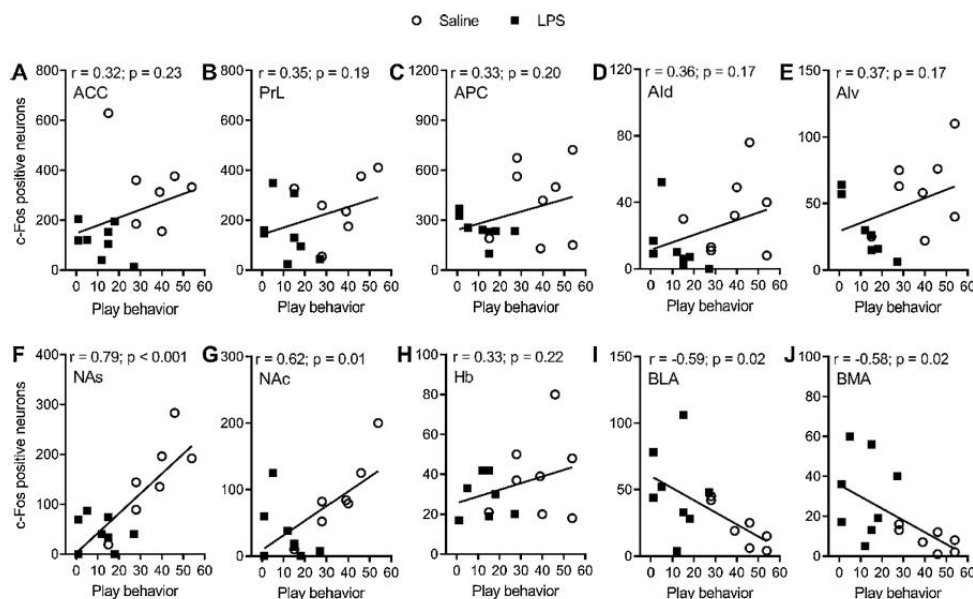


Fig. 7. Correlation between the parameter of play behavior (frequency of pouncing and pinning) and the amount of c-fos-expression on several brain areas. Scatter and line plots showing a positive correlation between play behavior and c-fos expression and a negative correlation between play behavior and c-fos expression in the BMA and BLA. The slope of each line (correlation coefficient, r) and p -value of the correlation analysis are shown for each scatter plot. The correlations were evaluated as follows: small (0.10-0.29), moderate (0.30-0.49), large (0.50-0.69), very large (0.70-0.89), nearly perfect (0.90-0.99), and perfect (1.0). ACC: anterior cingulate cortex; PrL: prelimbic cortex; APC: anterior piriform cortex; Ald: agranular insular dorsal cortex; Alv: agranular insular ventral cortex; NAs: nucleus accumbens shell; NAc: nucleus accumbens core; Hb: habenula; BMA: basomedial amygdala; BLA: basolateral amygdala.

Declaration of Competing Interest

All authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

We would like to thank José Reis for his technical assistance and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; PNPD and Pró-equipamentos).

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; #APQ-3346-18) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; #308762/2017-7, AG-P; # 311709/2018-4, FCV and #429035/2018-7 FCV).

References

- [1] R. Blanc, J.L. Adrien, S. Roux, C. Barthelemy, Dysregulation of pretend play and communication development in children with autism, *Autism* 9 (2005) 229–245, <https://doi.org/10.1177/1362361305053253>.
- [2] R. Loomes, L. Hull, W.P.L. Mandy, What is the male-to-Female ratio in autism Spectrum disorder? A systematic review and meta-analysis, *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 56 (2017) 466–474, <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2017.03.013>.
- [3] G. Bjorklund, N.A. Meguid, A. El-Ansary, M.A. El-Bana, M. Dadar, J. Anseth, M. Hemimi, J. Osredkar, S. Chirumbolo, Diagnostic and severity-tracking biomarkers for autism Spectrum disorder, *J. Mol. Neurosci.* 66 (2018) 492–511, <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1192-1>.
- [4] A.M. Persico, T. Bourgeron, Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues, *Trends Neurosci.* 29 (2006) 349–358.
- [5] D. Dufour-Rainfray, P. Vourch, S. Tourlet, D. Guilloteau, S. Chalou, C.R. Andres, Foetal exposure to teratogens: evidence of genes involved in autism, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35 (2011) 1254–1265, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.12.013>.
- [6] H.Y. Jiang, L.L. Xu, L. Shao, R.M. Xia, Z.H. Yu, Z.X. Ling, F. Yang, M. Deng, B. Ruan, Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis, *Brain Behav. Immun.* 58 (2016) 165–172, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.06.005>.
- [7] A.H. Miller, E. Haroon, J.C. Felger, The immunology of behavior—exploring the role of the immune system in brain health and illness, *Neuropsychopharmacology* 42 (2017) 1–4, <https://doi.org/10.1038/npp.2016.229>.
- [8] M. Cieslik, M. Gąssowska-Dobrowolska, H. Jęsko, G.A. Czapski, A. Wilkaniec, A. Zawadzka, A. Dominiak, R. Polowy, R.K. Filipkowski, P.M. Boguszewski, M. Gewartowska, M. Frontczak-Baniewicz, G.Y. Sun, D.Q. Beversdorf, A. Adamczyk, Maternal immune activation induces neuroinflammation and cortical synaptic deficits in the adolescent rat offspring, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 4097, <https://doi.org/10.3390/ijms21114097>.
- [9] P. Bateson, Playfulness and creativity, *Curr. Biol.* 25 (2015) R12–6, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.009>.
- [10] G.M. Burghardt, The comparative reach of play and brain: perspective, evidence and implications, *Am. J. Play* 2 (2010) 338–356.
- [11] S.M. Pellis, V.C. Pellis, Play fighting of rats in comparative perspective: a schema for neurobehavioral analyses, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23 (1998) 87–101, [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(97\)00071-7](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(97)00071-7).
- [12] L.J. Vanderschuren, V. Trezza, What the laboratory rat has taught us about social play behavior: role in behavioral development and neural mechanisms, *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 16 (2014) 189–212, https://doi.org/10.1007/7854_2013_268.
- [13] V. Trezza, P.J. Baarendse, L.J. Vanderschuren, The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms, *Trends Pharmacol. Sci.* 31 (2010) 463–469, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.06.008>.
- [14] T.B. Kirsten, M.M. Bernardi, Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: repetitive self-grooming and stereotypes, *Behav. Brain Res.* 331 (2017) 25–29, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.013>.
- [15] S.B. Gumusoglu, H.E. Stevens, Maternal inflammation and neurodevelopmental programming: a review of preclinical outcomes and implications for translational psychiatry, *Biol. Psychiatry* 85 (2019) 107–121, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.08.008>.
- [16] B.E. Blake, K.A. McCoy, Hormonal programming of rat social play behavior: standardized techniques will aid synthesis and translation to human health, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 55 (2015) 184–197, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.04.021>.
- [17] S. Libby, S. Powell, D. Messer, R. Jordan, Spontaneous play in children with autism: a reappraisal, *J. Autism Dev. Disord.* 28 (1998) 487–497, <https://doi.org/10.1023/a:1026095910558>.
- [18] E. Williams, A comparative review of early forms of object-directed play and parent-infant play in typical infants and young children with autism, *Autism* 7 (2003) 361–377, <https://doi.org/10.1177/1362361303007004003>.
- [19] R. Jordan, Social play and autistic spectrum disorders: a perspective on theory, implications and educational approaches, *Autism* 7 (2003) 347–360, <https://doi.org/10.1177/1362361303007004002>.

- [20] A.C. Stahmer, B. Ingersoll, C. Carter, Behavioral approaches to promoting play, *Autism* 7 (2003) 401–413, <https://doi.org/10.1177/1362361303007004006>.
- [21] M. MacDonald, B. Hatfield, E. Twardzik, Child behaviors of young children with autism spectrum disorder across play Settings, *Adapt. Phys. Activ. Q.* 34 (2017) 19–32, <https://doi.org/10.1123/APAQ.2016.0028>.
- [22] A.H. Memari, N. Panahi, E. Ranjbar, P. Moshayedi, M. Shafiei, R. Kordi, V. Ziaee, Children with autism spectrum disorder and patterns of participation in daily physical and play activities, *Neurol. Res. Int.* 2015 (2015), 531906, <https://doi.org/10.1155/2015/531906>.
- [23] M. Servadio, L.J. Vanderschuren, V. Trezza, Modeling autism-relevant behavioral phenotypes in rats and mice: Do 'autistic' rodents exist? *Behav. Pharmacol.* 26 (2015) 522–540, <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000163>.
- [24] F. Melancia, S. Schiavi, M. Servadio, V. Cartocci, P. Campolongo, M. Palmery, V. Pallottini, V. Trezza, Sex-specific autistic endophenotypes induced by prenatal exposure to valproic acid involve anandamide signalling, *Br. J. Pharmacol.* 175 (2018) 3699–3712, <https://doi.org/10.1111/bph.14435>.
- [25] S. Schiavi, D. Iezzi, A. Manduca, S. Leone, F. Melancia, C. Carbone, M. Petrella, G. Mannioni, A. Masi, V. Trezza, Reward-related behavioral, neurochemical and electrophysiological changes in a rat model of autism based on prenatal exposure to valproic acid, *Front. Cell. Neurosci.* 13 (2019) 479, <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00479>.
- [26] K. Gzielo, A. Potasiewicz, M. Hohuj, E. Litwa, P. Popik, A. Nikiforuk, Valproic acid exposure impairs ultrasonic communication in infant, adolescent and adult rats, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 41 (2020) 52–62, <https://doi.org/10.1016/j.euroeuro.2020.09.006>.
- [27] M.V. Pletnikov, S.A. Rubin, K. Vasudevan, T.H. Moran, K.M. Carbone, Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism, *Behav. Brain Res.* 100 (1999) 43–50, [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(98\)00111-9](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(98)00111-9).
- [28] T.B. Kirsten, G.P. Chaves-Kirsten, L.M. Chaible, A.C. Silva, D.O. Martins, L. R. Britto, M.L. Dagli, A.S. Torrao, J. Palermo-Neto, M.M. Bernardi, Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide, *J. Neurosci. Res.* 90 (2012) 1903–1912, <https://doi.org/10.1002/jnr.23089>.
- [29] E. van Tilborg, E.J.M. Achterberg, C.M. van Kammen, A. van der Toorn, F. Groenendaal, R.M. Dijkhuizen, C.J. Heijnen, L.J.M.J. Vanderschuren, M.N.J. L. Benders, C.H.A. Nijboer, Combined fetal inflammation and postnatal hypoxia causes myelin deficits and autism-like behavior in a rat model of diffuse white matter injury, *Glia* 66 (2018) 78–93, <https://doi.org/10.1002/glia.23216>.
- [30] M.R. Breach, C.N. Dye, A. Joshi, S. Platko, R.A. Gilfarb, A.R. Krug, D. V. Franceschelli, A. Galan, C.M. Dodson, K.M. Lenz, Maternal allergic inflammation in rats impacts the offspring perinatal neuroimmune milieu and the development of social play, locomotor behavior, and cognitive flexibility, *Brain Behav. Immun.* 95 (2021) 269–286, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.03.025>.
- [31] K. Gzielo, A. Potasiewicz, E. Litwa, D. Piotrowska, P. Popik, A. Nikiforuk, The effect of maternal immune activation on social play-induced ultrasonic vocalization in rats, *Brain Sci.* 11 (2021) 344, <https://doi.org/10.3390/brainsci11030344>.
- [32] R. Beloesesky, N. Maravi, Z. Weiner, N. Khatib, N. Awad, J. Boles, M.G. Ross, J. Itskovitz-Eldor, Maternal lipopolysaccharide-induced inflammation during pregnancy programs impaired offspring innate immune responses, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 203 (August (2)) (2010), <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.04.033>, 185.e1–4, Epub 2010 Jun 11. PMID: 20541729.
- [33] M. Baharnoori, S.K. Bhardwaj, L.K. Srivastava, Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: a prenatal infection model for developmental neuropsychiatric disorders, *Schizophr. Bull.* 38 (2012) 444–456, <https://doi.org/10.1093/schbul/sbq098>.
- [34] A.C. Kentner, S.D. Bilbo, A.S. Brown, E.Y. Hsiao, A.K. McAllister, U. Meyer, B. D. Pearce, M.V. Pletnikov, R.H. Yolken, M.D. Bauman, Maternal immune activation: reporting guidelines to improve the rigor, reproducibility, and transparency of the model, *Neuropsychopharmacology* 44 (January (2)) (2019) 245–258, <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0185-7>. Epub 2018 Aug 21. PMID: 30188509; PMCID: PMC6300528.
- [35] M.A.P. de Ávila, R.M. Gonçalves, E.C.C. Nascimento, L.D.M. Cabral, F.C. Vilela, A. Giusti-Paiva, Prenatal exposure to alcohol impairs social play behavior in adolescent male mice, *Neurotoxicology* 79 (2020) 142–149, <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.05.007>.
- [36] H.H. Costa, F.C. Vilela, A. Giusti-Paiva, Continuous central infusion of cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases maternal care in lactating rats: consequences for fear conditioning in adulthood males, *Behav. Brain Res.* 257 (2013) 31–38, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.022>.
- [37] T.H. Batista, A. Giusti-Paiva, F.C. Vilela, Maternal protein malnutrition induces autism-like symptoms in rat offspring, *Nutr. Neurosci.* 22 (2019) 655–663, <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1427660>.
- [38] F. Melancia, M. Servadio, S. Schiavi, P. Campolongo, A. Giusti-Paiva, V. Trezza, Testing the correlation between experimentally-induced hypothyroidism during pregnancy and autistic-like symptoms in the rat offspring, *Behav. Brain Res.* 321 (2017) 113–122, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.12.032>.
- [39] A.A. Wolf, C.A. Frye, The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 322–328, <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>.
- [40] A.C. Ribeiro, T.H. Batista, V.C. Trujillo Rojas, A. Giusti-Paiva, F. Cardoso Vilela, Metabolic syndrome accentuates post-traumatic stress disorder-like symptoms and glial activation, *Behav. Brain Res.* 384 (2020), 112557, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112557>.
- [41] A.L.O. Carvalho, B.G. Ferri, F.A.L. de Sousa, F.C. Vilela, A. Giusti-Paiva, Early life overnutrition induced by litter size manipulation decreases social play behavior in adolescent male rats, *Int. J. Dev. Neurosci.* 53 (2016) 75–82, <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.07.005>.
- [42] L.W. van Kerkhof, R. Damsteegt, V. Trezza, P. Voorn, L.J. Vanderschuren, Social play behavior in adolescent rats is mediated by functional activity in medial prefrontal cortex and striatum, *Neuropsychopharmacology* 38 (2013) 1899–1909, <https://doi.org/10.1038/npp.2013.83>.
- [43] L.J. Vanderschuren, B.M. Spruijt, T. Hol, R.J. Niesink, J.M. Van Ree, Sequential analysis of social play behavior in juvenile rats: effects of morphine, *Behav. Brain Res.* 72 (1995) 89–95, [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(96\)00060-5](https://doi.org/10.1016/0166-4328(96)00060-5).
- [44] F.C. Vilela, A. Giusti-Paiva, Cannabinoid receptor agonist disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation, *Behav. Brain Res.* 263 (2014) 190–197, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.037>.
- [45] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th edition, Academic Press, 1997.
- [46] W.G. Hopkins, S.W. Marshall, A.M. Batterham, J. Hanin, Progressive statistics for studies in sports medicine and exercise science, *Med. Sci. Sports Exerc.* 41 (2009) 3–13, <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31818cb278>.
- [47] Y. Oishi, R.H. Williams, L. Agostinelli, E. Arrigoni, P.M. Fuller, T. Mochizuki, C. B. Saper, T.E. Scammell, Role of the medial prefrontal cortex in cataplexy, *J. Neurosci.* 33 (2013) 9743–9751, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0499-13.2013>.
- [48] S.E. Smith, J. Li, K. Garbett, K. Mimics, P.H. Patterson, Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6, *J. Neurosci.* 27 (2007) 10695–10702, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007>.
- [49] C.J. Machado, A.M. Whitaker, S.E. Smith, P.H. Patterson, M.D. Bauman, Maternal immune activation in nonhuman primates alters social attention in juvenile offspring, *Biol. Psychiatry* 77 (2015) 823–832, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.07.035>.
- [50] M. Careaga, S.L. Taylor, C. Chang, A. Chiang, K.M. Ku, R.F. Berman, J.A. Van de Water, M.D. Bauman, Variability in PolyIC induced immune response: implications for preclinical maternal immune activation models, *J. Neuroimmunol.* 15 (323) (2018) 87–93, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.06.014>.
- [51] M.R. Keever, P. Zhang, C.R. Bolt, A.M. Antonson, H.E. Rymut, M.P. Caputo, A. K. Houser, A.G. Hernandez, B.R. Southey, L.A. Rund, R.W. Johnson, S. L. Rodriguez-Zas, Lasting and sex-dependent impact of maternal immune activation on molecular pathways of the Amygdala, *Front. Neurosci.* 14 (2020) 774, <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00774>.
- [52] R.P. Thom, C.J. McDougle, Immune modulatory treatments for autism Spectrum disorder, *Semin. Pediatr. Neurol.* 35 (2020), 100836, <https://doi.org/10.1016/j.spen.2020.100836>.
- [53] A. Garami, A.A. Steiner, A.A. Romanovsky, Fever and hypothermia in systemic inflammation, *Handb. Clin. Neurol.* 157 (2018) 565–597, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64074-1.00034-3>.
- [54] M.K. Oliveira, R.S. Dos Santos, L.D.M. Cabral, F.C. Vilela, A. Giusti-Paiva, Simvastatin attenuated sickness behavior and fever in a murine model of endotoxemia, *Life Sci.* 254 (2020), 117701, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117701>.
- [55] R.M. Silver, W.S. Lohner, R.A. Daynes, M.D. Mitchell, D.W. Branch, Lipopolysaccharide-induced fetal death: the role of tumor-necrosis factor alpha, *Biol. Reprod.* 50 (1994) 1108–1112, <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.5.1108>.
- [56] D.X. Xu, H. Wang, L. Zhao, H. Ning, Y.H. Chen, C. Zhang, Effects of low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment on LPS-induced intra-uterine fetal death and preterm labor, *Toxicology* 234 (2007) 167–175, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.02.010>.
- [57] P.A. Carpentier, A.L. Dingman, T.D. Palmer, Placental TNF- α signaling in illness-induced complications of pregnancy, *Am. J. Pathol.* 178 (2011) 2802–2810, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.042>.
- [58] S.S. French, E.M. Chester, G.E. Demas, Maternal immune activation affects litter success, size and neuroendocrine responses related to behavior in adult offspring, *Physiol. Behav.* 119 (2013) 175–184, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.06.018>.
- [59] T.B. Kirsten, N. Queiroz-Hazarbassanov, M.M. Bernardi, L.F. Felício, Prenatal zinc prevents communication impairments and BDNF disturbance in a rat model of autism induced by prenatal lipopolysaccharide exposure, *Life Sci.* 130 (2015) 12–17, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.02.027>.
- [60] B.R. Lins, J.L. Hurtubise, A.J. Roebuck, W.N. Marks, N.K. Zabler, G.A. Scott, Q. Greba, W. Dawicki, X. Zhang, C.D. Rudulier, J.R. Gordon, J.G. Howland, Prospective analysis of the effects of maternal immune activation on rat cytokines during pregnancy and behavior of the male offspring relevant to schizophrenia, *eNeuro* 5 (2018), ENEURO.0249-18.2018.
- [61] M. Keller, L.N. Vandenberg, T.D. Charlier, The parental brain and behavior: a target for endocrine disruption, *Front. Neuroendocrinol.* 54 (2019), 100765, <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.100765>.
- [62] J.W. Smith, J.R. Seckl, A.T. Evans, B. Costall, J.W. Smythe, Gestational stress induces post-partum depression-like behaviour and alters maternal care in rats, *Psychoneuroendocrinology* 29 (2004) 227–244, [https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(03\)00255-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(03)00255-8).
- [63] I. Brouette-Lahlou, F. Godinot, E. Vernet-Maury, The mother rat's vomeronasal organ is involved in detection of dodecyl propionate, the pup's preputial gland pheromone, *Physiol. Behav.* 66 (1999) 427–436, [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(98\)00334-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(98)00334-5).

- [64] C.L. Moore, G.A. Morelli, Mother rats interact differently with male and female offspring, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93 (1979) 677–684, <https://doi.org/10.1037/h0077599>.
- [65] W.P. Smotherman, R.W. Bell, J. Starzec, J. Elias, T.A. Zachman, Maternal responses to infant vocalizations and olfactory cues in rats and mice, *Behav. Biol.* 12 (1974) 55–66, [https://doi.org/10.1016/s0091-6773\(74\)91026-8](https://doi.org/10.1016/s0091-6773(74)91026-8).
- [66] G. Ehret, Infant rodent ultrasounds – a gate to the understanding of sound communication, *Behav. Genet.* 35 (2005) 19–29, <https://doi.org/10.1007/s10519-004-0853-8>.
- [67] F.A. Champagne, D.D. Francis, A. Mar, M.J. Meaney, Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development, *Physiol. Behav.* 79 (2003) 359–371, [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(03\)00149-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(03)00149-5).
- [68] D. Liu, J. Diorio, J.C. Day, D.D. Francis, M.J. Meaney, Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats, *Nat. Neurosci.* 3 (2000) 799–806, <https://doi.org/10.1038/77702>.
- [69] D.L. Champagne, R.C. Bagot, F. van Hasselt, G. Ramakers, M.J. Meaney, E.R. de Kloet, M. Joels, H. Krugers, Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress, *J. Neurosci.* 28 (2008) 6037–6045, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0526-08.2008>.
- [70] C. Caldji, B. Tannenbaum, S. Sharma, D. Francis, P.M. Plotsky, M.J. Meaney, Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 5335–5340, <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5335>.
- [71] I.C. Weaver, M.J. Meaney, M. Szyf, Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 3480–3485, <https://doi.org/10.1073/pnas.0507526103>.
- [72] F.N. van Hasselt, J.M. Tieskens, V. Trezza, H.J. Krugers, L.J. Vanderschuren, M. Joels, Within-litter variation in maternal care received by individual pups correlates with adolescent social play behavior in male rats, *Physiol. Behav.* 106 (2011) 701–706, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.12.007>.
- [73] A. Sequeira-Cordero, M. Masís-Calvo, A. Mora-Gallegos, J. Fornaguera-Trias, Maternal behavior as an early modulator of neurobehavioral offspring responses by Sprague-Dawley rats, *Behav. Brain Res.* 237 (2013) 63–70, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.09.028>.
- [74] H.B. Nguyen, R.C. Bagot, J. Diorio, T.P. Wong, M.J. Meaney, Maternal care differentially affects neuronal excitability and synaptic plasticity in the dorsal and ventral hippocampus, *Neuropsychopharmacology* 40 (2015) 1590–1599, <https://doi.org/10.1038/npp.2015.19>.
- [75] M. Premoli, S.A. Bonini, A. Mastinu, G. Maccarinelli, F. Aria, G. Pairardi, M. Memo, Specific profile of ultrasonic communication in a mouse model of neurodevelopmental disorders, *Sci. Rep.* 9 (2019) 15912, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52378-0>.
- [76] T.B. Kirsten, G.P. Chaves, M. Taricano, D.O. Martins, J.C. Flório, L.R. Britto, A. S. Torráo, J. Palermo-Neto, M.M. Bernardi, Prenatal LPS exposure reduces olfactory perception in neonatal and adult rats, *Physiol. Behav.* 104 (2011) 417–422, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.049>.
- [77] W.A. Carlezon Jr., W. Kim, G. Missig, B.C. Finger, S.M. Landino, A.J. Alexander, E.L. Mokler, J.O. Robbins, Y. Li, V.Y. Bolshakov, C.J. McDougle, K.S. Kim, Maternal and early postnatal immune activation produce sex-specific effects on autism-like behaviors and neuroimmune function in mice, *Sci. Rep.* 9 (2019) 16928, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53294-z>.
- [78] S.L. Hartley, D.M. Sikora, Sex differences in autism spectrum disorder: an examination of developmental functioning, autistic symptoms, and coexisting behavior problems in toddlers, *J. Autism Dev. Disord.* 39 (2009) 1715–1722, <https://doi.org/10.1007/s10803-009-0810-8>.
- [79] K. Supekar, V. Menon, Sex differences in structural organization of motor systems and their dissociable links with repetitive/restricted behaviors in children with autism, *Mol. Autism* 6 (2015) 50, <https://doi.org/10.1186/s13229-015-0042-z>.
- [80] M. South, J. Dana, S.E. White, M.J. Crowley, Failure is not an option: risk-taking is moderated by anxiety and also by cognitive ability in children and adolescents diagnosed with an autism spectrum disorder, *J. Autism Dev. Disord.* 41 (2011) 55–65, <https://doi.org/10.1007/s10803-010-1021-z>.
- [81] M.C. Lai, M.V. Lombardo, S. Baron-Cohen, Autism, *Lancet* 383 (2014) 896–910, [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)61539-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)61539-1).
- [82] J. Guan, G. Li, Injury mortality in individuals with autism, *Am. J. Public Health* 107 (2017) 791–793, <https://doi.org/10.2105/AJPH.2017.303696>.
- [83] O. Oron, D. Getzelter, S. Shohat, E. Reuveni, I. Lukic, S. Shifman, E. Elliott, Gene network analysis reveals a role for striatal glutamatergic receptors in dysregulated risk-assessment behavior of autism mouse models, *Transl. Psychiatry* 9 (2019) 257, <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0584-5>.
- [84] J. Panksepp, S. Siviy, L. Normansell, The psychobiology of play: theoretical and methodological perspectives, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 8 (1984) 465–492, [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(84\)90005-8](https://doi.org/10.1016/0149-7634(84)90005-8).
- [85] L.J. Vanderschuren, R.J. Niesink, J.M. Van Ree, The neurobiology of social play behavior in rats, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21 (1997) 309–326, [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(96\)00020-6](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(96)00020-6).
- [86] H.C. Bell, D.R. McCaffrey, M.L. Forgie, B. Kolb, S.M. Pellis, The role of the medial prefrontal cortex in the play fighting of rats, *Behav. Neurosci.* 123 (2009) 1158–1168, <https://doi.org/10.1037/a0017617>.
- [87] L.W. van Kerkhof, V. Trezza, T. Mulder, P. Gao, P. Voorn, L.J. Vanderschuren, Cellular activation in limbic brain systems during social play behaviour in rats, *Brain Struct. Funct.* 219 (2014) 1181–1211, <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0558-y>.
- [88] S.M. Pellis, E. Castañeda, M.M. McKenna, L.T. Tran-Nguyen, I.Q. Whishaw, The role of the striatum in organizing sequences of play fighting in neonatally dopamine-depleted rats, *Neurosci. Lett.* 158 (1993) 13–15, [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90600-p](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90600-p).
- [89] L.W. van Kerkhof, R. Damsteegt, V. Trezza, P. Voorn, L.J. Vanderschuren, Functional integrity of the habenula is necessary for social play behaviour in rats, *Eur. J. Neurosci.* 38 (2013) 3465–3475, <https://doi.org/10.1111/ejn.12353>.
- [90] E.J.M. Achterberg, R. Damsteegt, L.J.M.J. Vanderschuren, On the central noradrenergic mechanism underlying the social play-suppressant effect of methylphenidate in rats, *Behav. Brain Res.* 347 (2018) 158–166, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.03.004>.
- [91] A.C. Felix-Ortiz, A. Burgos-Robles, N.D. Bhagat, C.A. Leppla, K.M. Tye, Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by amygdala projections to the medial prefrontal cortex, *Neuroscience* 321 (2016) 197–209, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.041>.
- [92] W.B. Hoover, R.P. Vertes, Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat, *Brain Struct. Funct.* 212 (2007) 149–179, <https://doi.org/10.1007/s00429-007-0150-4>.
- [93] D.A. Gehrlach, C. Weiland, T.N. Gaitanos, E. Cho, A.S. Klein, A.A. Henrich, K. K. Conzelmann, N. Gogolla, A whole-brain connectivity map of mouse insular cortex, *Elife* 9 (2020), e55585, <https://doi.org/10.7554/eLife.55585>.
- [94] S. Baron-Cohen, H.A. Ring, E.T. Bullmore, S. Wheelwright, C. Ashwin, S. C. Williams, The amygdala theory of autism, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24 (2000) 355–364, [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(00\)00011-7](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(00)00011-7).
- [95] C.M. Schumann, J. Hamstra, B.L. Goodlin-Jones, L.J. Lotspeich, H. Kwon, M. H. Buonocore, C.R. Lammers, A.L. Reiss, D.G. Amaral, The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages, *J. Neurosci.* 24 (2004) 6392–6401, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1297-04.2004>.
- [96] J. Richter, R. Henze, K. Vomstein, B. Stieltjes, P. Parzer, J. Haffner, D. Brandeis, L. Poustka, Reduced cortical thickness and its association with social reactivity in children with autism spectrum disorder, *Psychiatry Res.* 234 (2015) 15–24, <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.06.011>.
- [97] B.M. Sharp, Basolateral amygdala and stress-induced hyperexcitability affect motivated behaviors and addiction, *Transl. Psychiatry* 7 (2017) e1194, <https://doi.org/10.1038/tp.2017.161>.
- [98] K. Ibrahim, J.A. Eilbott, P. Ventola, G. He, K.A. Pelphrey, G. McCarthy, D. G. Sukhodolsky, Reduced amygdala-prefrontal functional connectivity in children with autism spectrum disorder and Co-occurring disruptive behavior, *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging* 4 (2019) 1031–1041, <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2019.01.009>.
- [99] J. Bartolotti, J.A. Sweeney, M.W. Mosconi, Functional brain abnormalities associated with comorbid anxiety in autism spectrum disorder, *Dev. Psychopathol.* 32 (2020) 1273–1286, <https://doi.org/10.1017/S0954579420000772>.
- [100] N.S. Gordon, S. Kollack-Walker, H. Akil, J. Panksepp, Expression of c-fos gene activation during rough and tumble play in juvenile rats, *Brain Res. Bull.* 57 (2002) 651–659, [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(01\)00762-6](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(01)00762-6).
- [101] W.C. Huang, Y. Chen, D.T. Page, Hyperconnectivity of prefrontal cortex to amygdala projections in a mouse model of macrocephaly/autism syndrome, *Nat. Commun.* 7 (2016) 13421, <https://doi.org/10.1038/ncomms13421>.
- [102] H.C. Lin, P.W. Gean, C.C. Wang, Y.H. Chan, P.S. Chen, The amygdala excitatory/inhibitory balance in a valproate-induced rat autism model, *PLoS One* 8 (2013), e55248, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055248>.
- [103] M.J. Meaney, A.M. Dodge, W.W. Beatty, Sex-dependent effects of amygdaloid lesions on the social play of prepubertal rats, *Physiol. Behav.* 26 (1981) 467–472, [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90175-x](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90175-x).
- [104] T.A. Paine, N. Swedlow, L. Swetschinski, Decreasing GABA function within the medial prefrontal cortex or basolateral amygdala decreases sociability, *Behav. Brain Res.* 317 (2017) 542–552, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.10.012>.

ANEXO A



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudos de mecanismos neuroinflamatórios envolvidos no desenvolvimento das alterações comportamentais e de respostas autonômicas em modelo translacional de transtorno de espectro autista fase I", registrada com o nº 66/2017, sob a responsabilidade de Alexandre Giusti-Paiva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 23/01/2018 a 30/09/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	286 (30 machos e 256 fêmeas)
Sexo	Machos/Fêmeas
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 23 de Janeiro de 2018.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador CEUA-UNIFAL

ANEXO B



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo de mecanismos neuroinflamatórios envolvidos no desenvolvimento das alterações comportamentais e de resposta autonômicas em modelo translacional de transtorno do espectro autista: Fase II", registrada com o nº 14/2019, sob a responsabilidade de Alexandre Giusti Paiva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 02/09/2019 a 30/06/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	Adultos: Machos: 30 Fêmeas: 102 Filhotes: Machos: 288 Fêmeas: 288 Total: 708
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central da UNIFAL (Adultos)

Alfenas, 02 de Setembro de 2019.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG

ANEXO C



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo de mecanismos envolvidos nas alterações comportamentais e de respostas autonômicas ao estresse em modelo translacional de transtorno do espectro autista", registrada com o nº 21/2019, sob a responsabilidade de Alexandre Giusti Paiva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 02/09/2019 a 30/09/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	Adultos: Machos: 20 Fêmeas: 70 Filhotes: Machos: 192 Fêmeas: 192 Total: 474
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central da UNIFAL (Adultos)

Alfenas, 02 de Setembro de 2019.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG