

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**VIVIANA CAROLINA TRUJILLO ROJAS**

**NEUROPLASTICIDADE NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS A ATIVAÇÃO IMUNE  
MATERNA COM LIPOPOLISSACARÍDEO**

**ALFENAS/MG**

**2023**

**VIVIANA CAROLINA TRUJILLO ROJAS**

**NEUROPLASTICIDADE NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS A ATIVAÇÃO IMUNE  
MATERNA COM LIPOPOLISSACARÍDEO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Cardoso Vilela Giusti

**ALFENAS/MG**

**2023**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Trujillo Rojas, Viviana Carolina.

Neuroplasticidade na prole de ratas submetidas a ativação imune materna com lipopolisacarídeo / Viviana Carolina Trujillo Rojas. - Alfenas, MG, 2023.

105 f. : il. -

Orientador(a): Alexandre Giusti Paiva .

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Inflamação . 2. Neurodesenvolvimento. 3. Comportamento social. 4. Dimorfismo sexual. 5. Epigenética . I. Paiva , Alexandre Giusti , orient. II. Título.

VIVIANA CAROLINA TRUJILLO ROJAS

NEUROPLASTICIDADE NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS A ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA COM LIPOPOLISSACARÍDEO

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

Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia.

Aprovada em: 15/02/2023

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

Profa. Dra. Marcia Giovenardi  
Instituição: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre  
UFCSPA

Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva  
Instituição: Universidade de Taubaté  
UNITAU

Prof. Dr. Wagner Luis Reis  
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina  
UFSC

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida  
Instituição: Universidade federal de Alfenas  
UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Giusti Paiva, Professor do Magistério Superior**, em 15/02/2023, às 17:11, 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 **Leonardo Augusto de Almeida, Professor do Magistério Superior**, em 15/02/2023, às 17:11, 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 **Marcia Giovenardi, Usuário Externo**, em 15/02/2023, às 17:14, 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 **Rodrigo Augusto da Silva, Usuário Externo**, em 15/02/2023, às 17:15, 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 **Wagner Luis Reis, Usuário Externo**, em 22/02/2023, às 12:25, 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](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0905430** e o código CRC **8621A7CF**.

---

## AGRADECIMENTOS

Essa jornada foi intensa e difícil de muitas formas, na minha perspectiva foi difícil de todas as formas, mas por sorte não foi uma jornada solitária. Há muitos motivos para agradecer. Primeiramente agradeço à vida pela oportunidade de caminhar esse caminho, e pelas pessoas incríveis que caminharam junto comigo esse tempo todo fisicamente e na distância, pelos que chegaram, pelos que se foram, pelos que ficaram e pelos que nunca foram embora.

Agradeço aos meus pais, pelo amor, o apoio incondicional e a paciência, sei que não é fácil ficar tanto tempo longe. À minha irmã de coração Andrea que veio na pandemia para trazer um pedacinho da família e todo o amor e cuidado que poderia querer e precisar.

Agradeço a meu orientador, o professor Alexandre Giusti-Paiva e co-orientadora, a professora Fabiana Cardoso Vilela pela confiança depositada em mim, por abrir as portas da pós-graduação e da sua casa, pela amizade, a paciência e o convívio. Obrigada pela parceria, só tenho admiração por vocês.

Agradeço especialmente às minhas amigas do laboratório, e agora da vida, Bárbara e Cíntia pelos infinitos cafés, as conversas existenciais e o apoio em todos os aspectos da vida. Ao Fernando pela companhia e apoio, pelos ensinamentos e a ajuda incondicional, além das comidinhas maravilhosas. Sua amizade foi essencial durante esse tempo todo.

Ao professor Rodrigo Augusto da Silva (Unip), pela ajuda na execução dos experimentos de epigenética, pela generosidade, disponibilidade, e por compartilhar sua experiência e tempo.

Aos meus grandes amigos Cesar, Sara, Daniela, Ernesto, Roberto e Alex por estar presentes mesmo na distância, pelas palavras de incentivo sempre, por acreditar sempre em mim, pelo tempo e pelas risadas.

Ao técnico do Laboratório José Reis pelo cuidado dos animais, a dedicação e as conversas. A todos os colegas do Laboratório de Neuromodulação pela convivência.

A UNIFAL-MG e o Programa de Pós-Graduação Multicêntrico de Ciências Fisiológicas, assim como a CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos caninos e felinos que me ajudam a levantar todos os dias e aos muitos outros amigos (humanos) que tive a sorte de encontrar nessa terra linda. Obrigada a todos pela torcida, por acreditar em mim e por fazer dessa experiência algo muito além da vida acadêmica.

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

## RESUMO

A interação entre fatores ambientais e genéticos é conhecida como um potencial fator de risco para o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos. A exposição pré-natal a infecções tem sido associada à apresentação de alterações do neurodesenvolvimento como transtorno do espectro autista, assim como esquizofrenia. O objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações comportamentais, proteicas e epigenéticas na prole de fêmeas submetidas a ativação imune materna (AIM) induzida com lipopolissacarídeo (LPS) no dia 16 da gestação (DG16). Fêmeas de ratos Wistar foram tratadas de forma intraperitoneal (i.p.) com solução salina 0,9% (1 ml/kg) ou LPS (500 µg/kg) durante o DG16. Para caracterizar o comportamento do feto nas fêmeas gestantes, foi avaliada a atividade locomotora no teste de campo aberto 2 horas após a administração de LPS, assim como foram quantificados o consumo alimentar e o ganho de peso 24 horas depois. Após o nascimento das ninhadas, foram realizados testes comportamentais na prole para avaliar a comunicação, o comportamento social, e testes de memória de reconhecimento e memória espacial durante a adolescência. Na prole adulta foi avaliada a atividade locomotora, o comportamento social e os mesmos testes de memória realizados nos animais adolescentes. Após os testes comportamentais foi coletado o córtex pré-frontal (PFC) da prole para quantificar proteínas relacionadas com o neurodesenvolvimento, a plasticidade sináptica, e o comportamento social através do ensaio de *western blot*, e PCR em tempo real para avaliar a expressão de fatores envolvidos em modificações epigenéticas. Nas fêmeas gestantes, a administração de LPS diminuiu a locomoção no campo aberto, o consumo alimentar e houve perda de peso. Na prole não foram encontradas diferenças no número de vocalizações ultrassônicas (VUS) em nenhum dos grupos analisados. Em relação ao comportamento social, os animais do grupo LPS mostraram diminuição na frequência e o tempo total de comportamentos sociais tanto nas fêmeas quanto nos machos, e as alterações persistiram nos animais durante a vida adulta. Na prole adulta, encontrou-se também diminuição da atividade locomotora no campo aberto. Não foram encontradas diferenças no desempenho dos animais em nenhum dos testes de memória tanto nos animais adolescentes quanto nos adultos. Nos animais adolescentes do grupo LPS encontrou-se



aumento da expressão do receptor de ocitocina (OTR) no PFC das fêmeas e dos machos. Também encontrou-se diminuição da expressão do receptor de glucocorticóide (GR) e de sinaptofisina unicamente no PFC dos machos, mas não nas fêmeas. Também foi encontrado aumento da expressão do Retroelemento Line1 e do Fator de transcrição de Silenciamento RE-1 (Rest) no PFC dos machos adolescentes, assim como aumento das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) e *ten-eleven translocation* (TETs) no PFC dos machos e das fêmeas LPS, envolvidas na metilação e demetilação do DNA. Os nossos resultados demonstram que a administração de LPS durante o DG16 foi capaz de gerar alterações moleculares dependentes do sexo no córtex pré-frontal da prole, podendo estar envolvidas nas alterações comportamentais decorrentes da AIM.

Palavras-chave: Inflamação; gestação; neurodesenvolvimento; comportamento social; dimorfismo sexual; epigenética.

## ABSTRACT

The interaction between environmental and genetic factors is known as a potential risk factor for the development of neuropsychiatric disorders. Prenatal exposure to infections has been associated with the presentation of neurodevelopmental disorders such as autism spectrum disorder, as well as schizophrenia. The aim of this study was to evaluate behavioral, proteic and epigenetic changes in the offspring of females submitted to maternal immune activation (MIA) induced with lipopolysaccharide (LPS) at 16th day of gestation (GD16). Female Wistar rats were treated intraperitoneally (i.p.) with 0.9% saline (1 ml/kg) or LPS (500 µg/kg) during GD16. To assess sickness behavior in the pregnant females, locomotor activity was recorded in the open field 2 hours after LPS administration, along with food intake and weight gain after 24 hours. After the birth of the litters, behavioral tests were performed on the offspring to assess communication, social behavior, as well as recognition and spatial memory tests during adolescence. In adult offspring, locomotor activity, social behavior and the same memory tests performed in adolescent animals were assessed. After the behavioral tests, the prefrontal cortex (PFC) of the offspring was collected to quantify proteins related to neurodevelopment, synaptic plasticity, and social behavior through the western blot assay, and real-time PCR to evaluate the expression of factors involved in epigenetic modifications. In pregnant females, the administration of LPS decreased locomotion in the open field, food consumption and weight gain. In the offspring, no differences were found in the number of ultrasonic vocalizations (USV) in any of the analyzed groups. Regarding social behavior, the animals in the LPS group showed a decrease in the frequency and total time of social interactions in both females and males, and the changes persisted in the animals during adulthood. In adult offspring, a decrease in locomotor activity was also found in the open field. No differences were found in the performance of the offspring in any of the memory tests in both the adolescent and adult animals. In adolescent animals from the LPS group, an increase in the expression of the oxytocin receptor (OTR) was found in the PFC of females and males. A decrease in glucocorticoid receptor (GR) and synaptophysin expression was also found only in the PFC of males, but not in females. An increase in the expression of the Line1 Retroelement and the RE-1 Silencing Transcription Factor

(Rest) was also found in the PFC of adolescent males, as well as an increase in the enzymes DNA methyltransferases (DNMTs) and ten-eleven translocation (TETs) in the PFC of males and female LPS, involved in DNA methylation and demethylation. Our results demonstrate that the administration of LPS during DG16 was able to generate sex-dependent molecular changes in the prefrontal cortex of the offspring, which could be involved in the behavioral changes resulting from MIA.

Keywords: Inflammation; gestation; neurodevelopment; social behavior; sexualdimorphism; epigenetics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho experimental dos testes comportamentais na prole adolescente e adulta. ....	32
Figura 2 – Equipamento para análise de vocalizações ultrassónicas.....	34
Figura 3 – Teste de reconhecimento de objetos. ....	35
Figura 4 – Labirinto de Bames. ....	38

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeitos da administração intraperitoneal de LPS ou salina 0,9% no DG16. ....	46
Gráfico 2 – Efeitos da administração intraperitoneal de LPS ou salina 0,9% no número de filhotes nascidos vivos por ninhada. ....	47
Gráfico 3 – Efeitos da administração intraperitoneal de LPS ou salina 0,9% no peso médio dos filhotes nascidos vivos por ninhada. ....	48
Gráfico 4 – Efeitos da administração de LPS i.p. pré-natal nas vocalizações ultrassônicas induzidas por isolamento na prole no DPN13. ....	49
Gráfico 5 – Teste de reconhecimento de objetos de 2 horas na prole de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação. ...	50
Gráfico 6 – Teste de reconhecimento de objetos de 24 horas na prole de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação. ...	51
Gráfico 7 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação na prole no teste de comportamento de brincar. ....	52
Gráfico 8 – Tempo de latência para alcançar o buraco alvo durante a etapa de aquisição no labirinto de Barnes na prole adolescente de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação. ...	53
Gráfico 9 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação no desempenho da prole no labirinto de Barnes durante o teste do dia 6. ....	54
Gráfico 10 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação no desempenho da prole no labirinto de Barnes durante o teste do dia 10. ..	55
Gráfico 11 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação no desempenho da prole no labirinto de Barnes durante o teste do dia 10 no quadrante oposto. ....	56
Gráfico 12 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação na prole adulta na atividade locomotora no campo aberto. ....	57
Gráfico 13 – Teste de reconhecimento de objetos de 2 horas na prole adulta de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação. ....	58
Gráfico 14 – Teste de reconhecimento de objetos de 24 horas na prole adulta de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação. ....	59
Gráfico 15 – Teste de interação social na prole adulta de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação. ....	60
Gráfico 16 – Labirinto de Barnes nas fêmeas adultas, prole de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação. ....	61
Gráfico 17 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação no desempenho da prole adulta no labirinto de Barnes durante o teste do dia 6. ....	62
Gráfico 18 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação no desempenho da prole adulta no labirinto de Barnes durante o teste do dia 10. ....	63

Gráfico 19 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação no desempenho da prole adulta no labirinto de Barnes durante o teste do dia 10 no quadrante oposto.....	64
Gráfico 20 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação na expressão das proteínas BAX, BCL-2 e GFAP, no córtex pré-frontal da prole adolescente.....	65
Gráfico 21 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação na expressão das proteínas BDNF, DCX, PSD95, e sinaptofisina no córtex pré-frontal da prole adolescente.....	66
Gráfico 22 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação na expressão do OTR e GR no córtex pré-frontal da prole adolescente.....	68
Gráfico 23 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação na expressão de BDNF, sinaptofisina e OTR no córtex pré-frontal da prole adulta.....	69
Gráfico 24 – Expressão gênica de Rest e Line1 no córtex pré-frontal da prole adolescente de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação. ....	70
Gráfico 25 – Avaliação da metilação de Rest e Line1 no córtex pré-frontal da prole adolescente de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação. ....	71
Gráfico 26 – Expressão gênica de DNMT1, DNMT3a, e DNMT3b no córtex pré-frontal da prole adolescente de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação.....	72
Gráfico 27 – Expressão gênica de TET1, TET2 e TET3 no córtex pré-frontal da prole adolescente de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação.....	73
Gráfico 28 – Relação da expressão de Rest e os comportamentos de <i>pouncing</i> e <i>pinning</i> durante o teste de comportamento de brincar na prole adolescente de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação. ....	74
Gráfico 29 – Relação da expressão de Line1 e os comportamentos de <i>pouncing</i> e <i>pinning</i> durante o teste de comportamento de brincar na prole adolescente de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação. ....	75

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Anticorpos utilizados na técnica de <i>Western blotting</i> . .....	39
--------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proporção de fêmeas gestantes tratadas com salina ou LPS, nascimentos, perda de ninhadas e peso médio dos filhotes ao nascimento (DPN0). .....	47
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	microgramas
µl	microlitros
µM	micromolar
AIM	Ativação Imune Materna
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barrera hematoencefálica
DCX	Doublecortin
DG	Dia da gestação
DI	Deficiência intelectual
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferase
DPN	Dia pós-natal
DSM 5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
DTT	1,4-Dithiothreitol
EPM	Erro padrão da média
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GR	Receptor de glucocorticoide
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
i.p.	intraperitoneal
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IR	Índice de reconhecimento de objetos
Line1	<i>Long interspersed nuclear element-1</i>
LPS	Lipopolisacarídeo
ml	mililitros
ng	nanogramas
NK	Células natural killer
nm	nanômetros
OTR	Receptor de ocitocina

PFC	Córtex pré-frontal
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
Rest	Fator de transcrição silenciador RE1
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
TBS	Solução salina tamponada
TDAH	Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade
TEA	Transtorno do espectro autista
TET	Ten-eleven translocation
TF	Tempo de exploração objeto familiar
TN	Tempo de exploração objeto novo
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TrkB	Receptor de tirosina quinase B
U	Unidades internacionais
VUS	Vocalizações ultrassónicas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
1.1	TRANSTORNOS DO NEURODESENVOLVIMENTO.....	21
1.2	SISTEMA IMUNE E NEURODESENVOLVIMENTO.....	22
1.3	ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA (AIM).....	24
1.4	EPIGENÉTICA.....	27
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1	ANIMAIS.....	31
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
3.3	ACASALAMENTO.....	32
3.4	MODELO DE ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA.....	33
3.5	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOENTIO DAS FÊMEAS GESTANTES.....	33
3.6	VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS INDUZIDAS POR ISOLAMENTO (VUS) NA PROLE.....	33
3.7	TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS NA PROLE.....	35
3.8	COMPORTAMENTO DE BRINCAR E INTERAÇÃO SOCIAL NA PROLE.....	36
3.9	CAMPO ABERTO NA PROLE.....	36
3.10	LABIRINTO DE BARNES NA PROLE.....	37
3.11	COLETA DE ESTRUTURAS ENCEFÁLICAS E <i>WESTERN BLOT</i> .....	38
3.12	PCR.....	40
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
4.1	TESTES COMPORTAMENTAIS NAS RATAS PRENHAS.....	45
4.1.1	Comportamento doentio.....	45
4.2	TESTES COMPORTAMENTAIS NA PROLE ADOLESCENTE.....	48
4.2.1	Vocalizações ultrassônicas induzidas por isolamento.....	48
4.2.2	Teste de reconhecimento de objetos.....	49
4.2.3	Comportamento de brincar.....	51
4.2.4	Labirinto de Barnes.....	52
4.3	TESTES COMPORTAMENTAIS NA PROLE ADULTA.....	56

4.3.1	Campo aberto .....	56
4.3.2	Reconhecimento de objetos .....	58
4.3.3	Interação social .....	59
4.3.4	Labirinto de Barnes.....	60
4.4	WESTERN BLOT .....	64
4.4.1	Prole adolescente .....	64
4.4.2	Prole adulta.....	68
4.5	qPCR.....	70
4.6	CORRELAÇÃO .....	73
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
5.1	COMPORTAMENTO DOENTIO NAS FÊMEAS GESTANTES .....	77
5.2	COMPORTAMENTO NA PROLE .....	78
5.3	EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO NEURODESENVOLVIMENTO .....	82
5.4	EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS A MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS.....	84
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>88</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>89</b>
	<b>APÊNDICE A – Resumo estatística fêmeas gestantes .....</b>	<b>99</b>
	<b>APÊNDICE B – Resumo estatística experimentos na prole.....</b>	<b>100</b>
	<b>APÊNDICE C – Resumo estatística <i>Western blot</i> prole adolescente e adultos .....</b>	<b>103</b>
	<b>APÊNDICE D – Resumo estatística PCR adolescentes.....</b>	<b>104</b>
	<b>ANEXO A - CEUA.....</b>	<b>105</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 TRANSTORNOS DO NEURODESENVOLVIMENTO

De acordo com a versão mais recente do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), os transtornos do desenvolvimento são definidos como:

Um grupo de condições com início no período de desenvolvimento. Os distúrbios geralmente se manifestam no início do desenvolvimento, muitas vezes antes da criança entrar na escola primária, e são caracterizados por déficits de desenvolvimento que produzem prejuízos no funcionamento pessoal, social, acadêmico ou ocupacional. A gama de déficits de desenvolvimento varia de limitações muito específicas de aprendizado ou controle de funções executivas a deficiências globais de habilidades sociais ou inteligência (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Os critérios da Organização Mundial da Saúde definem transtornos do neurodesenvolvimento como “transtornos comportamentais e cognitivos que surgem durante o período de desenvolvimento e que envolvem dificuldades significativas na aquisição e execução de funções intelectuais, motoras ou sociais específicas” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019), e persistem ao longo da vida de uma pessoa. Entre eles, estão considerados principalmente a deficiência intelectual (DI), transtorno do espectro autista (TEA), e o transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH), entre outras. Além do mais, estas podem estar estreitamente relacionados com outros transtornos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

As principais características dos transtornos do neurodesenvolvimento são alterações na arquitetura, maturação, e funcionamento do cérebro, levando a alterações nas funções cognitivas e adaptativas. Seu diagnóstico é realizado mais frequentemente em homens do que em mulheres, no entanto, sugere-se que esses transtornos em mulheres poderiam ser subdiagnosticados (CARLSSON *et al.*, 2020).

A etiologia desses transtornos é considerada de origem multifatorial, em muitos casos ainda desconhecida. Atualmente, os transtornos do neurodesenvolvimento são considerados como um problema de saúde sério na sociedade, afetando >3% das crianças a nível mundial (PARENTI *et al.*, 2020).

Mais recentemente, estudos genéticos têm demonstrado que alguns transtornos do neurodesenvolvimento compartilham alelos de risco genético entre si, assim como

com transtornos neuropsiquiátricos como a esquizofrenia (OWEN *et al.*, 2011). Ademais, alguns autores propõem que transtornos como a esquizofrenia e o transtorno bipolar poderiam ter sua origem durante o desenvolvimento (MORRIS-ROSENDAHL; CROCCO, 2020).

A relação entre fatores de risco genéticos e ambientais para o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas é complexa, dinâmica e heterogênea, e sugere que existem mecanismos patogênicos que se sobrepõem para gerar distúrbios do neurodesenvolvimento (CARLSSON *et al.*, 2020; MORRIS-ROSENDAHL; CROCCO, 2020; PARENTI *et al.*, 2020). Por exemplo, além do risco genético, fatores ambientais podem regular a expressão gênica através de mecanismos epigenéticos como metilação do DNA, modificação das histonas e remodelamento da cromatina (HAN *et al.*, 2021b).

Uma revisão realizada por Han e colaboradores (2021a) encontrou que fatores maternos durante a gestação como infecções, obesidade, asma, doenças autoimunes, estresse psicossocial, ansiedade ou depressão, entre outras, aumentam estatisticamente o risco de desenvolver transtornos do neurodesenvolvimento na descendência. Além do mais, estudos em humanos demonstraram associações entre padrões de metilação do DNA alterados e asma alérgica na mãe durante a gestação, assim como em casos de diabetes gestacional e obesidade, persistindo ao longo da vida (HAN *et al.*, 2021a).

Considerando que os transtornos do neurodesenvolvimento têm sido epidemiologicamente associados a um estado inflamatório exacerbado na mãe (entre outros fatores), e que durante o neurodesenvolvimento existem janelas denominadas “períodos críticos”, onde qualquer perturbação pode interferir no curso típico do desenvolvimento, é de extrema relevância o estudo dos efeitos da inflamação no neurodesenvolvimento durante a gestação.

## 1.2 SISTEMA IMUNE E NEURODESENVOLVIMENTO

Durante a gestação, o sistema imune da mãe sofre adaptações para proteger o organismo materno e fetal frente a um desafio imune havendo uma modulação do sistema imunológico que leva a respostas diferenciadas dependendo do estágio da gravidez (MOR; CÁRDENAS, 2010; RACICOT *et al.*, 2014). De tal modo que, ao contrário da

antiga concepção em que a gestação se tratava de um estado de imunossupressão, durante esse processo o sistema imunológico está ativo, funcional e regulado (MOR; ALDO; ALVERO, 2017; MOR; CÁRDENAS, 2010). De fato, o sistema imunológico materno deve ter a capacidade de responder apropriadamente frente a um sinal de perigo para um resultado bem-sucedido na gravidez. Da mesma forma, é importante compreender que a unidade fetal-placentária também tem um sistema imunológico em desenvolvimento que é capaz de modificar ainda mais a resposta imune materna, assim como a forma que o sistema imune fetal reage às condições ambientais (MOR; ALDO; ALVERO, 2017).

O sistema imune desempenha um papel fundamental nas diferentes etapas da gestação. A gravidez começa com um ambiente pró-inflamatório, que permite a implantação do embrião e a constituição da placenta, mediado por células imunes, citocinas, fatores de crescimento, e moléculas de adesão (VAN MOURIK; MACKLON; HEIJNEN, 2008). Uma vez implantado o embrião, segue uma etapa de rápido crescimento e desenvolvimento do feto, caracterizado por um ambiente anti-inflamatório na mãe e mediado por macrófagos decíduais, células *Natural Killer* (NK) e células T regulatórias com o propósito de evitar gerar uma resposta imune que possa afetar o feto e manter a placenta (MOR; ALDO; ALVERO, 2017; RACICOT *et al.*, 2014). Uma vez o feto tem completado o desenvolvimento, durante o último período imunológico da gestação, é preciso gerar um novo ambiente de inflamação para desencadear o parto. O período final da gestação é caracterizado por um influxo de células imunes no miométrio para promover a contração do útero, a expulsão do bebê e a rejeição da placenta (MOR; CÁRDENAS, 2010).

Pesquisas tem sugerido que as citocinas têm um papel fundamental no desenvolvimento normal do cérebro do feto e sabe-se que são responsáveis pela indução do neuroepitélio, assim como pela regulação da auto-renovação das células da glia; também regulam a migração de neurônios e modulam a localização de trajetos de axônios, além de ter um papel na modulação da vascularização, na sobrevivência neuronal e na formação e função das sinapses (DEVERMAN; PATTERSON, 2009; RATNAYAKE *et al.*, 2013). Ainda, pesquisas mais recentes demonstraram que as

citocinas podem influenciar diretamente as modificações epigenéticas do DNA (NARDONE; ELLIOT, 2016).

Sabendo que os componentes celulares e moleculares do sistema imune têm funções relevantes no neurodesenvolvimento normal do feto, o suposto é que a ativação anormal desses componentes poderia levar a uma variedade de distúrbios do sistema nervoso central (SOLEK *et al.*, 2018). Portanto, os modelos animais de ativação imune materna estão baseados na premissa de que a presença de um ativador do sistema imune é capaz de romper esse balanço de citocinas durante a gestação, comprometendo o neurodesenvolvimento da prole (VAN DEN EYNDE *et al.*, 2014).

### 1.3 ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA (AIM)

A inflamação durante a gestação em modelos de ativação imune materna tem mostrado afetar vários aspectos vulneráveis do desenvolvimento do cérebro no feto, o que contribui para as diversas manifestações de disfunções neuronais e comportamentais que podem se manifestar ao longo da vida como transtorno do espectro autista, esquizofrenia, depressão, ansiedade, entre outros.

Estudos epidemiológicos têm mostrado associação entre infecções durante a gestação e transtornos do neurodesenvolvimento, considerando-se um fator de risco para a apresentação de doenças neuropsiquiátricas nos descendentes (ESTES; MCALLISTER, 2016; KNUESEL *et al.*, 2014). Sendo que infecções maternas com rubéola, influenza, herpes, citomegalovírus, *Toxoplasma gondii*, assim como patógenos bacterianos que geram tonsilite, sinusite e pneumonia, entre outros, aumentaram a incidência de distúrbios do neurodesenvolvimento (ESTES; MCALLISTER, 2016; KNUESEL *et al.*, 2014; MEYER, 2014; SOLEK *et al.*, 2018). Uma alteração no balanço de citocinas pró e anti-inflamatórias poderia estar envolvida nessas alterações do neurodesenvolvimento fetal (RATNAYAKE *et al.*, 2013).

A placenta exerce papel importante na AIM através de mecanismos que envolvem fatores imunes, endócrinos e metabólicos, assim como ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e estresse oxidativo em casos de inflamação durante a gestação, afetando o feto de forma direta e indireta (HOWERTON; BALE, 2012). A



inflamação durante a gestação pode influenciar o curso do neurodesenvolvimento através de programação de vias inflamatórias fetais, assim como da maquinária epigenética (HAN *et al.*, 2021a).

Modelos de AIM de doenças do neurodesenvolvimento manifestam ativação microglial, adquirindo um fenótipo pró-inflamatório que leva a alterações da morfologia, densidade, e aumento da transcrição de genes envolvidos, o que pode levar a alterações epigenéticas que aumentam a vulnerabilidade do indivíduo para desenvolver um transtorno do neurodesenvolvimento (HAN *et al.*, 2021<sup>a</sup>; LENZ; NELSON, 2018).

Os diversos modelos de AIM têm sido amplamente utilizados como modelos de transtorno do espectro autista, esquizofrenia, depressão e ansiedade (SOLEK *et al.*, 2018). Esses modelos têm mostrado que as citocinas pró-inflamatórias envolvidas nessa resposta são a interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral  $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) e a IL-1. A IL-6 circulante interage no cérebro induzindo a síntese de prostaglandinas no hipotálamo, as quais são responsáveis por gerar alterações na temperatura corporal. Da mesma forma, a IL-6 é conhecida por ser responsável pelas alterações na descendência, uma vez que níveis aumentados foram encontrados no soro, bem como no líquido amniótico, placenta e cérebro do feto (BOKSA, 2010; KNUESSEL *et al.*, 2014).

Os efeitos da ativação imune materna na descendência têm mostrado dependência do tipo de imunógeno e do momento da exposição ao imunógeno (BOKSA, 2010; HAN *et al.*, 2021a; MEYER *et al.*, 2006). Modelos de AIM induzidos com lipopolissacarídeo, assim como com ácido poliinosínico policitidílico (PolyI:C) administrados em diferentes etapas da gestação mimetizando infecções de origem bacteriana ou viral, têm mostrado gerar distúrbios no comportamento da prole associados às principais características de autismo e esquizofrenia, assim como patologias ao nível neurológico como diminuição da espessura cortical e do volume hipocampal, aumento do tamanho ventricular, malformações corticais, alterações nas células de Purkinje e nos níveis de proteínas sinápticas, distúrbios na transmissão sináptica bem como alterações na plasticidade a longo prazo (ESTES;MCALLISTER, 2016).

Estudos mostraram também que a inflamação materna induzida por LPS pode afetar a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que promove o crescimento e a sobrevivência em neurônios e do receptor de tirosina quinase B (TrkB)

ao qual o BDNF se une para regular respostas biológicas da célula como sobrevivência celular, proliferação e diferenciação de células neurais normais e neoplásicas (BINDER; SCHARFMAN, 2004; GUPTA *et al.*, 2013; KENTNER *et al.*, 2016). Um desbalanço nesse sistema pode gerar comportamentos do tipo depressivo nesses animais (ZHANG; YAO; HASHIMOTO, 2016).

A plasticidade tem sido estudada em diversos contextos. Krägeloh-mann e colaboradores (2017) coletaram informações de pesquisas onde foi avaliada a neuroplasticidade após lesões uni ou bilaterais no período perinatal e na idade adulta e concluíram que dependendo da lesão, o cérebro jovem pode-se reorganizar para recuperar a função. No entanto, as habilidades compensatórias do cérebro em desenvolvimento são limitadas, e a plasticidade e a adaptabilidade dependem também da etapa do desenvolvimento (AYANLAJA *et al.*, 2017; SCHOLZEN e GERDES, 2000).

Além disso, existem diferentes estruturas e substâncias envolvidas na modificação da plasticidade sináptica. Eventos como arborização axonal e alterações dos espinhos dendríticos podem levar a novos e maiores quantidades de contatos sinápticos. Também existem proteínas envolvidas na modificação da plasticidade sináptica que têm sido utilizadas como marcadores de densidade pré e pós-sináptica, além da neurotransmissão excitatória/inibitória, que também resulta um fator importante no desenvolvimento da plasticidade (CHAUDHURY *et al.*, 2016). Entre os reguladores da transmissão sináptica, encontram-se a sinapsina, sinaptotagmina e sinaptofisina, as quais fazem parte do processo de liberação das vesículas sinápticas, permitindo liberação de neurotransmissores nos terminais sinápticos (MILNER; MCEWEN; WATERS, 2014; SONG e AUGUSTINE, 2015; XU *et al.*, 2017) e são de importância já que poderiam ter um papel importante no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (BERECZKI *et al.*, 2018).

Modelos de AIM induzidos por uma dose alta de LPS, mostraram também níveis aumentados de alguns marcadores de estresse oxidativo, bem como aumento dos níveis de citocinas e da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), um marcador de astrócitos, envolvido no funcionamento da barreira hematoencefálica (BHE), vias de transdução de sinais e interações entre neurônios e glia (MIDDELDORP; HOL, 2011), em várias regiões

cerebrais mostrando que os prejuízos no cérebro da prole podem se manter ao longo prazo após o insulto pré-natal inicial (BOKSA, 2010).

Por outro lado, a prevalência de transtornos como TEA e TDAH é maior em homens, no entanto, são poucos os estudos orientados a determinar os mecanismos envolvidos no dimorfismo sexual. Contudo, pesquisas têm sugerido que o sexo da descendência influencia a expressão fenotípica dos transtornos do neurodesenvolvimento (HAN *et al.*, 2021b), deixando de lado as teorias onde as fêmeas apresentam versões “atenuadas” desses transtornos. Inclusive em modelos animais de AIM também é possível observar diferenças sexuais na prole, desde as afetações na placenta, no desenvolvimento do cérebro, até no comportamento durante o período juvenil e adulto desses animais (BRAUN *et al.*, 2019).

#### 1.4 EPIGENÉTICA

Os mecanismos epigenéticos podem mediar a influência do meio ambiente no genoma, regulando a transcrição gênica que resulta vital para a estabilidade e plasticidade dos circuitos neuronais (FAGIOLINI; JENSEN; CHAMPAGNE, 2009). Existem três principais mecanismos epigenéticos: metilação do DNA, modificação das histonas e remodelamento da cromatina (HAN *et al.*, 2021b), onde a metilação é a modificação epigenética mais estudada e envolve a família das DNA metiltransferases ou DNMTs.

As alterações epigenéticas envolvidas em transtornos do neurodesenvolvimento estão relacionadas com alterações em genes com papéis importantes em funções como a regulação da síntese de proteínas, a regulação transcricional e epigenética, assim como na sinalização sináptica (PARENTI *et al.*, 2020).

As DNMTs catalisam a reação de metilação da S-adenosilmetionina para o resíduo de citosina do DNA. A família das DNMTs possui características diferenciadas entre elas, que variam entre a manutenção do padrão de metilação do DNA pré-existente durante a divisão celular (DNMT1), e a criação de novos padrões de metilação durante o desenvolvimento e em resposta a estímulos ambientais (DNMT3a e 3B)(ALEX *et al.*, 2019). Além disso, a família de enzimas TET (*ten-eleven translocation*) são as

encarregadas da demetilação ativa do DNA através do processo de oxidação da citosina metilada (WU; ZHANG, 2017).

Estudos em pacientes com diagnóstico de TEA sugerem padrões de metilação alterados nesses indivíduos, mostrando hipermetilação global com alterações na expressão das DNMT, assim como alterações nos polimorfismos de um nucleotídeo (SNPs) nos genes que codificam as DNMTs (ALEX *et al.*, 2019; JAMES *et al.*, 2014; SHPYLEVA *et al.*, 2014).

O fator de transcrição silenciador RE1 (Rest) é expresso em células fora do sistema nervoso, reprimindo a expressão de genes neuronais. A ação do Rest envolve diversas proteínas que atuam diminuindo a acetilação das histonas ou aumentando a metilação do DNA, assim, a deleção ou expressão ectópica do Rest pode levar a letalidade embrionária ou disfunções do desenvolvimento (SWEATT, 2010).

O Rest apresenta uma influência epigenética em genes envolvidos com a diferenciação e função neuronal e está envolvido na resposta neuroendócrina ao estresse. Em neurônios adultos confere resistência ao estresse oxidativo e é essencial para manter a viabilidade neuronal (MAMPAY; SHERIDAN, 2019; THIEL; EKICI; RÖSSLER, 2014). Martin e Grapin-Botton (2017) sugerem que alterações na expressão do Rest poderia promover o desenvolvimento de transtornos do neurodesenvolvimento e doenças neurológicas. Além disso, a expressão e a atividade do Rest podem estar alteradas em diversas patologias como isquemia cerebral, epilepsia, ou Alzheimer, podendo atuar como um fator protetor sob algumas condições, ou promovendo morte neuronal por disfunções (BUFFOLO *et al.*, 2021).

Por outro lado, retroelementos como Line1 (*Long interspersed nuclear element-1*) também têm sido estudados em contextos de doenças do neurodesenvolvimento e estresse, sugerindo que a expressão aberrante desses elementos poderia trazer consequências negativas para o organismo que podem persistir ao longo da vida, inclusive levando a alterações na aprendizagem e memória decorrentes de estresse crônico e alterações na função do receptor de glucocorticóides (GR) (LAPP; HUNTER, 2019). O Line1 é utilizado como marcador diagnóstico de algumas doenças, e está envolvido também na modulação do sistema imune, portanto, disfunções na sua expressão podem levar a uma resposta imune inata exacerbada, assim como induzir um

estado autoimune e inflamação. O Line1 atua através de inserções, recombinações e deleções alterando a estrutura do genoma, o que pode afetar os processos do neurodesenvolvimento, assim como pode influenciar o comportamento (ZHANG; ZHANG; YU, 2020).

Sendo assim, resulta relevante avaliar a neuroplasticidade da prole cuja mãe foi submetida a um desafio imunológico durante a gestação, levando em consideração os processos que ocorrem durante o neurodesenvolvimento, e a possível relação entre alterações comportamentais, moleculares e epigenéticas na prole.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar alterações comportamentais, proteicas e epigenéticas na prole de ratas submetidas a ativação imune materna induzida com LPS no dia 16 da gestação.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar se o LPS induziu comportamento doentio nas fêmeas durante o 16º dia de gestação;
- b) Avaliar o número de vocalizações ultrassônicas da prole durante o DPN13;
- c) Avaliar o comportamento de brincar e a memória espacial e de reconhecimento de objetos na prole adolescente;
- d) Avaliar a interação social, a memória espacial e de reconhecimento de objetos, assim como a atividade exploratória da prole durante a idade adulta;
- e) Quantificar a expressão das proteínas BDNF, doublecortin, sinaptofisina, receptor de glicocorticóide, receptor de oxitocina, assim como GFAP no córtex pré-frontal da prole adolescente e adulta;
- f) Avaliar a expressão dos fatores Rest, Line1 e sua metilação no córtex pré-frontal da prole adolescente;
- g) Quantificar os marcadores de metilação DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, assim como TET1, TET2 e TET3 no córtex pré-frontal da prole adolescente.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas Wistar fêmeas e machos para acasalamento a partir de 8 semanas de vida, entre 200 e 250 gr. de peso, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno em condições de temperatura de  $\pm 21^{\circ}\text{C}$ , ciclo claro/escuro de 12 horas e, com ração comercial e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais seguiram os Princípios Éticos em Pesquisa Animal adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas, protocolo 17/2019 (ANEXO A).

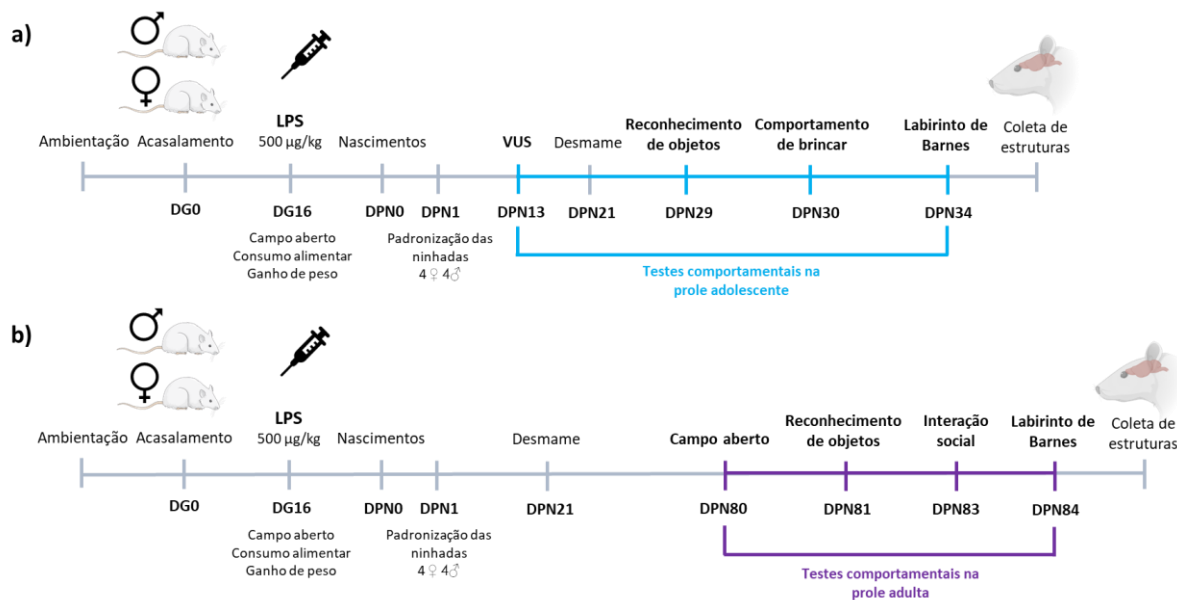
#### 3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a primeira parte do estudo foram utilizadas fêmeas gestantes que foram injetadas com solução salina ou LPS no dia dezesseis de gestação (DG16). Duas horas após, as fêmeas foram submetidas à avaliação do comportamento doentio e mantidas no biotério até o dia do parto que foi considerado o dia pós-natal zero (DPN0) da prole. No DPN1 as ninhadas foram padronizadas em 4 fêmeas e 4 machos cada uma, os quais foram utilizados para os procedimentos experimentais. A padronização das ninhadas é realizada com o objetivo de diminuir a variabilidade no comportamento materno, o qual pode ser influenciado pelo sexo dos filhotes. Posteriormente, um casal de cada ninhada foi selecionado aleatoriamente para cada teste. No DPN13 foram registradas as vocalizações ultrassônicas (VUS), e após o desmame (DPN21), os animais foram separados por sexo até a adolescência (a partir do DPN29) onde passaram pelos testes de comportamento de brincar, reconhecimento de objetos e labirinto de Barnes (Figura 1, A).

Para a segunda parte do estudo os procedimentos foram feitos da mesma forma, no entanto, os animais prole das fêmeas tratadas com LPS ou salina passaram pelos testes comportamentais de campo aberto, interação social, labirinto de Barnes e

reconhecimento de objetos a partir da 10ª semana de vida quando já são considerados adultos (Figura 1, B)(SENGUPTA, 2013).

Figura 1 – Desenho experimental dos testes comportamentais na prole adolescente e adulta.



Fonte: da autora

Legenda: a) Desenho experimental e testes comportamentais realizados nos animais adolescentes;

b) Desenho experimental e testes comportamentais realizados nos animais adultos.

Após os testes comportamentais foram coletadas estruturas encefálicas (córtex pré-frontal) para ensaio de *western blotting*, e qPCR e, em seguida foram mantidas no biofreezer a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até o respectivo processamento.

### 3.3 ACASALAMENTO

Após ambientação no biotério do Laboratório de Neuroimunomodulação durante 10 dias, no final da tarde, as fêmeas foram colocadas para acasalamento com machos experientes em uma proporção de duas ou três fêmeas para cada macho. Na manhã seguinte foi feito esfregaço vaginal para avaliar presença de espermatozoides. A presença de espermatozoides foi considerada como o dia zero de gestação (DG0) e a



fêmea gestante foi colocada em uma caixa individual sob as mesmas condições ambientais descritas anteriormente.

### 3.4 MODELO DE ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA

Foi utilizado lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, sorotipo 026:B6, Sigma-Aldrich (10mg/ml) dissolvido em solução salina 0.9% e administrado de forma intraperitoneal a uma dose de 500 µg/kg durante o dia dezesseis de gestação (DG16). O grupo controle recebeu uma dose equivalente de solução salina 0,9% (1 ml/kg).

O DG16 e a dose de 500µg/kg foram escolhidos com base em trabalhos anteriores realizados neste laboratório por Vieira (2017) e Parreiras (2018, dados não publicados), onde foi induzido o comportamento doentio.

### 3.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DOENTIO DAS FÊMEAS GESTANTES

Duas horas após a administração de LPS ou salina, as fêmeas gestantes foram submetidas ao teste de campo aberto com o objetivo de avaliar a atividade locomotora. O aparato consiste em uma arena circular de acrílico, com diâmetro de 60 cm, e 50 cm de altura. Cada animal foi colocado de forma individual no centro da arena e foram filmados durante 5 minutos para posterior análise. Em seguida o aparato foi limpo com solução de etanol 5%. Foi utilizado o software Ethovision XT versão 9.0 (Noldus Information Technology b.v.) para a análise automática da distância percorrida e o tempo de imobilidade.

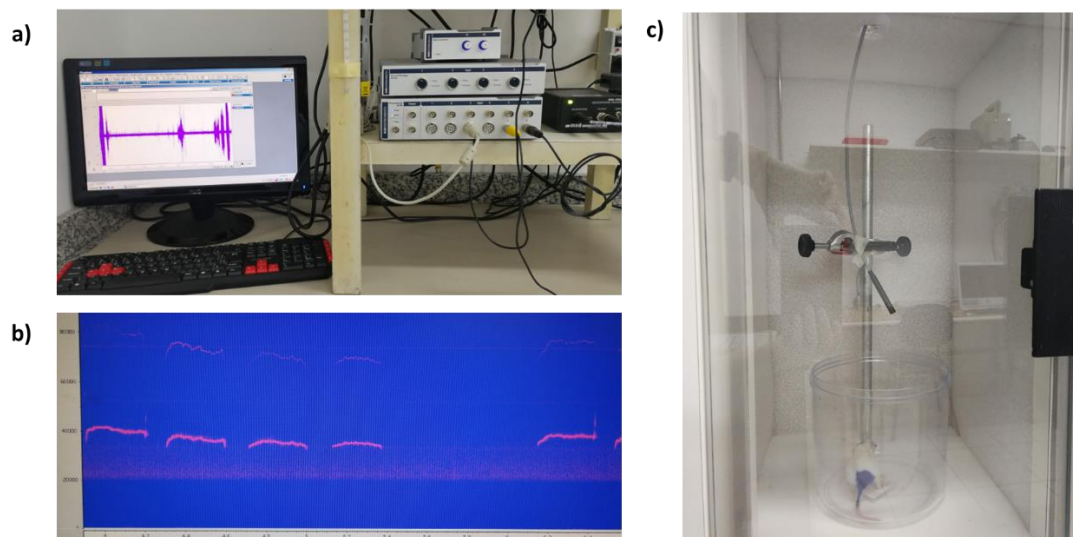
Também foram avaliados o ganho de peso e a ingestão alimentar 24 horas depois da administração de LPS ou salina, uma vez que a anorexia ou perda de apetite são sintomas comuns que ocorrem como resultado de processos inflamatórios agudos e crônicos (SAPER *et al.*, 2012 em NILSSON *et al.*, 2017).

### 3.6 VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS INDUZIDAS POR ISOLAMENTO (VUS) NA PROLE

A avaliação das vocalizações ultrassónicas tem sido amplamente estudada em modelos de autismo, uma vez que representa uma forma importante de avaliação das habilidades comunicativas ao longo da vida. O propósito do teste foi detectar alterações na comunicação antes do desmame.

O equipamento utilizado para o teste de VUS induzidas por isolamento consiste em uma caixa de isolamento acústico que contém no interior de forma suspensa um microfone de captação ultrassónica, conectado a um amplificador (Microphone Amplifier Med Associates inc, modelo ANL-94-1). O registro é feito em forma de espectrograma e é visualizado e analisado no software LabChart (ADInstruments, Figura 2).

Figura 2 – Equipamento para análise de vocalizações ultrassónicas.



- Fonte: da autora.  
 Legenda: a) Equipamento utilizado para captar vocalizações ultrassónicas;  
 b) Espectrograma de VUS;  
 c) Filhote na caixa de isolamento acústico.

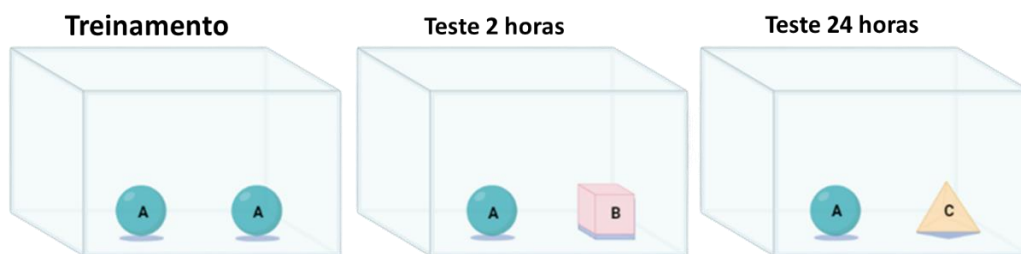
O teste foi realizado nos filhotes durante o DPN 13. No dia do teste os animais foram isolados em caixas de polipropileno com maravalha durante 15 minutos em uma sala mantida a uma temperatura de 25°C, e posteriormente foram colocados na caixa de isolamento acústico, onde foram registradas as VUS durante 3 minutos. Em seguida o aparato foi limpo com solução de etanol 5%. Para este trabalho foram avaliadas o número de VUS dos filhotes.

### 3.7 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS NA PROLE

O objetivo do teste de reconhecimento de objetos é avaliar a capacidade do animal para distinguir um objeto conhecido (previamente explorado) na presença de um novo objeto desconhecido (BATISTA; GIUSTI-PAIVA; VILELA, 2018). O teste tem sido utilizado para avaliação de memória e aprendizagem, preferência pela novidade, influência de diferentes regiões cerebrais no processo de reconhecimento (ANTUNES; BIALA, 2012).

Na prole, o teste foi feito no DPN 29 durante a adolescência, e DPN81 na prole adulta em uma arena quadrada de acrílico (40 cm x 40 cm para os animais adolescentes, e 60 cm x 60 cm para os adultos). O dia anterior ao teste os animais foram ambientados na arena sem os objetos durante 10 minutos. No dia do teste os animais foram colocados no centro da arena, onde foram apresentados dois objetos idênticos (objeto A, figura 3) durante 10 minutos (período de treinamento). Duas horas após, um dos objetos conhecidos (A) foi trocado (objeto B); e 24 horas depois o objeto B foi trocado pelo objeto C. Todos os objetos apresentavam tamanhos e texturas semelhantes, mas formas diferentes. O aparato foi limpo com solução de etanol 5% após cada animal.

Figura 3 – Teste de reconhecimento de objetos.



Fonte: da autora, criado com BioRender.

Legenda: A figura representa o aparato utilizado para o teste de reconhecimento de objetos. Durante o treinamento são apresentados dois objetos esféricos iguais (objetos A); para os testes de 2 horas e 24 horas um dos objetos A é trocado pelos objetos B (cubo) e C (piramidal), respectivamente.

Para a análise da memória de reconhecimento de curta e longa duração foi avaliado o tempo gasto explorando cada um dos objetos (familiar ou novo) considerando o tempo que o animal entrou em contato direto (cheirando ou tocando) com o objeto.

Também foi avaliado o índice de reconhecimento (IR) de acordo à metodologia descrita por Batista e colaboradores (2018), conforme a equação a seguir:

$$IR = TN / (TF + TN)$$

Onde o TF é o tempo de exploração do objeto familiar (objeto A), e o TN é o tempo de exploração do objeto novo (objeto B ou C).

### 3.8 COMPORTAMENTO DE BRINCAR E INTERAÇÃO SOCIAL NA PROLE

Os testes de comportamento de brincar e de interação social são utilizados para avaliar o desempenho social dos animais em diferentes momentos da vida. Durante a adolescência o teste foi realizado no DPN 30, onde o comportamento de brincar é mais elevado (PANKSEPP, 1981), e no DPN 83 onde os animais já são considerados adultos.

O aparato consiste em uma cuba de vidro de 40 cm de altura, largura e comprimento, que é forrada com maravalha. A metodologia foi feita de acordo aos protocolos estabelecidos no Laboratório de Neuroimunomodulação, onde os animais foram ambientados individualmente à arena no dia anterior ao teste durante 10 minutos. No dia do teste, os animais foram isolados em caixas de polipropileno com maravalha, ração e água a disposição durante 3,5 horas, e posteriormente dois animais da mesma idade, mesmo tratamento, mas diferente ninhada foram colocados na arena e foram filmados durante 15 minutos. O comportamento foi avaliado de forma manual, considerando comportamentos classificados como interação social ativa como cheirando e seguindo, assim como comportamentos de solicitação da brincadeira ou "*pouncing*" e o outro animal "aceitando" a brincadeira, ou "*pinning*".

### 3.9 CAMPO ABERTO NA PROLE

O teste de campo aberto foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade locomotora da prole durante a idade adulta. O teste foi realizado no DPN80. O aparato consiste em uma cuba de acrílico de 60 cm x 60 cm. Cada animal foi colocado no centro

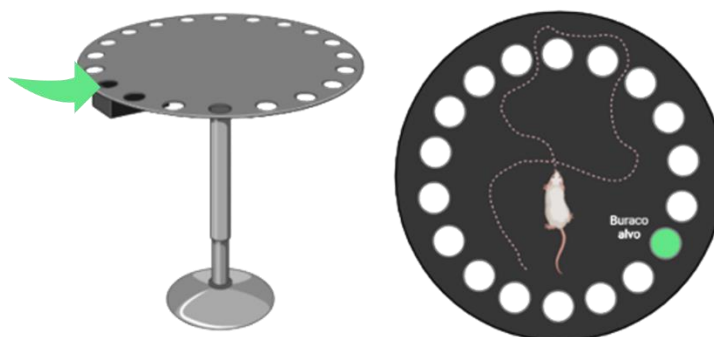
da arena e filmado durante 20 minutos. Foram avaliados a distância percorrida e o tempo de imobilidade de forma automatizada no software Ethovision XT versão 9.0 (Noldus Information Technology b.v.)

### 3.10 LABIRINTO DE BARNES NA PROLE

O labirinto de Barnes é utilizado como paradigma comportamental em roedores, para avaliar a aprendizagem espacial e memória. No teste, os animais aprendem a relação entre sinais distais no ambiente circundante e um local de escape fixo, sendo uma tarefa dependente do hipocampo (PITTS, 2018). A metodologia do teste foi feita de acordo à metodologia descrita por Rosenfeld e Ferguson (2014). O labirinto consiste em uma arena circular suspensa um metro acima do nível do chão, com 20 orifícios, onde só um dos orifícios conduz a uma caixa de escape (figura 4, seta verde). Nas paredes circundantes à arena são colocadas pistas visuais para o animal se localizar. Uma luz forte é utilizada como estímulo aversivo, que funciona como motivação para o animal procurar o orifício de escape.

O teste é realizado durante 10 dias. Durante os dias 1-5, na etapa de aquisição, a caixa de escape foi colocada no mesmo local e cada animal foi colocado 2 vezes no centro da arena e filmado durante 3 minutos, com um intervalo de 15 minutos. Para essa etapa foi avaliado o tempo de latência para chegar no buraco alvo. No dia 6 (dia do teste) a caixa de escape é retirada e os animais foram colocados na arena e filmados durante 90 segundos. Foram avaliadas distância percorrida na arena durante o teste, o tempo de latência para chegar ao buraco alvo, a frequência e o tempo de exploração total do buraco alvo. Também foi quantificado o tempo e a frequência que os animais ficaram no quadrante alvo, assim como o número de erros. Nos dias 7-9 a localização da caixa foi trocada para o buraco oposto e foi repetida a metodologia realizada para os dias de aquisição, onde foi avaliado o tempo de latência para chegar no novo buraco alvo. O dia 10 é realizado o teste da aprendizagem reversa, e foram avaliados os mesmos parâmetros do teste do dia 6 para o novo buraco alvo e para o buraco oposto.

Figura 4 – Labirinto de Barnes.



Fonte: da autora, criado com BioRender.

Legenda: A figura 4 representa o aparato utilizado para o teste do labirinto de Barnes com a caixa de escape (seta verde, esquerda) e a vista superior durante o teste (direita).

Nos animais adolescentes, o teste foi feito no DPN 34, já que segundo McHail e colaboradores (2018, em VALIBEIGI *et al.*, 2018) a capacidade de navegação espacial emerge pela primeira vez no final da terceira semana pós-natal.

### 3.11 COLETA DE ESTRUTURAS ENCEFÁLICAS E *WESTERN BLOT*

Após morte por excesso de anestésico inalatório, foram extraídos os encéfalos dos animais. Foi dissecado o córtex pré-frontal baseado no protocolo estabelecido no Laboratório de Neuroimunomodulação na região do Bregma 3,72 mm aproximadamente, e foram armazenados individualmente e congelados em nitrogênio líquido para posterior uso.

A quantificação da concentração de proteínas foi realizada através do método de Bradford. Inicialmente as amostras foram descongeladas, homogeneizadas com ajuda de um processador ultrassônico em um tampão de lise com inibidor de proteases (P8340, Sigma-Aldrich). Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 9200 rpm durante 15 minutos e em seguida foi coletado o sobrenadante. Finalmente foi feita a leitura da absorbância no leitor de microplacas Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek Instruments, Inc.) a uma longitude de onda de 595 nm, e foi quantificada a concentração de proteínas das amostras no software Gen5 versão 2.0 (BioTek Instruments, Inc.).

Seguidamente, as proteínas foram separadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), foram utilizadas 30 µg/15 µl de proteína por cada amostra, e subsequentemente foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Em seguida foi feito o bloqueio de ligações inespecíficas no leite 5% em solução de TBST durante 2 horas. As membranas foram incubadas overnight nos anticorpos anti-BAX, anti-BCL2, anti-pró-BDNF, anti-DCX, anti-GFAP, anti-GR, anti-OTR, anti-PSD95 e anti-sinaptofisina, e posteriormente nos anticorpos secundários específicos (detalhes dos anticorpos utilizados no quadro 1) durante 1 hora. Todas as membranas foram digitalizadas no 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.

Quadro 1 – Anticorpos utilizados na técnica de Western blotting.

(continua)

Anticorpo	Proteína alvo	Fonte	Código	Espécie/ Isotipo	Peso molecular	Concentração	Função
Anti-β-Actin	β-actina	Sigma-Aldrich	A5441	Mouse IgG/ Monoclonal	42 kDa	1:1000	Proteína constituinte do citoesqueleto envolvida na estrutura e integridade celular.
Anti-BAX	BAX	Abcam	ab 32503	Rabbit IgG/ Monoclonal	21 kDa	1:1000	Proteína pró-apoptótica. Permeabiliza membrana mitocondrial.
Anti-Bcl-2	BCL 2	Abcam	Ab 59348	Rabbit IgG/ Policlonal	26 kDa	1:500	Proteína anti-apoptótica. Controla permeabilidade mitocondrial.
Anti-pro-BDNF	Pro-BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor)	Santa Cruz Biotechnology	Sc 65514 HRP	Mouse IgG/ Monoclonal HRP	Precurso: 32 kDa Maturado: 14 kDa	1:1000	Promove crescimento e sobrevivência neuronal.
Anti-Doublecortin	Doublecortin (DCX)	Santa Cruz Biotechnology	Sc 271390 HRP	Mouse IgG/ Monoclonal HRP	40 kDa	1:1000	Direciona migração neuronal regulando a organização e estabilidade dos microtúbulos.
Anti-GFAP	GFAP	Santa Cruz Biotechnology	Sc 33673	Mouse IgG/ Monoclonal	50 kDa	1:1000	Marcador de astrócitos.
Anti-GR	GR (Glucocorticoid Receptor)	Santa Cruz Biotechnology	Sc 1004	Rabbit IgG/ Policlonal	95/90 kDa	1:1000	Medeia ações dos glucocorticóides. Modula taxas de transcrição de genes.

Quadro 1 – Anticorpos utilizados na técnica de Western blotting.

(conclusão)

Anticorpo	Proteína alvo	Fonte	Código	Espécie/ Isotipo	Peso molecular	Concentração	Função
Anti-OTR	OTR (Oxytocin Receptor)	Abcam	Ab 181077	Rabbit IgG/ Monoclonal	45 kDa	1:2000	Influencia fisiologicamente a cognição social espécie e sexo específica.
Anti-PSD95	PSD95	Santa Cruz Biotechnology	Sc 32290	Mouse IgG/ Monoclonal	95 kDa	1:1000	Promove maturação das sinapses. Regula força e plasticidade sináptica.
Anti-synaptophysin	Synaptophysin		Ab 8049	Mouse IgG/ Monoclonal	38 kDa	1:1000	Proteína de pequenas vesículas pré-sinápticas. Marcador de plasticidade sináptica.
Goat anti-mouse		Abcam	Ab 6789 HRP	Goat IgG (HRP)/ Policlonal		1:4000	
Goat anti-rabbit		Abcam	Ab 6721 HRP	Goat IgG (HRP)/ Policlonal		1:4000	

Fonte: da autora. Informação das proteínas obtida da base de dados GeneCards.

### 3.12 PCR

A seguir descrevem-se os procedimentos realizados para a análise da expressão gênica dos fatores Rest e Line1, assim como das enzimas DNA metiltransferases (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b) e *ten-eleven translocation* (TET1, TET2 e TET3), envolvidas na metilação e demetilação do DNA.

#### 3.12.1 Análise da expressão gênica

##### 3.12.1.1 Extração de Ácido Ribonucleico (RNA) total

O RNA total foi isolado de estruturas cerebrais previamente coletadas utilizando o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol. Após homogeneização das estruturas em 0,5 ml do reagente TRIzol®, a separação da fase aquosa foi realizada pela adição de 0,2 ml de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) e centrifugação (14.000 rpm) por 15 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação, a fase aquosa foi coletada (sobrenadante)



em tubos devidamente identificados, sendo descartada a fase precipitada. Em seguida, a precipitação do RNA foi realizada com adição de 0,5 ml de isopropanol absoluto gelado (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e novamente centrifugadas (14.000 rpm por 15 minutos). Ao término da centrifugação o isopropanol foi descartado por inversão e o RNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 75%, ressuspendido em 20  $\mu$ l de água DEPC e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A quantidade e pureza do RNA extraído foi estimada em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ( $\geq 1,8$ ) e OD 260/230 ( $\geq 1,0$ ) (NanoDrop2000, Thermo Scientific, Uniscience).

#### 3.12.1.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir da transcrição reversa de 2000 ng de RNA total previamente extraído e armazenado em biofreezer ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) na presença de 2 U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em reação com volume final de 20  $\mu$ L contendo 500  $\mu$ M de dNTP,  $\mu$ g/ml de OLIGO dT, 1X solução tampão de primeira fita, 40 U de inibidor de RNase, 10  $\mu$ M de DTT pela enzima Superscript II. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias e em seguida a reação de síntese aconteceu durante 50 minutos a  $50^{\circ}\text{C}$ , assim como inativação enzimática a  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Após o término da reação o cDNA sintetizado foi diluído a uma concentração final de 100 ng/ $\mu$ l e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.12.1.3 Quantificação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (q-PCR)

Para o estudo do padrão de expressão gênica as reações foram realizadas com iniciadores específicos. Todas as reações tiveram um volume final de 10  $\mu$ l; contendo 5  $\mu$ l de SYBR Green I Master, 0,4  $\mu$ M de iniciadores específicos, 1  $\mu$ l do cDNA sintetizado e q.s.p. de água *Milli-Q Rnase free*. A quantidade relativa dos transcritos foi determinada

pelo método limiar crítico comparativo  $2^{-\Delta Ct}$ . Neste método, a média do Ct do gene alvo é subtraída pela média do Ct dos controles utilizados, resultando em um  $\Delta Ct$ . Para o cálculo da expressão substituímos o valor de  $\Delta Ct$  obtido na fórmula  $2^{-\Delta Ct}$ . Os valores finais foram apresentados como razão entre a expressão do gene alvo em relação à média da expressão gênica dos genes utilizados como normalizadores. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais realizados em triplicata normalizados em relação ao controle (atribuído valor 1).

### 3.12.2 Determinação do estado de metilação do DNA

#### 3.12.2.1 Obtenção do DNA

Para obtenção das amostras de DNA genômico (gDNA) as estruturas previamente coletadas e armazenadas em Biofreezer ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) foram homogeneizadas em tampão de extração (10 mM de Tris pH 3.0; 0,5% de SDS, 5 mM de EDTA) e digeridas com proteinase K (20 mg/ml) por 16 h a  $56^{\circ}\text{C}$ . Em seguida o DNA foi isolado pelo método fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Trevilato e Line, 2000). A quantidade e pureza do gDNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ( $\geq 1,8$ ) e OD 260/230 ( $\geq 1,0$ ) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

#### 3.12.2.2 Tratamento do DNA

Cada amostra de gDNA foi dividida em três tubos contendo a mesma concentração (400 ng) e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2h com 1X NE buffer, 40 mM de glicose UDP e 1 unidade da enzima T4- $\beta$ -glicosiltransferase (T4-BGT) em reação com volume final de 20  $\mu\text{l}$ . Esta enzima transfere especificamente a porção de glicose da difosfoglicose de uridina (UDP-Glc) para 5-hidroximetilcitosina (5-hmeC) pela reação de glicosilação, produzindo o produto beta-glicosil-5-hidroximetilcitosina, o qual bloqueia especificamente a atividade de endonuclease *MspI* e faz com que ela reconheça apenas as sequências de CCGG metiladas (5-meC) e não metiladas, mantendo integras as

regiões CCGG hidroximetilcitosina (5-hmeC). Após a inativação da enzima T4-BGT por incubação a 65°C por 15 min, as amostras foram digeridas com as endonucleases *MspI* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA), que reconhece todas as sequências CCGG (metiladas e não metiladas), com exceção apenas das sequências CCGG com o produto beta-glucosil-5-hidroximetilcitosina e pela *HpaII* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) que reconhece todas as sequências CCGG com a diferença de que sequências CCGG metiladas (5-meC) promove a inibição de sua atividade catalítica. No terceiro tubo foi adicionado a mesma quantidade de H<sub>2</sub>O (gDNA não digerido – controle 100%). Todas as reações foram realizadas separadamente com volume final de 25 µl a 37°C por 2 horas.

### 3.12.2.3 Determinação do padrão de metilação

O padrão de metilação (5-meC) e hidroximetilação (5-hmeC) da região promotora dos genes do Retroelemento Line1 (Line1) e do Fator de transcrição de Silenciamento RE-1 (Rest-1) foi determinado em reações de qPCR contendo SYBR Green I Master 2x (12,5 µl) 0,4 µM de iniciadores específicos, 1,5 µl (25 ng) de gDNA tratado (nas 3 condições; H<sub>2</sub>O, *MspI* e *HpaII*) e q.s.p de H<sub>2</sub>O livre de nucleases. As sequências dos iniciadores foram desenhadas em regiões regulatórias com ilhas CpG dentro de regiões de hipersensibilidade a DnaseI, reguladas por marcas de modificações de histonas e com sítios de ligação de fatores de transcrição utilizando o programa Primer3 Input (versão 0.4.0). A determinação de estruturas secundárias e temperaturas de anelamento foram analisadas pelo programa Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com/>). Todas as sequências foram blastadas para confirmação da localização cromossômica pela ferramenta de PCR *in-silico* (<https://genome.ucsc.edu/>).

## 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o programa do software *GraphPad Prism 8* (versão 8.0.2, GraphPad Software, Inc.), e os valores expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Para a comparação de duas médias foi utilizado o teste *t* de *student*. Para correlacionar variáveis aleatórias foi utilizado o teste de correlação de

Pearson, considerando que a relação foi feita sempre para o mesmo animal. Para a comparação de duas variáveis foi utilizado o teste *two-way* ANOVA com o pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi baseado em valores de  $p$  inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Para a análise de correlação foi utilizado o teste de correlação de Pearson.

## 4 RESULTADOS

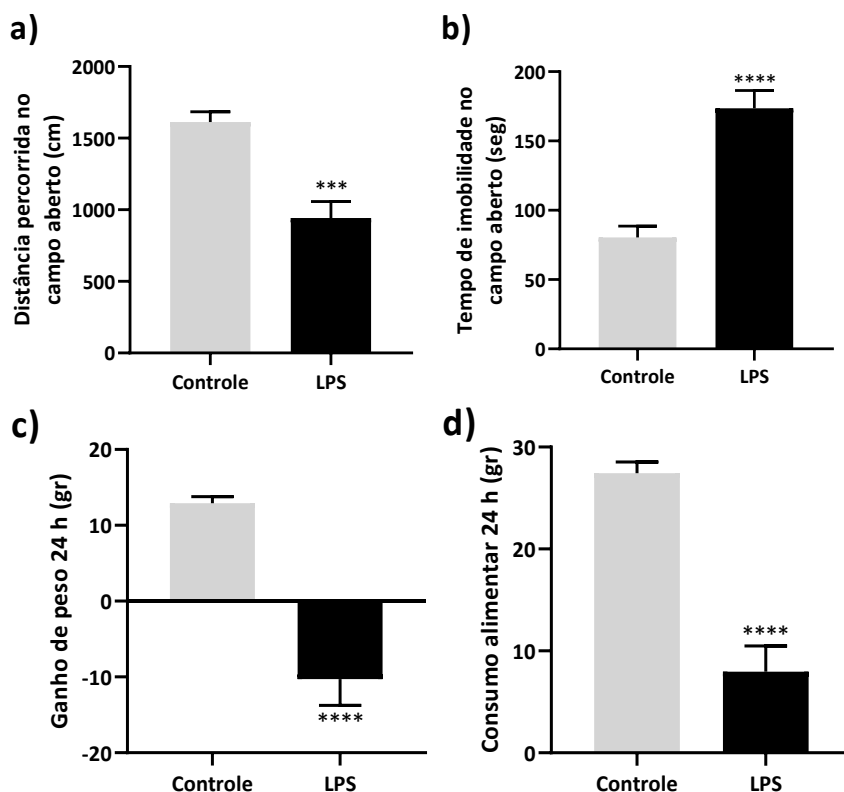
### 4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS NAS RATAS PRENHAS

#### 4.1.1 Comportamento doentio

A seguir (gráfico 1) mostram-se os resultados obtidos das ratas prenhas após administração de LPS ou salina intraperitoneal no 16º dia de gestação nos parâmetros avaliados no campo aberto, assim como a ingestão alimentar e o ganho de peso nas 24 horas posteriores à administração de LPS ou salina.

Nos parâmetros avaliados durante o teste de campo aberto, os resultados mostraram que as fêmeas tratadas com LPS tiveram redução da distância percorrida ( $p < 0,0005$ ; gráfico 1, a) e aumento no tempo de imobilidade ( $p < 0,0001$ ; gráfico 1, b) quando comparado com o grupo controle, evidenciando uma diminuição na locomoção 2h após da administração de LPS. Também foi avaliado o ganho de peso e o consumo alimentar 24h após a administração de LPS, onde encontrou-se que as fêmeas tratadas com LPS tiveram perda de peso ( $p < 0,0001$ ; gráfico 1, c), assim como menor consumo de alimento ( $p < 0,0001$ ; gráfico 1, d).

Gráfico 1 –Efeitos da administração intraperitoneal de LPS ou salina 0,9% no DG16.



Fonte: da autora

Legenda: **a)** distância percorrida no campo aberto em centímetros 2 horas após a administração i.p. de Salina ou LPS; **b)** tempo de imobilidade no campo aberto 2 horas após a administração i.p. de Salina ou LPS; **c)** ganho de peso 24 horas após administração i.p. de Salina ou LPS; **d)** ingestão alimentar 24 horas após administração i.p. de Salina ou LPS. Os símbolos representam o nível de significância: \*\*\* $p < 0,0005$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparado com o grupo controle no teste *t de student*.  $n = 11-14$  animais por grupo. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

Na tabela 1 mostra-se o número de ninhadas obtidas em relação ao tratamento administrado (salina ou LPS), e a porcentagem de perdas de ninhadas devido à morte neonatal, canibalismo, ou ninhadas insuficientes (menos de 8 animais por ninhada).

Tabela 1 – Proporção de fêmeas gestantes tratadas com salina ou LPS, nascimentos, perda de ninhadas e peso médio dos filhotes ao nascimento (DPN0).

Tratamento	% fêmeas que pariram	% ninhadas insuficientes	Filhotes nascidos (média ± EPM)
Salina	96,43	11,11	10 ± 0,51
LPS	43,64	54,17	5,93 ± 0,92

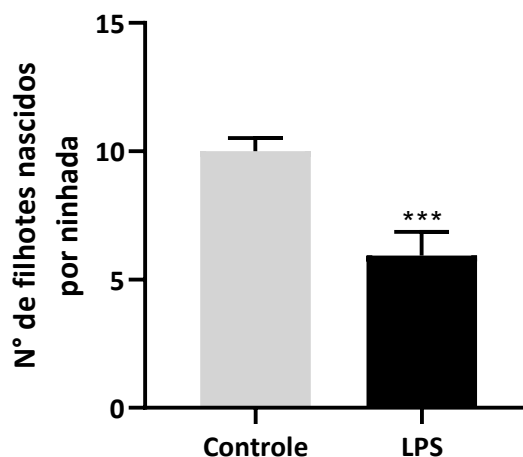
Fonte: da autora

Nota: Valores representados como porcentagem e como média ± erro padrão da média.

Das fêmeas gestantes injetadas com solução salina intraperitoneal ou LPS, foi possível observar um aumento notável na perda de ninhadas do grupo LPS, que foi de 54% respeito do 11% do grupo controle.

No gráfico 2 mostra-se o número médio de filhotes nascidos por ninhada. A injeção intraperitoneal de LPS durante o DG16 diminuiu o número de filhotes nascidos vivos respeito do grupo controle ( $p < 0,0005$ ).

Gráfico 2 – Efeitos da administração intraperitoneal de LPS ou salina 0,9% no número de filhotes nascidos vivos por ninhada.

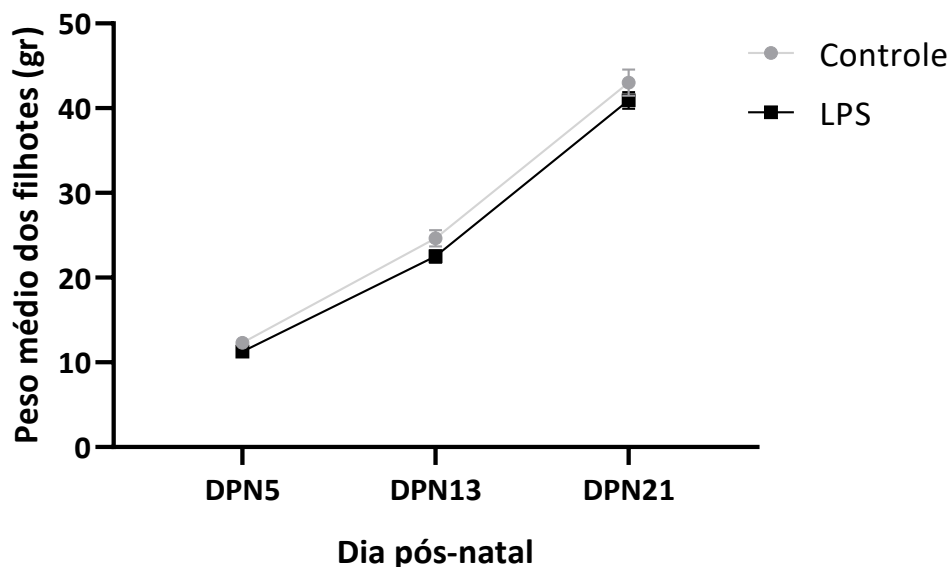


Fonte: da autora

Legenda: n=15-17 ninhadas por grupo. Os símbolos representam o nível de significância: \*\*\* $p < 0,0005$  comparado com o grupo controle no teste *t de student*. Valores representados como média ± erro padrão da média.

O gráfico 3 mostra o peso médio dos filhotes do grupo controle e LPS nos dias pós-natal 5, 13, até o desmame (DPN21). A administração de LPS não alterou o peso dos animais nascidos respeito do grupo controle.

Gráfico 3 – Efeitos da administração intraperitoneal de LPS ou salina 0,9% no peso médio dos filhotes nascidos vivos por ninhada.



Fonte: da autora

Legenda: n=5-6 ninhadas por grupo. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

A seguir apresentam-se os resultados dos testes comportamentais realizados na prole durante a idade adolescente.

## 4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS NA PROLE ADOLESCENTE

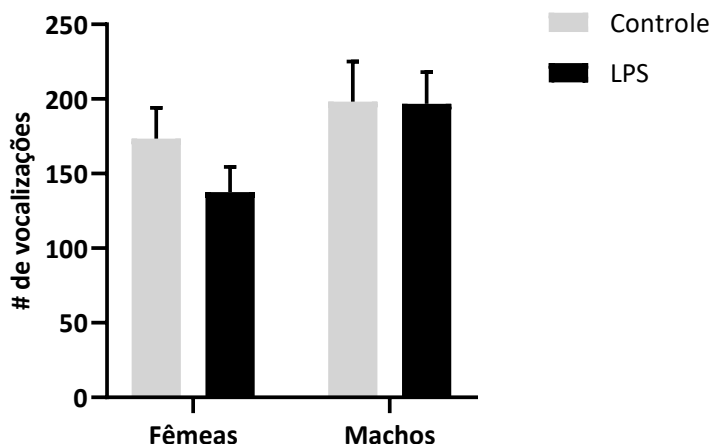
### 4.2.1 Vocalizações ultrassônicas induzidas por isolamento

No gráfico 4 mostra-se o número de VUS emitidas na prole das ratas tratadas com LPS ou salina durante o DG16.

Não foram encontradas diferenças entre o grupo controle e LPS nos animais machos nem nas fêmeas durante o DPN13. No teste ANOVA de duas vias, a administração materna de LPS no período pré-natal não provocou diferenças no número de vocalizações dos filhotes ( $p > 0,05$ ), nem houve diferenças entre os dois sexos ( $p = 0,06$ ), da mesma forma que não houve interação entre os fatores ( $p > 0,05$ ).



Gráfico 4 – Efeitos da administração de LPS i.p. pré-natal nas vocalizações ultrassônicas induzidas por isolamento na prole no DPN13.



Fonte: da autora

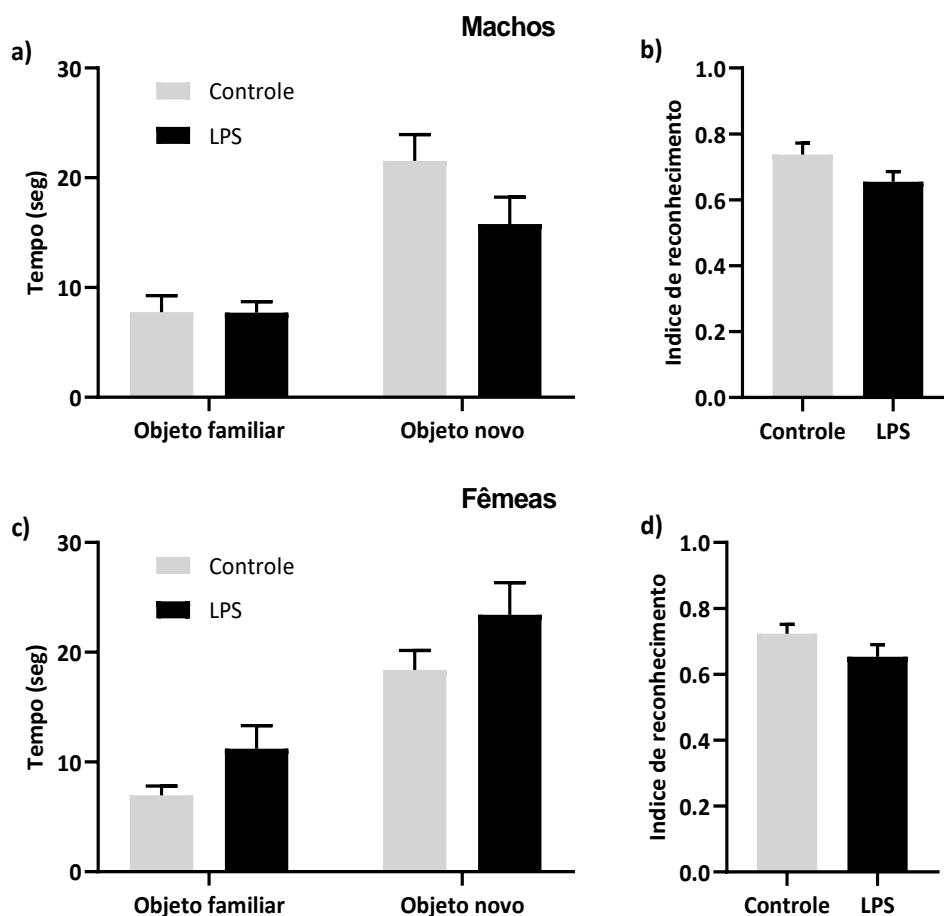
Legenda: n=14-16 animais por grupo. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

#### 4.2.2 Teste de reconhecimento de objetos

A continuação, mostram-se os resultados do teste de reconhecimento de objetos de 2 horas (gráfico 5) e de 24 horas (gráfico 6).

A administração i.p. de LPS no período pré-natal não alterou nenhum dos parâmetros avaliados, os quais foram o tempo de exploração do objeto familiar, do objeto novo, nem o índice de reconhecimento de objetos nos filhotes macho ( $p > 0,05$ ; gráfico 5, a e b) assim como nos filhotes fêmea ( $p > 0,05$ ; gráfico 5, c e d) no teste de reconhecimento de objetos de 2 horas.

Gráfico 5 – Teste de reconhecimento de objetos de 2 horas na prole de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação.

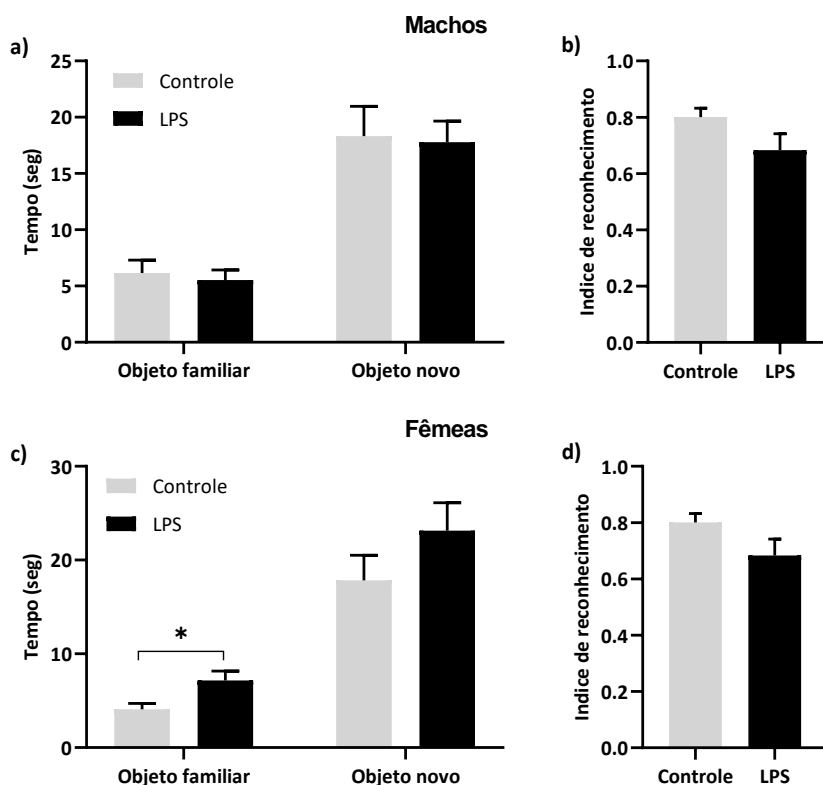


Fonte: da autora

Legenda: n=14 animais por grupo. **a)** tempo de exploração do objeto familiar e o objeto novo em segundos dos filhotes macho; **b)** Índice de reconhecimento de objetos nos filhotes macho; **c)** tempo de exploração do objeto familiar e o objeto novo em segundos dos filhotes fêmea; **d)** Índice de reconhecimento de objetos nos filhotes fêmea. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

No teste de reconhecimento de objetos de 24 horas, com relação aos filhotes machos não houve diferenças em nenhum dos parâmetros analisados ( $p > 0,05$ ; gráfico 6, a e b). A respeito dos filhotes fêmea, os animais do grupo LPS exploraram por mais tempo o objeto familiar ( $p < 0,05$ ; gráfico 6, c), entretanto, não houve diferenças no tempo de exploração do objeto novo, nem no índice de reconhecimento de objetos ( $p > 0,05$ ; gráfico 6, b e c) entre os grupos analisados.

Gráfico 6 – Teste de reconhecimento de objetos de 24 horas na prole de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação.



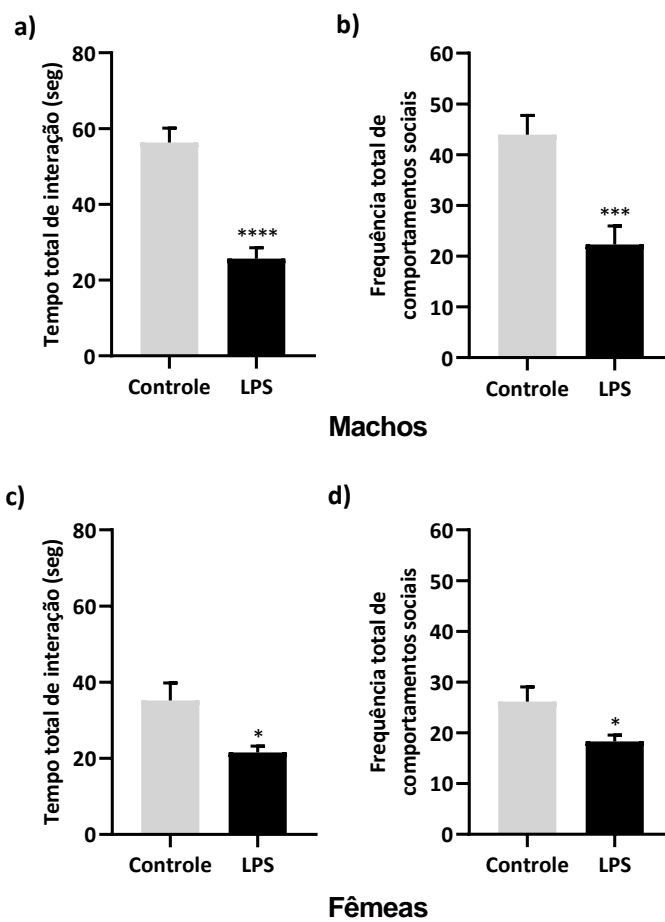
Fonte: da autora

Legenda: n=14 animais por grupo. **a)** tempo de exploração do objeto familiar e o objeto novo em segundos dos filhotes macho; **b)** Índice de reconhecimento de objetos nos filhotes macho; **c)** tempo de exploração do objeto familiar e o objeto novo em segundos dos filhotes fêmea; **d)** Índice de reconhecimento de objetos nos filhotes fêmea. Os símbolos representam o nível de significância: \* $p < 0,05$  comparado com o grupo controle no teste *t de student*. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

#### 4.2.3 Comportamento de brincar

Para analisar o comportamento de brincar na prole, foram avaliados o tempo total de interação e a frequência total de comportamentos sociais (gráfico 7). Pode se observar que a administração i.p de LPS durante a gestação alterou o tempo de interação total tanto nos machos quanto nas fêmeas ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,05$ ; gráfico 7, a e c respectivamente), e a frequência de comportamentos sociais dos machos e das fêmeas ( $p < 0,0005$  e  $p < 0,05$ ; gráfico 7, b e d respectivamente) quando comparados com o grupo controle.

Gráfico 7 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação na prole no teste de comportamento de brincar.



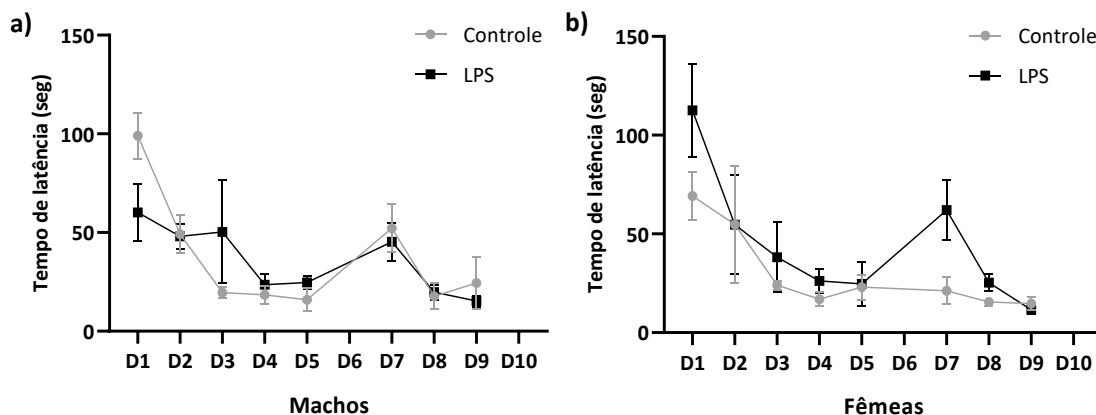
Fonte: da autora

Legenda: n=14 animais por grupo. **a)** tempo total de interação social em segundos dos filhotes macho; **b)** frequência total de comportamentos sociais dos filhotes macho; **c)** tempo total de interação social em segundos dos filhotes fêmea; **d)** frequência total de comportamentos sociais dos filhotes fêmea. Os símbolos representam o nível de significância: \*\*\*\*p<0,0001, \*\*\*p<0,0005, \*p<0,05 comparado com o grupo controle no teste *t de student*. Valores representados como média ± erro padrão da média.

#### 4.2.4 Labirinto de Barnes

O gráfico 8 mostra o tempo de latência para alcançar o buraco alvo dos filhotes machos (gráfico 8, A) e fêmea (gráfico 8, B) durante a etapa de aquisição (dias 1 até 5 e 7 até 9). A administração i.p. de LPS durante a gestação não alterou o tempo de latência para alcançar o buraco alvo dos filhotes adolescentes comparados com o grupo controle (gráfico 8, A e B).

Gráfico 8 – Tempo de latência para alcançar o buraco alvo durante a etapa de aquisição no labirinto de Barnes na prole adolescente de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação.



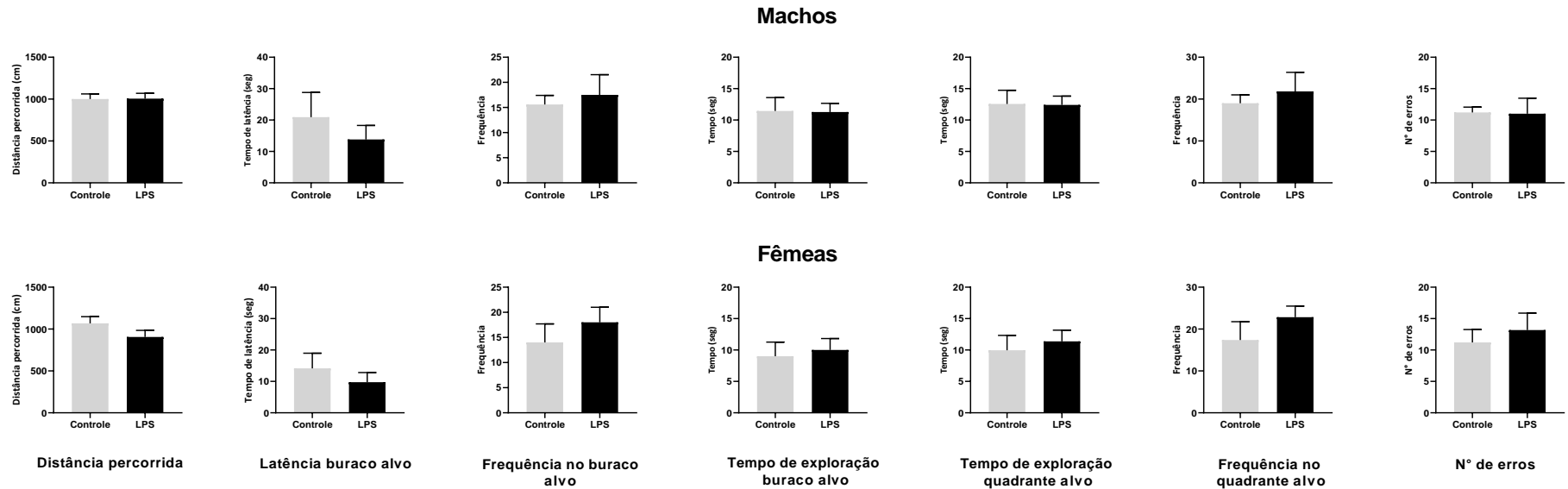
Fonte: da autora

Legenda: n=5-6 animais por grupo. Tempo de latência em segundos para chegar no orifício com a caixa dos filhotes macho (a) e fêmea (b) durante a aquisição no labirinto de Barnes. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

O teste de memória e aprendizagem reversa foram realizados no dia 6 e no dia 10 respectivamente. Foram avaliados a distância percorrida no campo durante o teste, o tempo de latência para chegar ao buraco alvo, a frequência e o tempo de exploração total do buraco alvo. Também foi quantificado o tempo e a frequência que os animais ficaram no quadrante alvo, assim como o número de erros. Durante o teste do dia 10 foram avaliados os mesmos parâmetros para o buraco oposto.

A seguir, nos gráficos 9, 10 e 11 mostram-se os parâmetros avaliados durante os dias do teste (dia 6 e dia 10 respectivamente).

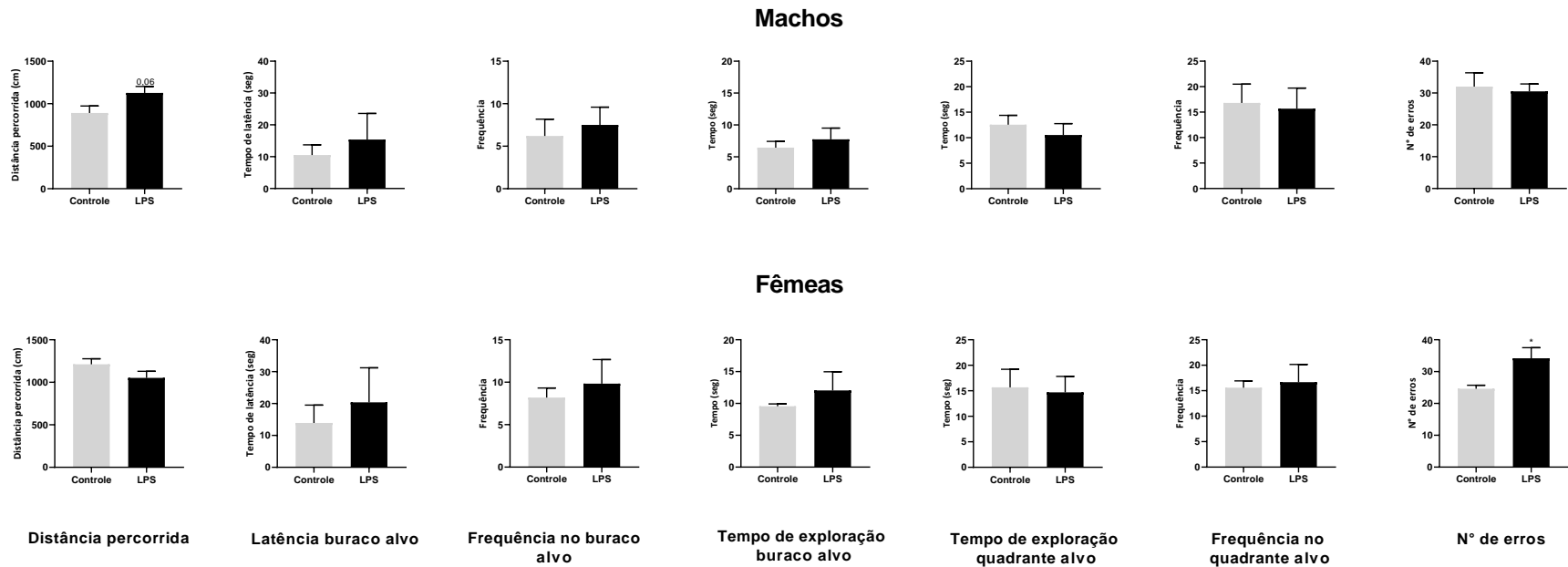
Gráfico 9 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação no desempenho da prole no labirinto de Barnes durante o teste do dia 6.



Fonte: da autora

Legenda: n=5-6 animais por grupo. Parâmetros avaliados no labirinto de Barnes durante o teste no dia 6 nos machos (superior) e fêmeas (inferior). De esquerda à direita: Distância percorrida no labirinto; tempo de latência até o buraco alvo; frequência no buraco alvo; tempo de exploração total do buraco alvo; tempo de exploração do quadrante alvo; frequência no quadrante alvo e número de erros. Valores representados como média ± erro padrão da média.

Gráfico 10 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação no desempenho da prole no labirinto de Barnes durante o teste do dia 10.



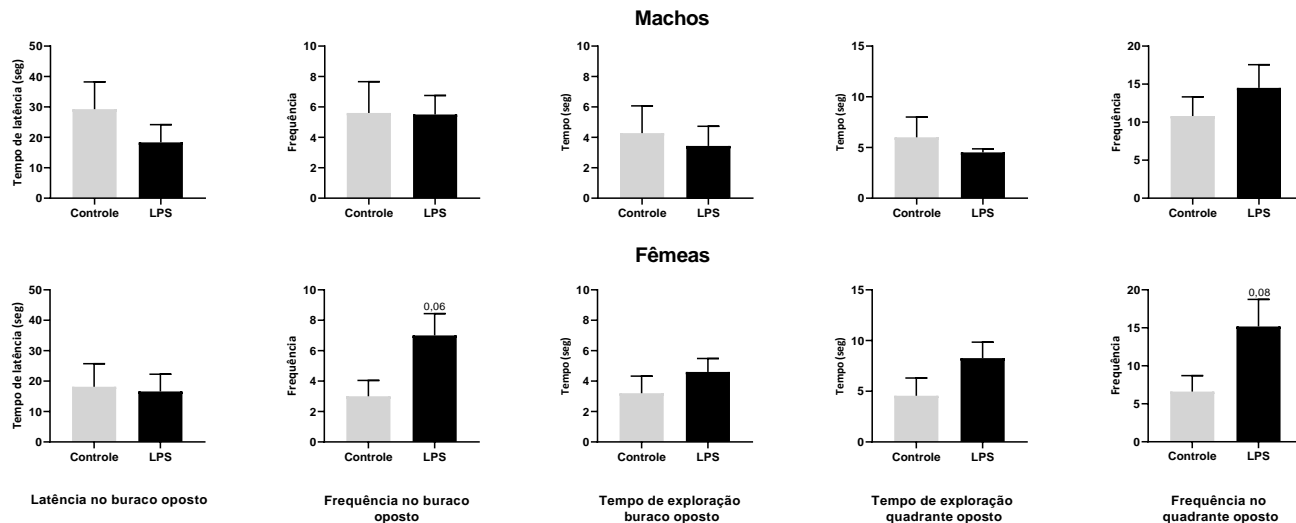
Fonte: da autora

Legenda: n=5-6 animais por grupo. Parâmetros avaliados no labirinto de Barnes durante o teste no dia 10 nos machos (superior) e fêmeas (inferior). De esquerda à direita: Distância percorrida no labirinto; tempo de latência até o buraco alvo; frequência no buraco alvo; tempo de exploração total do buraco alvo; tempo de exploração do quadrante alvo; frequência no quadrante alvo e número de erros. Os símbolos representam o nível de significância: \* $p < 0,05$  comparado com o grupo controle no teste *t de student*. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

Durante os testes do labirinto de Barnes (dia 6 e dia 10) não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados nos machos. Já no teste do dia 10 as fêmeas do grupo LPS tiveram maior número de erros respeito do grupo controle ( $p < 0,05$ , gráfico 10).

O gráfico 11 é uma continuação dos parâmetros avaliados durante o teste do dia 10, relativos ao buraco e quadrante oposto, onde não foram encontradas diferenças estatísticas nos animais machos e fêmeas do grupo LPS em nenhum dos parâmetros.

Gráfico 11 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação no desempenho da prole no labirinto de Barnes durante o teste do dia 10 no quadrante oposto.



Fonte: da autora

Legenda: n=5-6 animais por grupo. Parâmetros do buraco e do quadrante oposto avaliados no labirinto de Barnes durante o teste no dia 10 nos machos (superior) e fêmeas (inferior). De esquerda à direita: tempo de latência até o buraco oposto; frequência no buraco oposto; tempo de exploração total do buraco oposto; tempo de exploração do quadrante oposto; e frequência no quadrante oposto. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

A continuação apresenta-se os testes comportamentais realizados na prole durante a idade adulta.

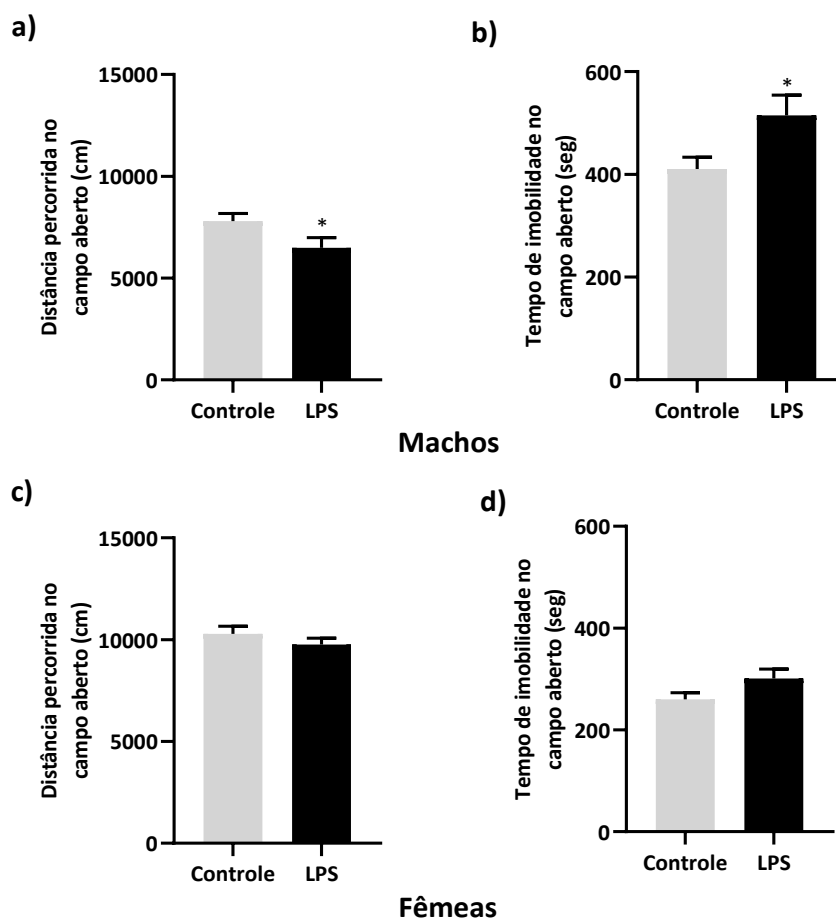
### 4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS NA PROLE ADULTA

#### 4.3.1 Campo aberto



No teste de campo aberto foi avaliada a locomoção dos animais através dos parâmetros distância percorrida e tempo de imobilidade. No gráfico 12 mostram-se os resultados do teste na prole adulta.

Gráfico 12– Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação na prole adulta na atividade locomotora no campo aberto.



Fonte: da autora

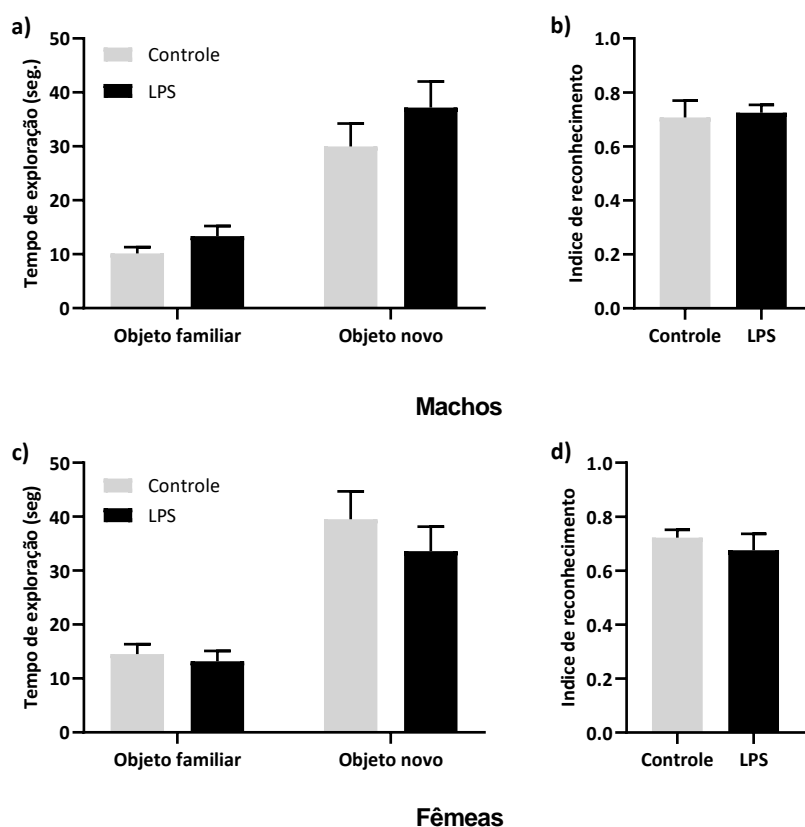
Legenda: n=13 animais por grupo. **a e c)** distância percorrida no campo aberto em centímetros dos machos e das fêmeas respectivamente; **b e d)** tempo de imobilidade em segundos das fêmeas e machos respectivamente. Os símbolos representam o nível de significância: \*p<0,05 comparado com o grupo controle no teste *t de student*. Valores representados como média ± erro padrão da média.

Nos animais do grupo LPS encontrou-se diminuição na distância percorrida e aumento no tempo de imobilidade nos machos adultos, mas não nas fêmeas (p<0,05; gráfico 12 a e b, respectivamente).

### 4.3.2 Reconhecimento de objetos

A seguir, mostram-se os resultados do teste de reconhecimento de objetos de 2 horas (gráfico 13) e de 24 horas (gráfico 14).

Gráfico 13 – Teste de reconhecimento de objetos de 2 horas na prole adulta de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação.

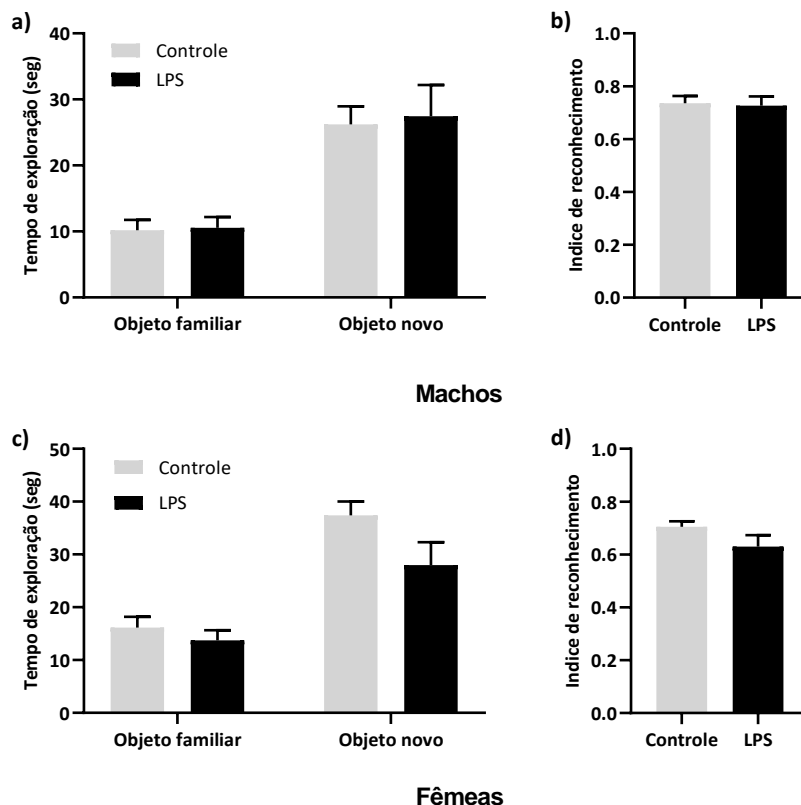


Fonte: da autora

Legenda: n=13 animais por grupo. **a)** tempo de exploração do objeto familiar e o objeto novo em segundos da prole macho; **b)** Índice de reconhecimento de objetos na prole macho; **c)** tempo de exploração do objeto familiar e o objeto novo em segundos da prole fêmea; **d)** Índice de reconhecimento de objetos da prole fêmea. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

Pode-se observar no gráfico 13 que não houve diferenças na exploração dos objetos nem no índice de reconhecimento de objetos de duas horas nos animais adultos ( $p > 0,05$ , gráfico 13).

Gráfico 14 – Teste de reconhecimento de objetos de 24 horas na prole adulta de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação.



Fonte: da autora

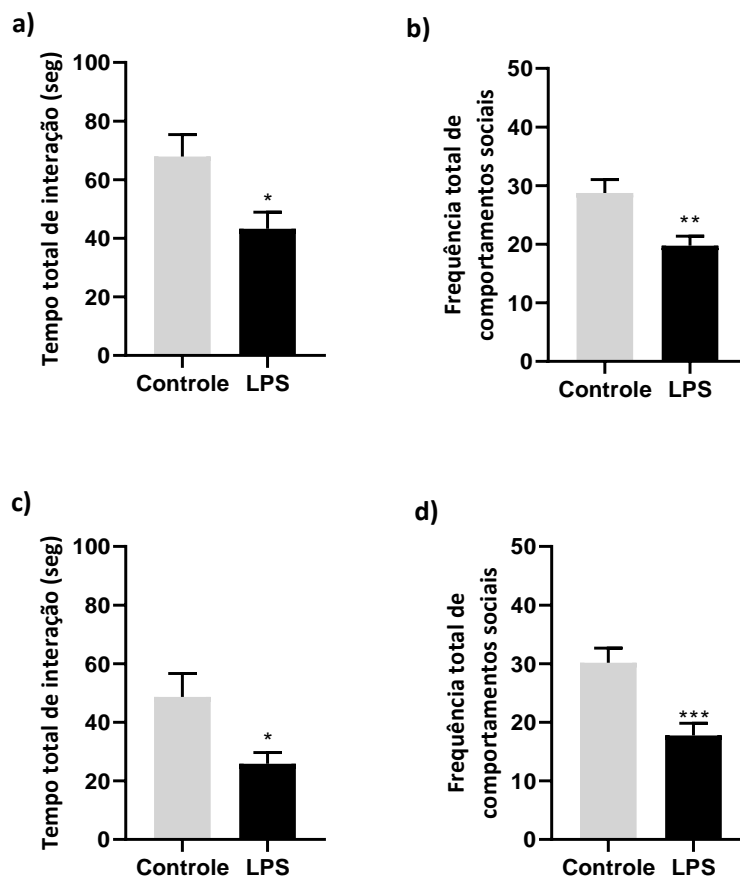
Legenda: n=13 animais por grupo. **a)** tempo de exploração do objeto familiar e o objeto novo em segundos da prole macho; **b)** Índice de reconhecimento de objetos na prole macho; **c)** tempo de exploração do objeto familiar e o objeto novo em segundos da prole fêmea; **d)** Índice de reconhecimento de objetos da prole fêmea. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

No teste de reconhecimento de objetos de 24 horas também não foram encontradas diferenças em nenhum dos grupos analisados no tempo de exploração do objeto familiar ou novo, nem no índice de reconhecimento de objetos (gráfico 14).

#### 4.3.3 Interação social

No gráfico 15 se mostram os resultados no teste de interação social na prole adulta dos grupos controle e LPS.

Gráfico 15 – Teste de interação social na prole adulta de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação.



Fonte: da autora

Legenda: n=12 animais por grupo. **a e c)** tempo total de interação em segundos dos machos e fêmeas respectivamente; **b e d)** frequência total de comportamentos sociais dos machos e das fêmeas respectivamente. Os símbolos representam o nível de significância: \*p<0,05, \*\*p<0,005, \*\*\*p<0,0005 comparado com o grupo controle no teste *t de student*. Valores representados como média ± erro padrão da média.

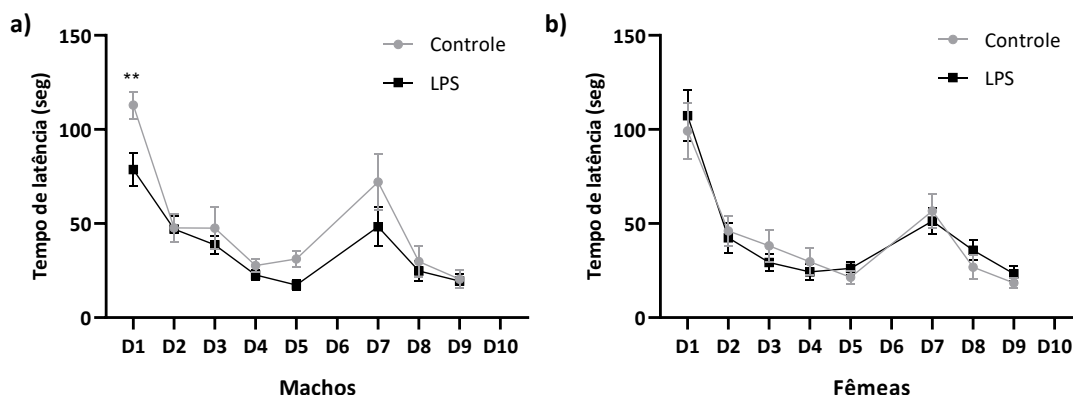
Encontrou-se que assim como nos animais durante a adolescência, no grupo LPS houve diminuição no tempo de interação ( $p<0,05$ , gráfico 15, a e c) e na frequência de comportamentos sociais tanto dos machos quanto das fêmeas (machos:  $p<0,0005$ , gráfico 15, b; fêmeas:  $p<0,005$ , gráfico 15, d) comparados com o grupo controle.

#### 4.3.4 Labirinto de Barnes

O tempo de latência para alcançar o buraco alvo durante a etapa de aquisição do labirinto de Barnes na prole adulta se encontra no gráfico 16. Foi possível observar que os machos do grupo LPS alcançaram mais rapidamente o orifício alvo no primeiro dia (gráfico 16, A), no entanto, não houve diferenças no desempenho dos animais durante a aquisição em comparação com o grupo controle. No teste de ANOVA de duas vias foram encontradas diferenças no fator tratamento ( $p < 0,005$ ) e no fator dia ( $p < 0,0001$ ), mas não houve interação entre os fatores.

Na aquisição do labirinto de Barnes das fêmeas (gráfico 16, b) também não foram encontradas diferenças no tempo de latência para chegar no orifício alvo entre os grupos avaliados em nenhum dos dias.

Gráfico 16 – Labirinto de Barnes nas fêmeas adultas, prole de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação.

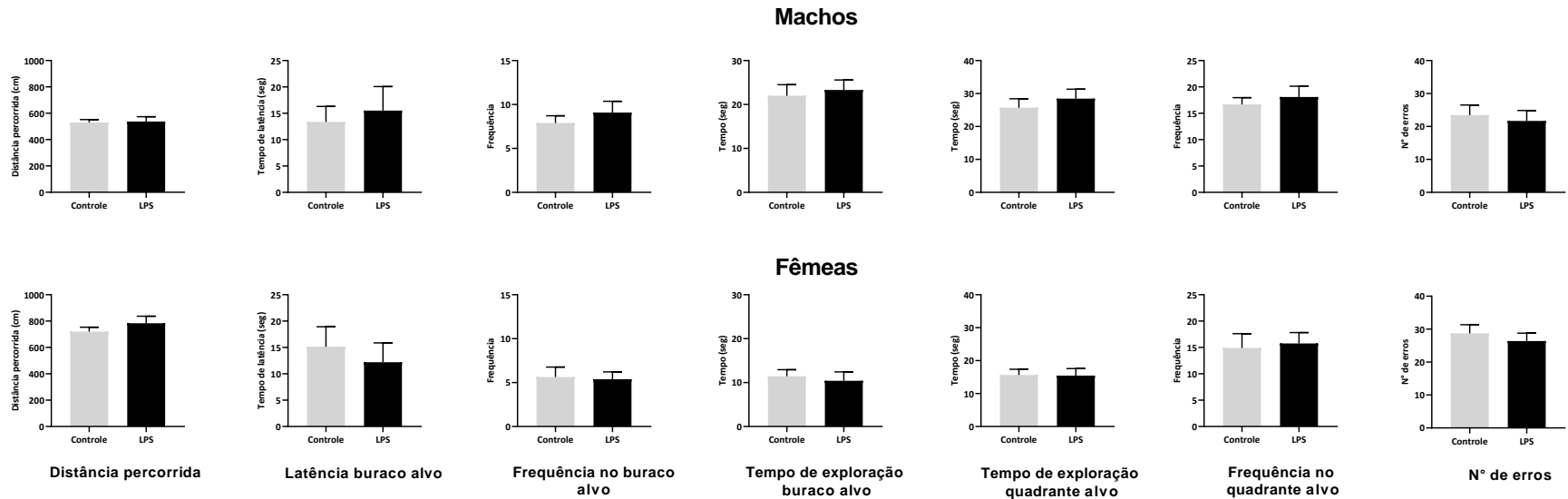


Fonte: da autora

Legenda: n=9-12 animais por grupo. Tempo de latência em segundos para chegar no orifício com a caixa da prole adulta: machos (a) e fêmeas (b) durante a aquisição no labirinto de Barnes. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

Durante os dias do teste (D6 e D10) foram avaliados os mesmos parâmetros que foram avaliados na prole durante a adolescência. Não foram encontradas diferenças no desempenho dos animais do grupo LPS comparados com o grupo controle em nenhum dos parâmetros avaliados nos dias de teste ( $p > 0,05$ ; gráficos 17, 18 e 19).

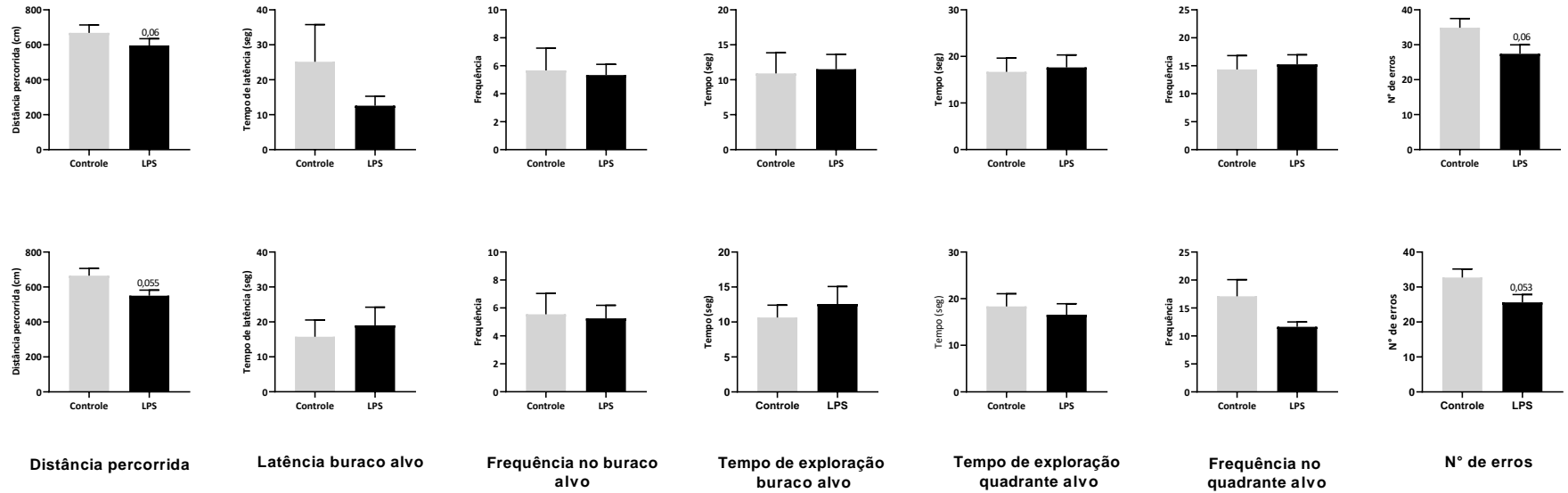
Gráfico 17 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação no desempenho da prole adulta no labirinto de Barnes durante o teste do dia 6.



Fonte: da autora

Legenda: n=9-12 animais por grupo. Parâmetros avaliados no labirinto de Barnes durante o teste no dia 6 nos animais adultos: machos (superior) e fêmeas (inferior). De esquerda à direita: Distância percorrida no labirinto; tempo de latência até o buraco alvo; frequência no buraco alvo; tempo de exploração total do buraco alvo; tempo de exploração do quadrante alvo; frequência no quadrante alvo e número de erros. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

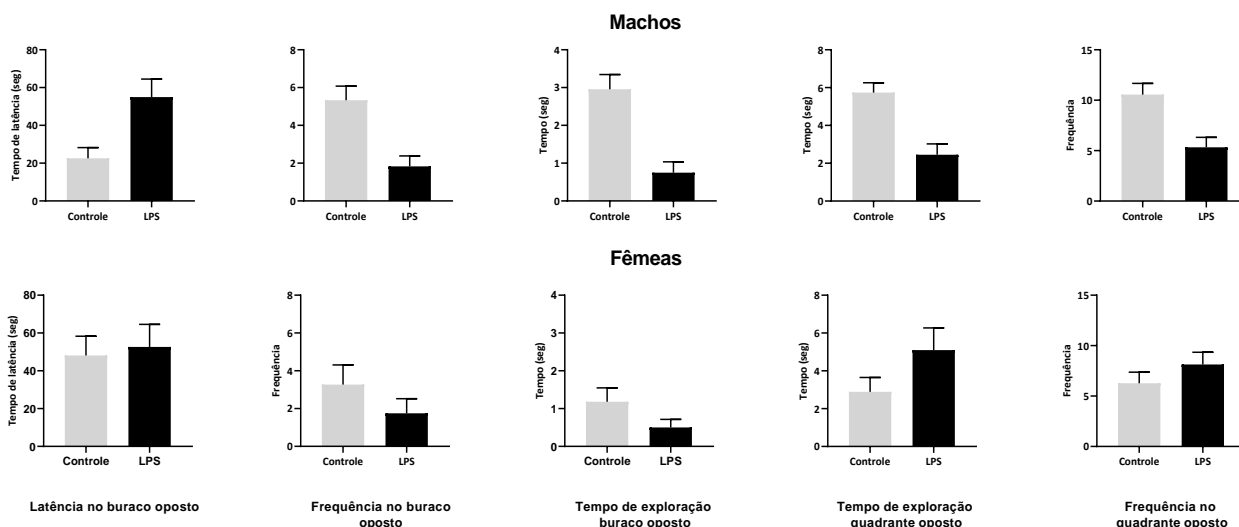
Gráfico 18 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação no desempenho da prole adulta no labirinto de Barnes durante o teste do dia 10.



Fonte: da autora

Legenda: n=9-12 animais por grupo. Parâmetros avaliados no labirinto de Barnes durante o teste no dia 10 nos animais adultos: machos (superior) e fêmeas (inferior). De esquerda à direita: Distância percorrida no labirinto; tempo de latência até o buraco alvo; frequência no buraco alvo; tempo de exploração total do buraco alvo; tempo de exploração do quadrante alvo; frequência no quadrante alvo e número de erros. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

Gráfico 19 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação no desempenho da prole adulta no labirinto de Barnes durante o teste do dia 10 no quadrante oposto.



Fonte: da autora

Legenda: n=9-12 animais por grupo. Parâmetros avaliados no labirinto de Barnes durante o teste no dia 10 nos animais adultos: machos (superior) e fêmeas (inferior). De esquerda à direita: tempo de latência até o buraco oposto; frequência no buraco oposto; tempo de exploração total do buraco oposto; tempo de exploração do quadrante oposto; e frequência no quadrante oposto. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

Após os testes comportamentais foram realizados os ensaios moleculares das estruturas coletadas e os resultados são apresentados a continuação.

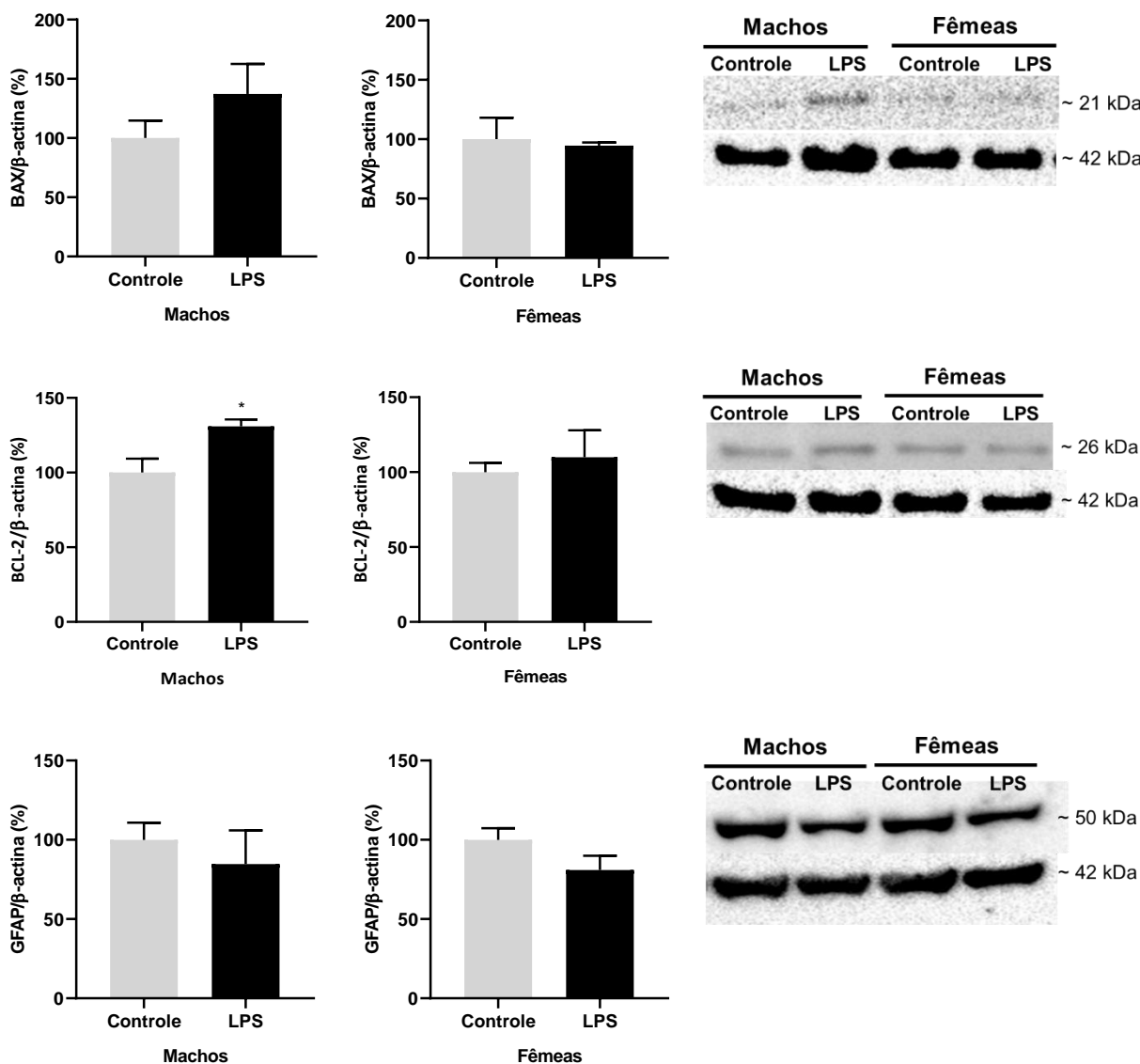
## 4.4 WESTERN BLOT

### 4.4.1 Prole adolescente

A seguir, mostram-se os resultados da quantificação das proteínas BAX, BCL-2, BDNF, DCX, GFAP, GR, OTR, PSD95 e sinaptofisina no córtex pré-frontal da prole adolescente pela técnica de *western blotting* (Apêndice C). As proteínas BAX, BCL-2 e PSD95 apresentam-se como resultados parciais.



Gráfico 20 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação na expressão das proteínas BAX, BCL-2 e GFAP, no córtex pré-frontal da prole adolescente.



Fonte: da autora

Legenda: n=6 amostras por grupo. As proteínas foram quantificadas em relação à proteína β-actina. BAX e BCL-2 apresentam-se como resultados parciais (n=3). Os símbolos representam o nível de significância: \*p<0,05 comparado com o grupo controle no teste *t de student*. Valores representados como média ± erro padrão da média.

No gráfico 20 se mostram as proteínas pró e anti-apoptóticas BAX e BCL-2, respectivamente; assim como do marcador de astrócitos, GFAP. Foi encontrado aumento da proteína anti-apoptótica BCL-2 nos machos (p<0,05), no entanto, o número de

amostras ainda é pequeno (n=3). Não foram encontradas diferenças nas proteínas BAX e GFAP em nenhum dos grupos.

O gráfico 21 mostra as proteínas envolvidas com o neurodesenvolvimento e a plasticidade sináptica BDNF, DCX, PSD95 e sinaptofisina. Nos filhotes macho do grupo LPS foi encontrada diminuição na expressão de sinaptofisina no córtex pré-frontal ( $p < 0,05$ ).

Gráfico 21 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação na expressão das proteínas BDNF, DCX, PSD95, e sinaptofisina no córtex pré-frontal da prole adolescente.

(continua)

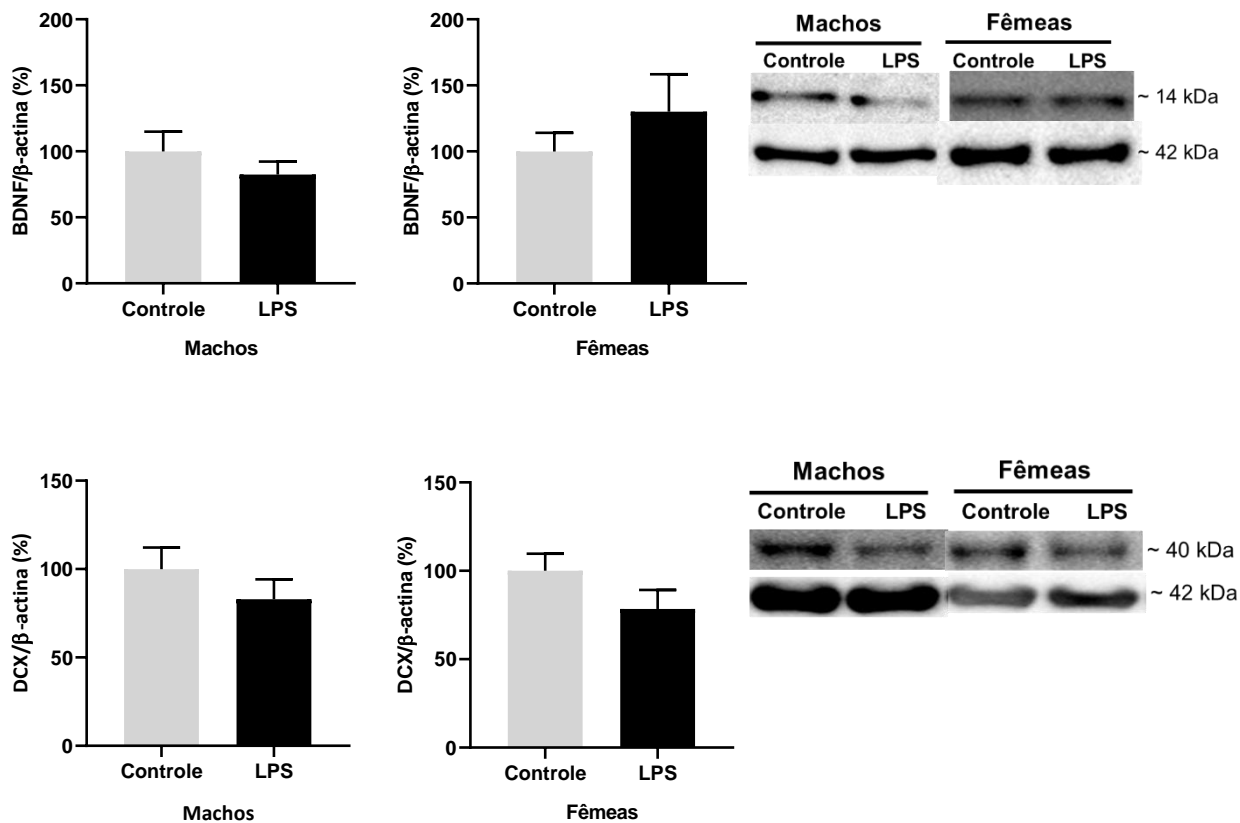
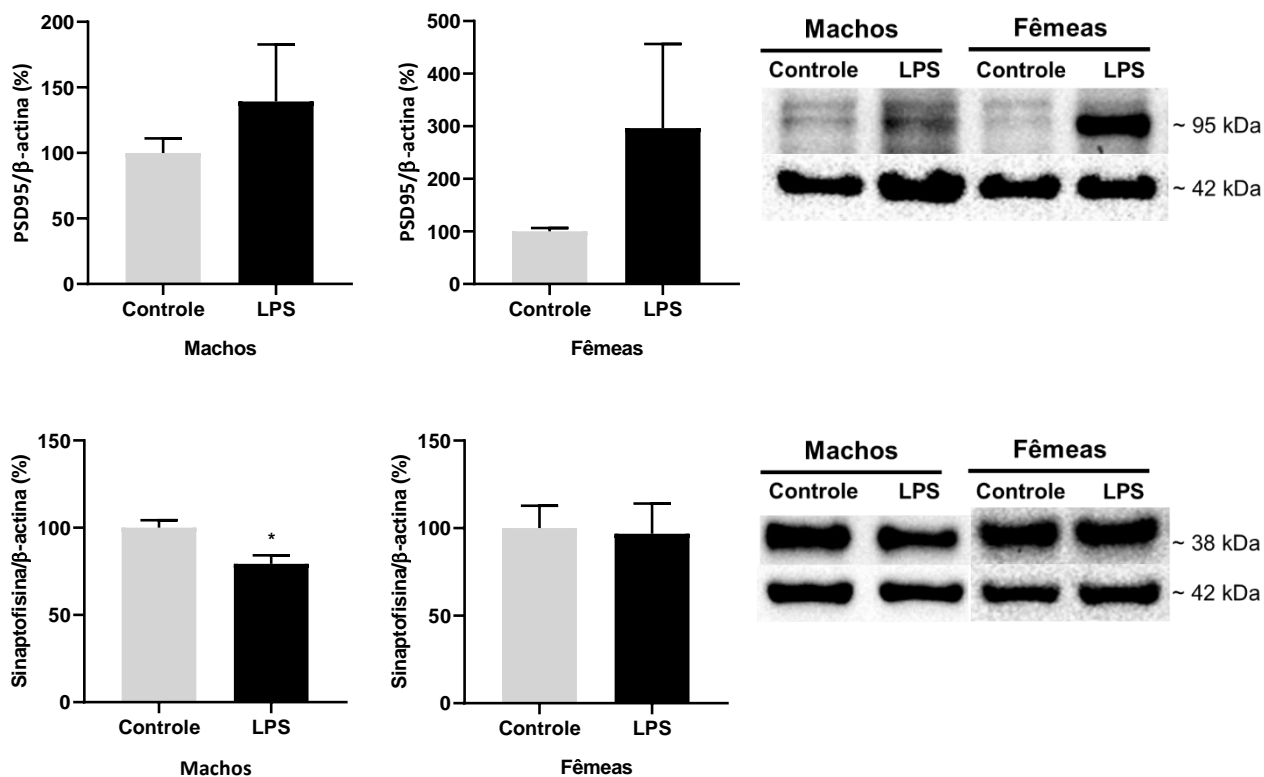


Gráfico 21 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação na expressão das proteínas BDNF, DCX, PSD95, e sinaptofisina no córtex pré-frontal da prole adolescente.

(conclusão)

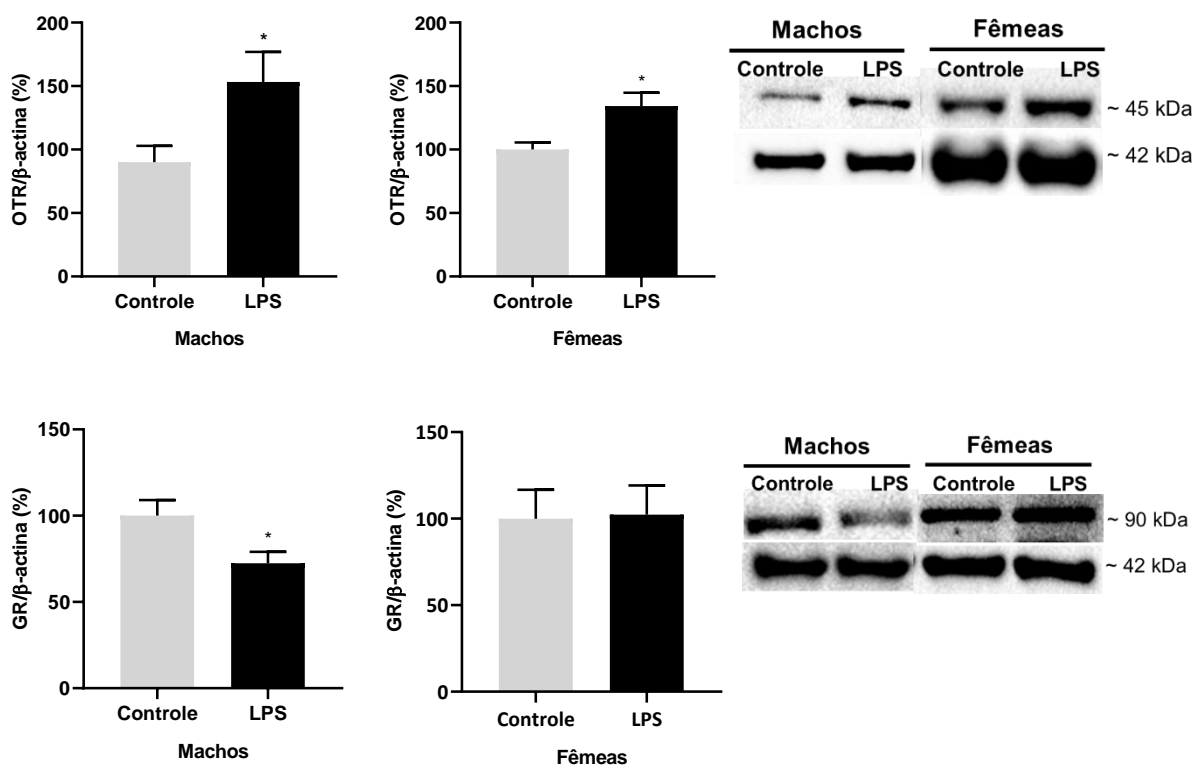


Fonte: da autora

Legenda: n=5-7 amostras por grupo. As proteínas foram quantificadas em relação à proteína β-actina. PSD95 apresenta-se como resultado parcial (n=3). Os símbolos representam o nível de significância: \*p<0,05 comparado com o grupo controle no teste *t de student*. Valores representados como média ± erro padrão da média.

Da mesma forma, encontrou-se diminuição na expressão do GR exclusivamente nos machos adolescentes do grupo LPS ( $p < 0,05$ , gráfico 22), assim como foram encontradas diferenças na expressão do OTR no córtex pré-frontal tanto dos machos quanto das fêmeas do grupo LPS ( $p < 0,05$ ).

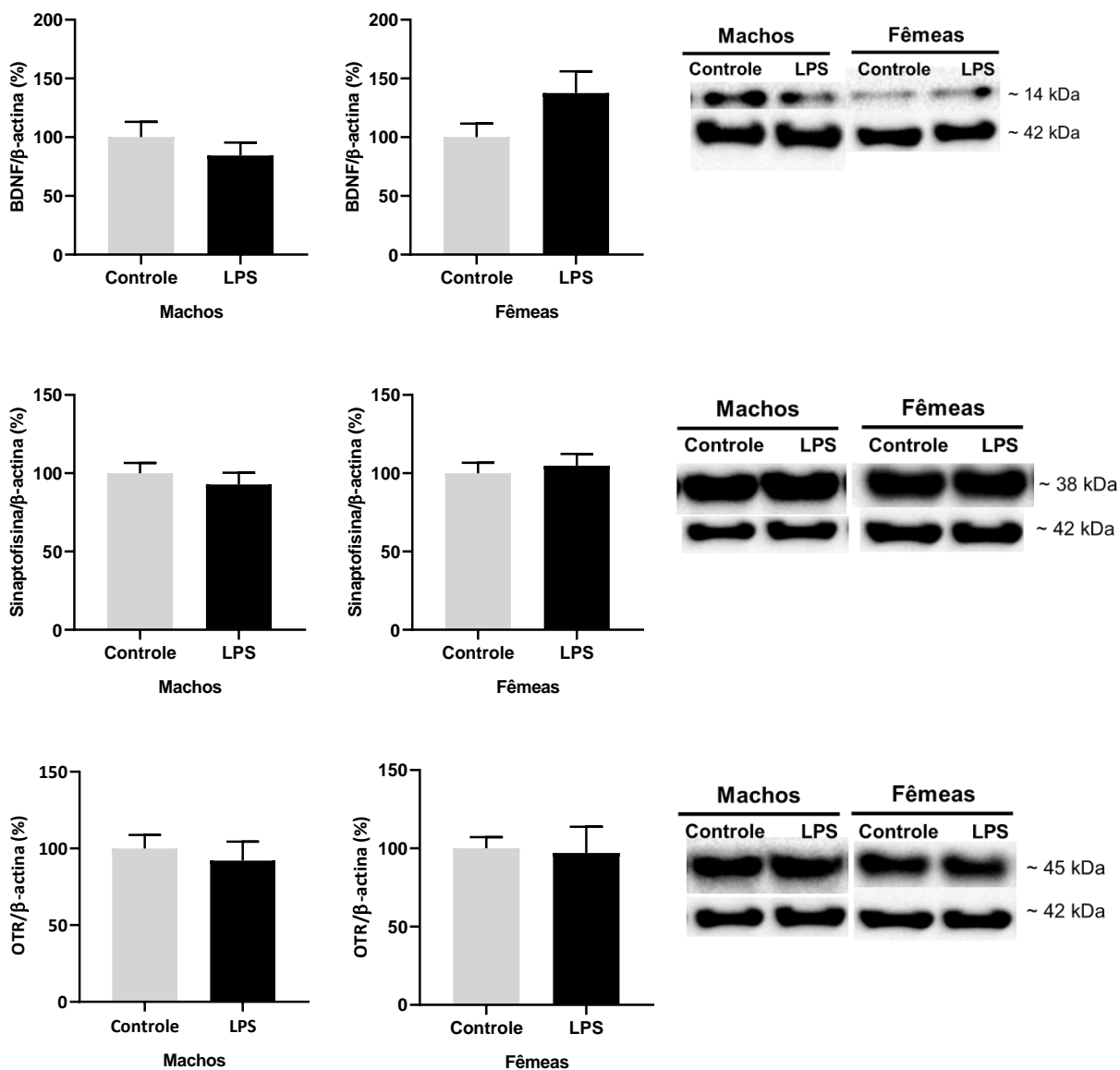
Gráfico 22 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação na expressão do OTR e GR no córtex pré-frontal da prole adolescente.



#### 4.4.2 Prole adulta

No gráfico 23 se mostram os resultados da quantificação das proteínas BDNF, OTR e sinaptofisina no córtex pré-frontal da prole adulta (Apêndice C).

Gráfico 23 – Efeitos da administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação na expressão de BDNF, sinaptofisina e OTR no córtex pré-frontal da prole adulta.



Fonte: da autora

Legenda: n=7 amostras por grupo. As proteínas foram quantificadas em relação à proteína β-actina. Valores representados como média ± erro padrão da média.

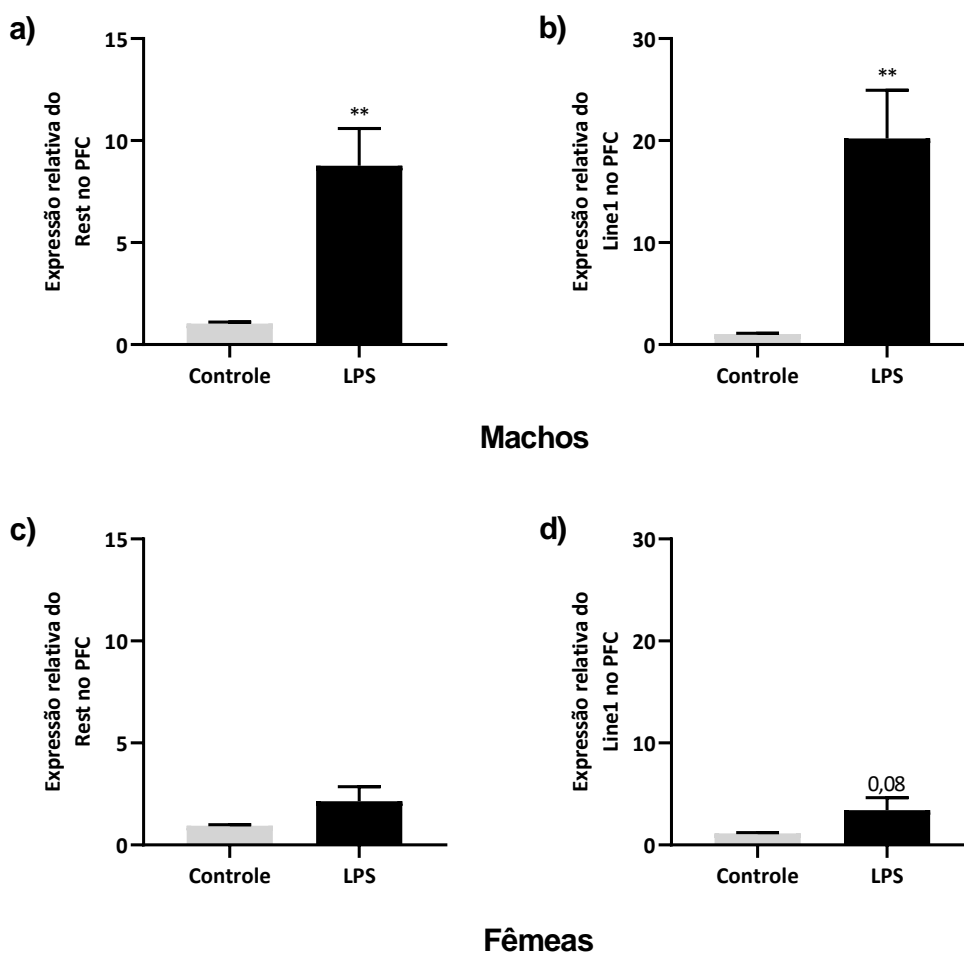
Na prole adulta não foram encontradas alterações significativas na expressão das proteínas avaliadas em nenhum dos grupos.

A continuação se apresenta os resultados dos testes de epigenética realizados através da técnica de qPCR no córtex pré-frontal da prole adolescente.

#### 4.5 qPCR

A quantificação da expressão gênica foi realizada no córtex pré-frontal da prole adolescente. Foi quantificada a expressão e o padrão de metilação de Rest e Line1 (gráfico 24 e 25, respectivamente), DNMT1, 3A e 3B (gráfico 26), e TET1, 2 e 3 (gráfico 27).

Gráfico 24 – Expressão gênica de Rest e Line1 no córtex pré-frontal da prole adolescente de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação.



Fonte: da autora

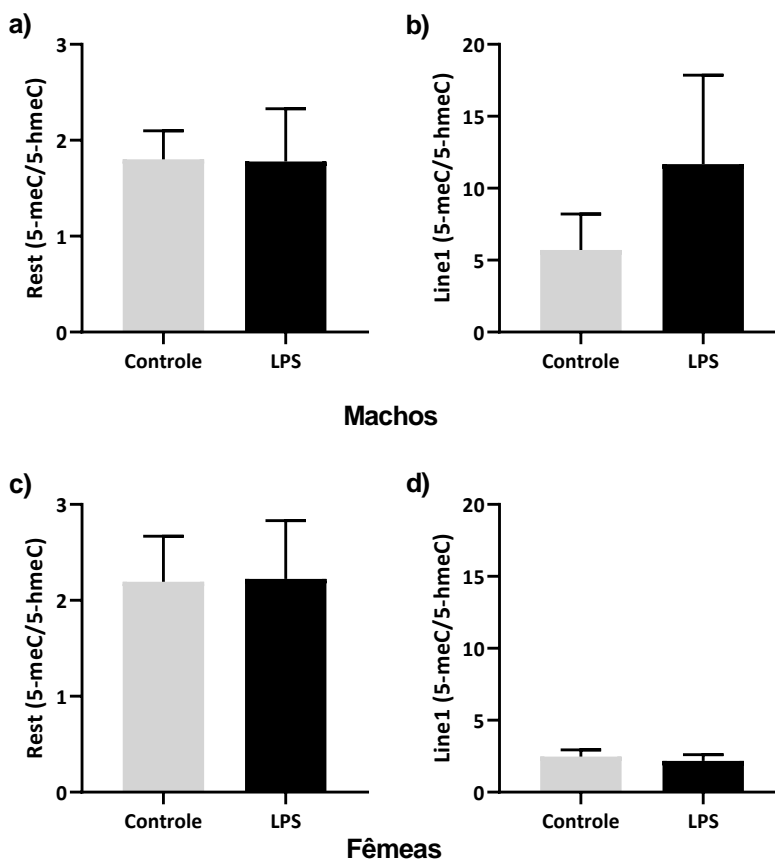
Legenda: n=6 animais por grupo. **a e c)** Expressão gênica de Rest no córtex pré-frontal dos machos e fêmeas adolescentes, respectivamente. **b e d)** Expressão gênica de Line1 no córtex pré-frontal dos machos e fêmeas adolescentes, respectivamente. Os símbolos

representam o nível de significância:  $**p < 0,005$  comparado com o grupo controle no teste *t de student*. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

Conforme se mostra no gráfico 24, é possível observar que a expressão tanto de Rest quanto de Line1 esteve aumentada no córtex pré-frontal dos filhotes machos do grupo LPS ( $p < 0,005$ , gráfico 24, a e b), mas não houve diferenças nas fêmeas ( $p > 0,05$ , gráfico 20, c e d).

Posteriormente foi avaliado o padrão de metilação de Rest e Line1; os resultados foram expressos como a razão 5meC/5hmeC. Como se mostra no gráfico 25, não foram encontradas diferenças no padrão de metilação dos fatores Rest e Line1 na prole ( $p > 0,05$ ).

Gráfico 25 – Avaliação da metilação de Rest e Line1 no córtex pré-frontal da prole adolescente de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação.



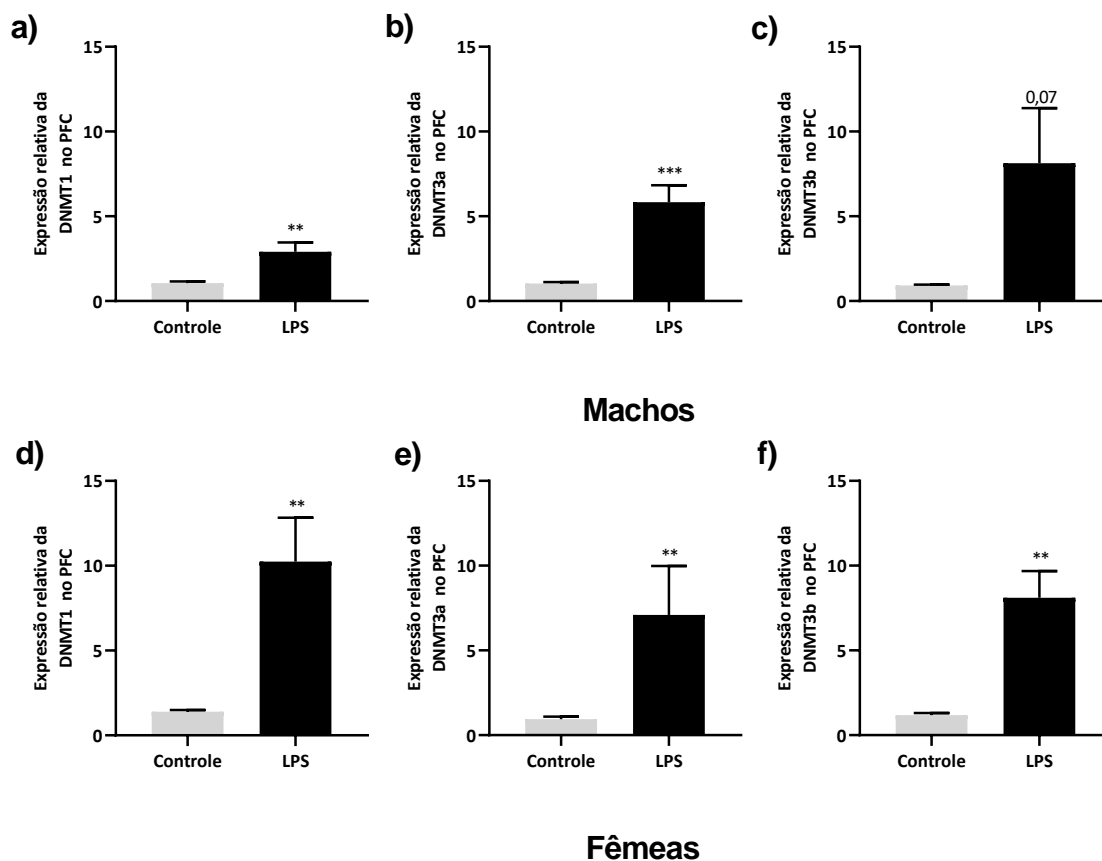
Fonte: da autora

Legenda: n=6 animais por grupo. **a e c)** Metilação de Rest no córtex pré-frontal dos machos e fêmeas adolescentes, respectivamente. **b e d)** Metilação de Line1 no córtex pré-frontal

dos machos e fêmeas adolescentes, respectivamente. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

No gráfico 26 se mostra a expressão das enzimas DNMT nos filhotes durante a adolescência. Encontrou-se aumento da DNMT1, e 3a nos filhotes macho do grupo LPS ( $p < 0,005$  e  $p < 0,0005$ , gráfico 26, a e b, respectivamente), bem como aumento da DNMT1, 3a e 3b nos filhotes fêmea ( $p < 0,005$ , gráfico 26, d, e e f).

Gráfico 26 – Expressão gênica de DNMT1, DNMT3a, e DNMT3b no córtex pré-frontal da prole adolescente de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação.



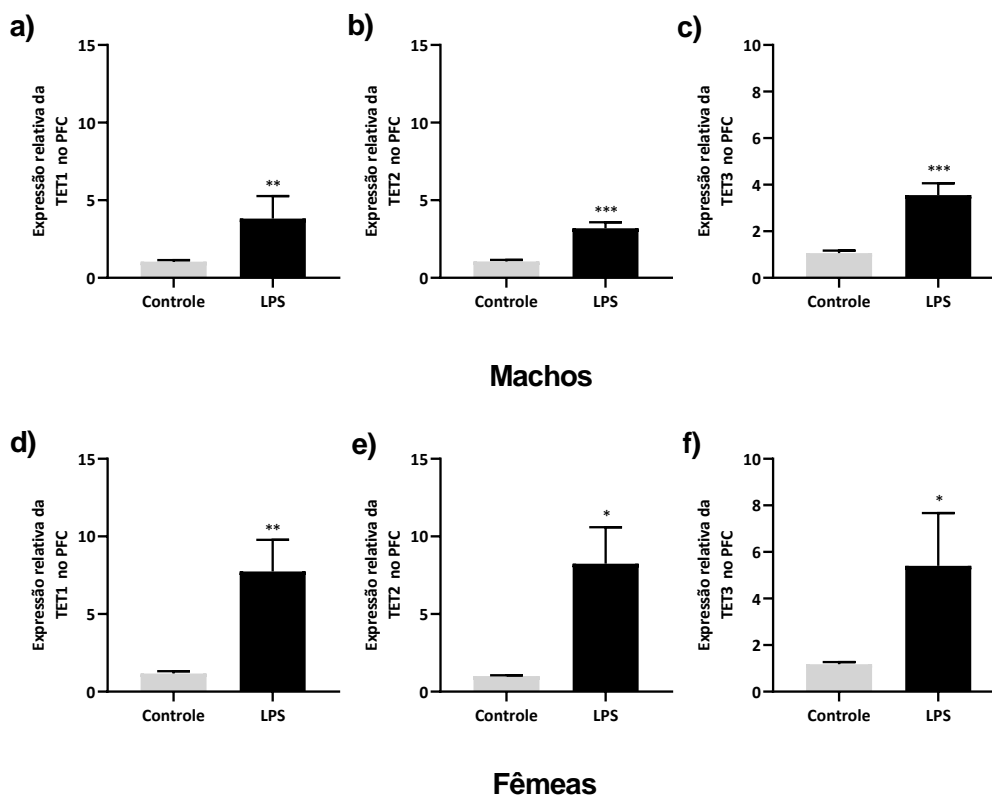
Fonte: da autora

Legenda: n=6 animais por grupo. **a e d)** Expressão gênica de DNMT1 no córtex pré-frontal dos machos e fêmeas adolescentes. **b e e)** Expressão gênica de DNMT3a no córtex pré-frontal dos machos e fêmeas adolescentes. **c e f)** Expressão gênica de DNMT3b no córtex pré-frontal dos machos e fêmeas adolescentes. Os símbolos representam o nível de significância: \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$  comparado com o grupo controle no teste *t de student*. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.



A respeito da expressão das enzimas TET, encontrou-se aumento da TET1, 2 e 3 tanto nos machos quanto nas fêmeas do grupo LPS (gráfico 27).

Gráfico 27 – Expressão gênica de TET1, TET2 e TET3 no córtex pré-frontal da prole adolescente de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação.



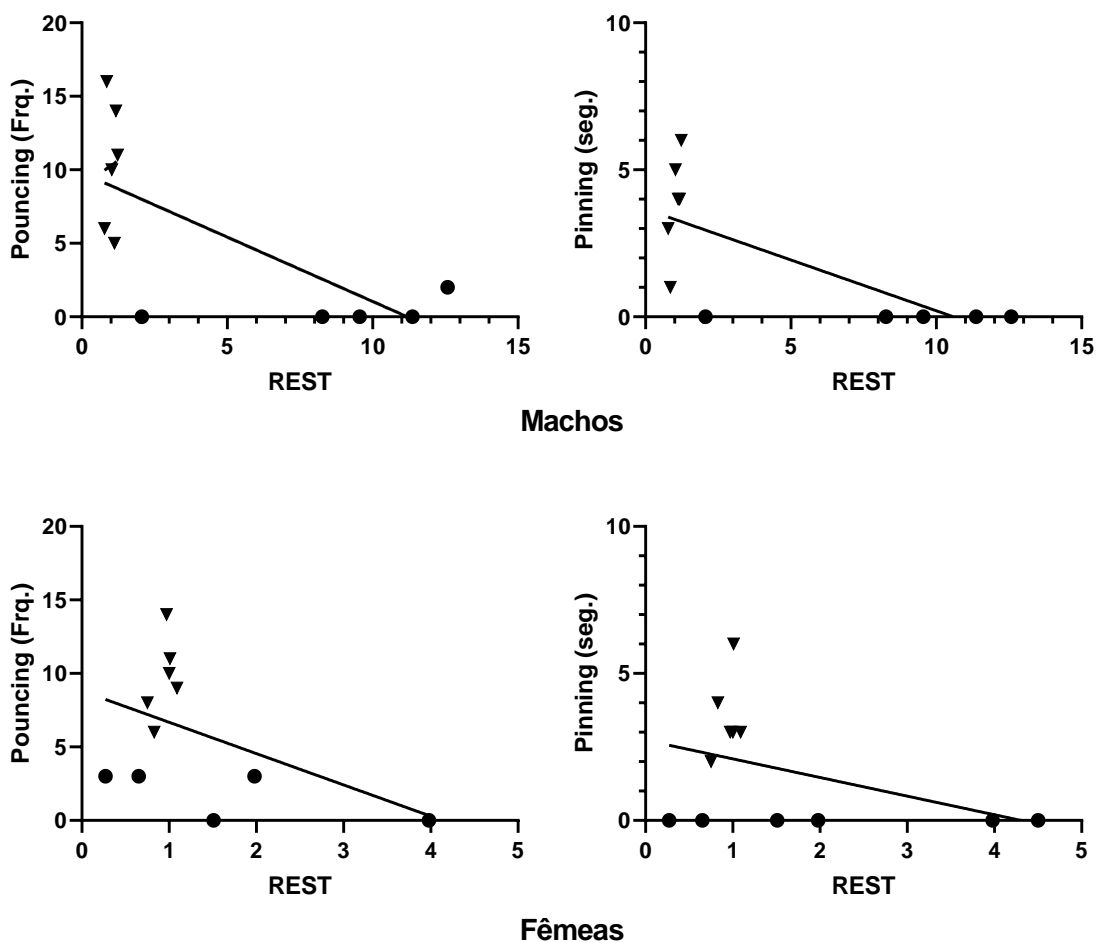
Fonte: da autora

Nota: n=6 animais por grupo. **a ed)** Expressão gênica de TET1 no córtex pré-frontal dos machos e fêmeas adolescentes. **b ee)** Expressão gênica de TET2 no córtex pré-frontal dos machos e fêmeas adolescentes. **ce f)** Expressão gênica de TET3 no córtex pré-frontal dos machos e fêmeas adolescentes. Os símbolos representam o nível de significância: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$  comparado com o grupo controle no teste *t de student*. Valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

## 4.6 CORRELAÇÃO

Os resultados obtidos através da técnica de qPCR para a expressão de Rest, e Line1 foram correlacionados com os comportamentos de solicitar e aceitar a brincadeira (*pouncing* e *pinning*, respectivamente) durante o teste de comportamento de brincar. A análise comportamental e a expressão de Rest e Line1 correspondem ao mesmo animal.

Gráfico 28 – Relação da expressão de Rest e os comportamentos de *pouncing* e *pinning* durante o teste de comportamento de brincar na prole adolescente de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação.



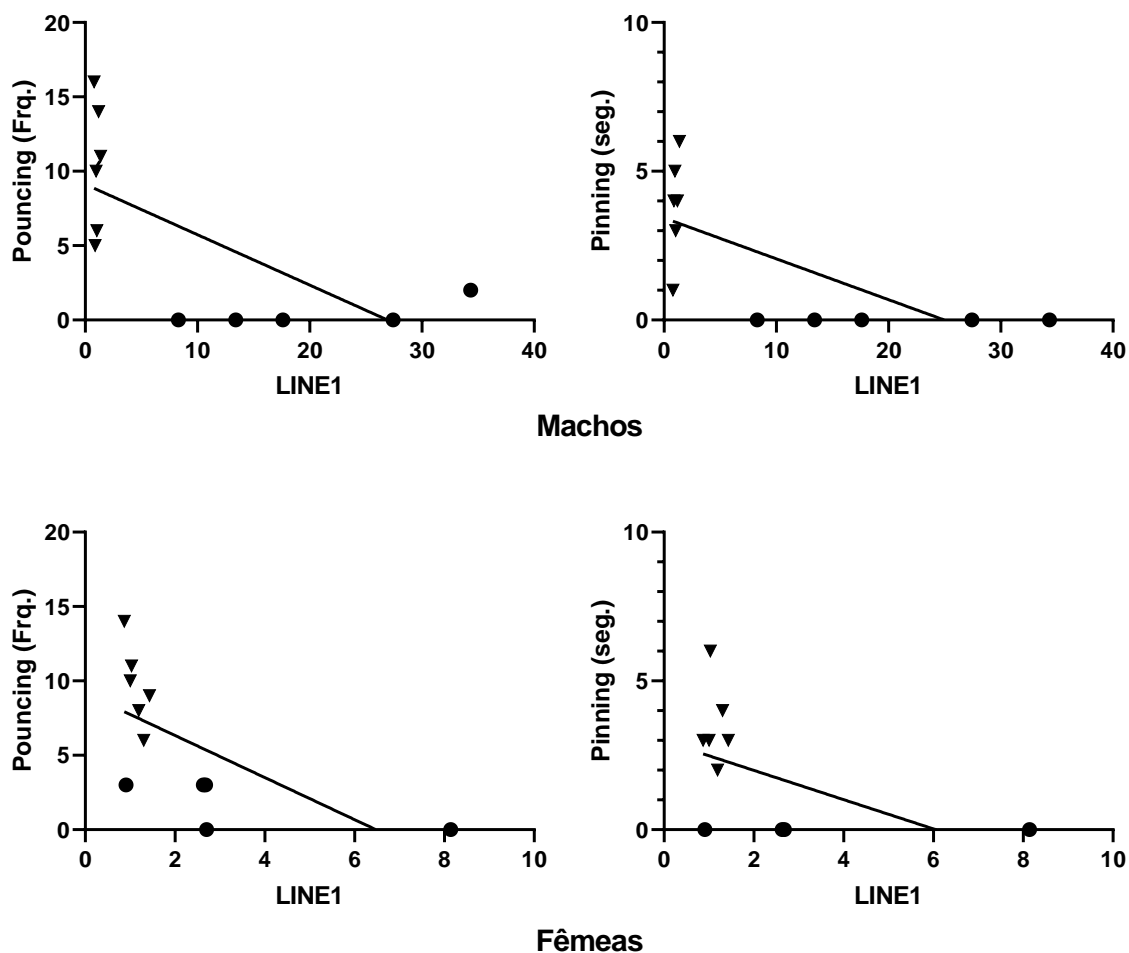
	Machos		Fêmeas	
	r	p	r	p
Pouncing	- 0.695	0.01	- 0.458	0.157
Pinning	- 0.710	0.01	- 0.412	0.183

Fonte: da autora

Nota: n=6 animais por grupo. Os triângulos invertidos representam o comportamento de solicitar (frequência) ou aceitar (tempo em segundos) a brincadeira e os círculos representam a expressão de Rest para o respectivo animal. A tabela resume os resultados do teste de correlação de Pearson.

No gráfico 28 é possível observar uma relação inversa entre as variáveis analisadas, sendo que os animais que mais apresentaram comportamentos sociais, apresentaram menor expressão do Rest no PFC.

Gráfico 29 – Relação da expressão de Line1 e os comportamentos de *pouncing* e *pinning* durante o teste de comportamento de brincar na prole adolescente de ratas submetidas a administração i.p. de LPS ou salina durante a gestação.



	Machos		Fêmeas	
	r	p	r	p
Pouncing	- 0.674	0.02	- 0.641	0.03
Pinning	- 0.706	0.01	- 0.501	0.11

Fonte: da autora

Nota: n=6 animais por grupo. Os triângulos invertidos representam o comportamento de solicitar (frequência) ou aceitar (tempo em segundos) a brincadeira e os círculos representam a expressão de Line1 para o respectivo animal. A tabela resume os resultados do teste de correlação de Pearson.

Da mesma forma, a expressão de Line1 no PFC teve uma relação inversa e negativa em relação com o comportamento de solicitar e aceitar a brincadeira (gráfico 29).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 COMPORTAMENTO DOENTIO NAS FÊMEAS GESTANTES

O denominado comportamento doentio é um complexo induzido por infecções, inflamação, dano tecidual ou trauma imunológico. De acordo a Dantzer e colaboradores (2008), a administração sistêmica de LPS induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, as quais tem um papel importante nas manifestações comportamentais do estado doentio. No campo comportamental, é caracterizado por letargia, ansiedade, anorexia ou apetite reduzido, atividade motora diminuída e hipertermia, o que eventualmente poderia levar a comportamento do tipo depressivo (DANTZER *et al.*, 2008; KIRSTEN *et al.*, 2010; TAKSANDE *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos mostraram que 2 horas após a administração i.p. de LPS, a atividade locomotora das fêmeas no campo aberto diminuiu em comparação com o grupo controle. Além disso, encontrou-se uma diminuição significativa no consumo alimentar desses animais, assim como perda de peso durante as seguintes 24 horas após a administração de LPS em consequência com as manifestações comportamentais do estado doentio reportados em estudos prévios (BECSKEI *et al.*, 2008; TAKSANDE *et al.*, 2015).

Diversos estudos mostraram que, uma vez há ativação da resposta imune induzida por LPS se produz a ativação do receptor TLR4, a qual é crucial para desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6) tanto nas fêmeas gestantes quanto no cérebro dos filhotes (XIAO *et al.*, 2021). Além da produção de citocinas, a administração de LPS gera inflamação, febre, ativação da cascata do complemento, ativação do eixo HPA e comportamento doentio, modulando também o consumo alimentar e os padrões de sono mediados pela ação das prostaglandinas (BOKSA, 2010; DANTZER *et al.*, 2008; KNUESEL *et al.*, 2014; SCHEDLOWSKI *et al.*, 2014).

A respeito da diminuição do número de ninhadas, assim como do número de filhotes por ninhada decorrentes da AIM induzida com LPS, Xiao e colaboradores (2021) propõem que a ativação do TLR4 poderia estar envolvida também nessas alterações durante o período perinatal. Nos diversos modelos de AIM também tem sido reportadas

alterações nas ninhadas; incluindo reabsorções, abortos, e filhotes ou ninhadas menores (FRENCH; CHESTER; DEMAS, 2013; WOODS *et al.*, 2021; XIAO *et al.*, 2021). A administração de LPS de forma subcutânea ou intraperitoneal, em doses elevadas ou baixas durante a gestação demonstrou diminuir o tamanho das ninhadas, sendo atribuído a morte perinatal e a consequente reabsorção uterina, assim como partos prematuros e morte neonatal (CHLODZINSKA *et al.*, 2011; PUJOL *et al.*, 2015).

## 5.2 COMPORTAMENTO NA PROLE

Os testes comportamentais desse trabalho foram realizados com o objetivo de caracterizar alterações compatíveis com distúrbios do neurodesenvolvimento, principalmente no âmbito da comunicação, o comportamento social, a memória (espacial e de reconhecimento de objetos), assim como a atividade exploratória durante a adolescência e a vida adulta da prole de fêmeas tratadas com LPS durante o DG16.

Os padrões de comunicação em modelos animais têm sido estudados em diversos contextos; e alterações nos padrões de vocalização têm sido reportados em modelos animais de distúrbios do neurodesenvolvimento (SCATTONI; CRAWLEY; RICCI, 2009).

Neste trabalho foram avaliadas o número de vocalizações e encontrou-se que não houve diferenças entre os grupos independentemente do tratamento pré-natal. Resultados prévios do nosso laboratório demonstraram diminuição no número de vocalizações unicamente nos filhotes machos prole de fêmeas tratadas com LPS no DG16 (VITOR-VIEIRA *et al.*, 2021), no entanto, o teste foi realizado durante o DPN5, o que sugere que a idade dos filhotes poderia ter influenciado o número de VUS, pois ao redor do DPN13 inicia a abertura dos olhos nos filhotes e mudam os padrões de vocalização.

Em outros modelos de AIM induzidos por Poly(I:C) e ácido valproico (VPA) também foi encontrada diminuição significativa do número de VUS a partir da segunda semana de vida, quando a temperatura não influencia a emissão de USVs, sugerindo alterações na resposta ao estresse nos filhotes, assim como alterações na resposta emocional frente a um ambiente novo. Além disso os autores sugerem que a diminuição

no número de USVs poderia estar relacionada com alterações na atividade sináptica e a excitação neural no período pós-natal (CEZAR *et al.*, 2018; MALKOVA *et al.*, 2012).

Em outro estudo Kirsten e colaboradores (2015) administraram LPS i.p. durante o DG9,5 e não acharam diferenças entre os grupos a respeito do número de vocalizações, no entanto, em uma análise mais detalhada das vocalizações, foram encontradas diferenças na duração do período de silêncio nesses indivíduos, ou seja, os filhotes passaram períodos mais longos sem emitir vocalizações chamando a mãe, indicando que as alterações nos padrões de comunicação durante a infância podem ser influenciados por desafios imunes durante a gestação.

Considerando as diferenças sexuais nos padrões de comunicação de filhotes de roedores, Naito e Tonoue (1987) sugeriram que não é possível achar diferenças entre os sexos nas vocalizações só analisando o número delas, mas sim levando em consideração a frequência do som, a magnitude e a duração. No seu estudo, encontraram que os filhotes machos provenientes de ninhadas mistas têm maior potencial para ser mais ativos na emissão de vocalizações do que animais provenientes de ninhadas do mesmo sexo, sugerindo uma possível contribuição do cuidado materno na exibição de dimorfismo sexual nas vocalizações ultrassônicas induzidas por isolamento. Também, Lehman e colaboradores (1999) encontraram no seu estudo que os machos são mais sensíveis ao estresse, o que poderia reforçar os nossos dados, onde os machos aparentemente emitiram maior número de vocalizações respeito das fêmeas após o estresse de isolamento.

No que concerne aos testes de memória tanto de reconhecimento de objetos como a memória espacial e aprendizagem reversa, estudos prévios têm demonstrado que a administração de LPS no início da gestação (DG8), assim como outros modelos de AIM (p. ex. VPA e polyI:C) pode prejudicar a memória de reconhecimento de objetos na prole, demonstrando uma preferência anormal pela exploração do objeto familiar (COYLE *et al.*, 2009; FUJITA; ISHIMA; HASHIMOTO, 2016; GUERRIN *et al.*, 2022; HAN *et al.*, 2016; MYCHASIUK *et al.*, 2012), o que é compatível com a aversão à novidade em indivíduos autistas. No entanto, no nosso trabalho não foram encontradas alterações na memória de reconhecimento de objetos em comparação com o grupo controle.

Já respeito da memória espacial e aprendizagem reversa, no nosso trabalho não foram encontradas diferenças no desempenho dos animais durante a adolescência nem durante a vida adulta no labirinto de Barnes. Até o momento não foram encontradas referências associando os efeitos da ativação imune materna na aprendizagem espacial e memória.

Katayama e colaboradores (2016) em um modelo genético de autismo em camundongos avaliaram a aprendizagem e memória dos animais no labirinto de Barnes e no labirinto em "T". No labirinto de Barnes não encontraram diferenças no tempo de latência dos animais para chegar no buraco alvo no dia do teste, no número de erros, nem no tempo nos diferentes quadrantes durante a aquisição nem na fase de aprendizagem reversa. No labirinto em "T" encontraram uma redução na porcentagem de respostas corretas após a fase de aprendizagem reversa em comparação com o grupo controle, sugerindo também um aumento na persistência desses animais de acordo com o TEA em humanos e o comportamento do tipo autista em outros modelos animais.

Zhang e colaboradores (2017) em um modelo de sepse com ligadura e perfuração cecal (CLP) ou LPS i.p. em camundongos, encontraram que nos animais que passaram pelo processo de sepse o tempo de latência para chegar no orifício alvo era maior em comparação com o grupo controle, assim como tiveram um número de erros aumentado, demonstrando que a sepse foi capaz de comprometer a aprendizagem e memória dos camundongos.

O comportamento de brincar durante a infância em mamíferos desempenha um papel chave no desenvolvimento de habilidades cognitivas, sociais, motoras e emocionais; as quais são importantes ao longo de toda a vida do indivíduo (VANDERSCHUREN; ACHTERBERG; TREZZA, 2016). Alterações no comportamento social são característicos de alguns transtornos do neurodesenvolvimento, assim como de transtornos neuropsiquiátricos e seu estudo é extremamente relevante em modelos translacionais do TEA.

No teste de comportamento de brincar, encontrou-se que os animais expostos de forma pré-natal ao LPS tiveram menor frequência e tempo de interação independentemente do sexo dos animais. As evidências na literatura a respeito do



comportamento social das fêmeas após um desafio imunológico no período pré-natal são variáveis, indicando um possível dimorfismo sexual.

Em modelos de AIM induzidos com LPS foram encontradas diferenças nos parâmetros avaliados no comportamento de brincar principalmente nos machos do grupo LPS em comparação com o grupo controle (KIRSTEN *et al.*, 2010; TAYLOR *et al.*, 2012, VITOR-VIEIRA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2021), mas não exclusivamente na prole masculina (FOLEY *et al.*, 2014), reduzindo a frequência dos comportamentos juvenis de brincar.

Já na idade adulta, no teste de interação social foram encontradas diferenças no tempo total de comportamentos sociais, assim como na frequência deles. Os animais, tanto fêmeas quanto machos do grupo LPS apresentaram menor tempo e frequência de interação. Diversas pesquisas em modelos de AIM induzidos com LPS em camundongos e ratos também encontraram alterações no comportamento social dos animais durante a idade adulta (BRAUN *et al.*, 2019; KIRSTEN *et al.*, 2010), indicando que os prejuízos no comportamento social podem persistir ao longo da vida dos animais nesse modelo de AIM.

O teste comportamental realizado no campo aberto é utilizado para avaliar a atividade exploratória dos animais, assim como o comportamento do tipo ansioso. O teste de campo aberto na prole adulta demonstrou que os animais do grupo LPS tiveram atividade locomotora diminuída. De acordo com nosso trabalho, Harvey e Boksa (2014) em um modelo de AIM com LPS nos dias 15 e 16 da gestação, encontraram diminuição na atividade locomotora nos animais machos adultos (DPN60); bem como Van der Eynde e colaboradores (2014) em um modelo induzido por Poly I:C no DG15. Depino (2015), assim como Al-Amin e colaboradores (2016), também encontraram a atividade locomotora diminuída durante a vida adulta em modelos de ativação imune materna induzida por LPS, sugerindo déficits comportamentais ao longo da vida da prole, e uma possível relação com comportamento do tipo ansioso.

Meyer e colaboradores compararam os efeitos do dia de indução da ativação imune materna com PolyI:C (DG9 e DG17) no desempenho da prole no campo aberto e não encontraram diferenças quando a indução foi feita no DG17. Também, Guerrin e colaboradores (2022) no modelo de AIM com PolyI:C no DG15, não encontraram

alterações na locomoção dos animais no campo aberto em comparação com o grupo controle, no entanto, encontraram que a prole de AIM manifestou comportamento do tipo ansioso no mesmo teste.

Contudo, a administração do LPS na dose de 500 µg/kg durante o DG16 foi capaz de induzir o comportamento doentio e é possível sugerir que afetou a sobrevivência e o desenvolvimento dos filhotes antes do nascimento através da ativação do TLR4 e a produção de citocinas pró-inflamatórias tanto na mãe quanto no filhote, afetando também vias de sinalização na placenta e repercutindo no comportamento da prole ao longo da vida, especialmente o comportamento social.

### 5.3 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO NEURODESENVOLVIMENTO

Os resultados da quantificação de proteínas através da técnica de *Western blotting* mostraram um padrão variável de expressão do receptor de ocitocina no córtex pré-frontal entre os animais adolescentes e os animais adultos; mostrando um aumento da expressão durante a adolescência tanto das fêmeas quanto dos machos. Também se demonstrou um claro dimorfismo sexual, onde os machos adolescentes do grupo LPS apresentaram diminuição na expressão do receptor de glicocorticoide e sinaptofisina no córtex pré-frontal. Até o momento não foram encontradas diferenças na proteína de migração neuronal DCX, nem na expressão do marcador de astrócitos (GFAP).

A ocitocina (OT) e o OTR foram estudados tradicionalmente por seu papel na descida do leite e a contração uterina durante o parto, mas também têm sido amplamente estudados em associação com o comportamento social, assim como o comportamento sexual e de afiliação. A resposta celular induzida pela OT está envolvida com a regulação do crescimento de neuritos, assim como aumento da sobrevivência e a viabilidade celular (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001; JUREK; NEUMANN, 2018). Com relação à inflamação, diversos estudos demonstraram o papel anti-inflamatório e antioxidante da OT; Szeto e colaboradores (2017) estudaram o papel da inflamação na expressão do OTR em macrófagos, encontrando que a administração de LPS aumenta a expressão de OTR através da ativação da via NF-Kb.

As projeções dos neurônios OT conectam o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), o núcleo leito da estria terminal (BNST), a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal medial, entre outros (JUREK; NEUMANN, 2018). A distribuição de neurônios OT e do OTR envolve áreas relacionadas com a resposta ao estresse e ansiedade, cumprindo diversas funções de forma específica de acordo com a região onde são expressos, e participando também de processos como a neurogênese e a plasticidade (LEUNER; CAPONITI; GOULD, 2011).

Em um estudo conduzido por Tan e colaboradores (2019), encontraram que a ativação optogênica de neurônios que expressam o OTR no córtex pré-frontal alterou a capacidade de reconhecimento social em camundongos, mas não afetou a sociabilidade desses animais, nem foi encontrada uma relação dessa falha no reconhecimento social com déficits na memória em geral ou aversão pela novidade.

Os nossos resultados mostraram também uma expressão variável do OTR no córtex pré-frontal durante a vida da prole, o que poderia estar relacionado com o padrão transitório de expressão desse receptor em algumas regiões do cérebro ao longo do desenvolvimento durante o período perinatal e pós-natal, e que é também dependente da região, a espécie e o sexo (MUSCATELLI *et al.*, 2017).

Desde a perspectiva genética, os estudos avaliando polimorfismos de um nucleótido (SNPs) do gene OTR têm demonstrado uma relação com a apresentação do TEA em vários aspectos do comportamento social, no entanto, os resultados são inconsistentes entre os trabalhos e os SNPs estudados (CATALDO; AZHARI; ESPOSITO, 2018).

A sinaptofisina é uma proteína da vesícula pré-sináptica associada à ancoragem e liberação das vesículas, permitindo liberação de neurotransmissores nos terminais sinápticos. A neuroinflamação pode produzir a redução de marcadores sinápticos como a sinaptofisina, a qual parece ter um papel na patogênese de algumas doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas, sugerindo que essas mudanças sinápticas poderiam contribuir com o declínio cognitivo e as mudanças comportamentais nestas doenças (RAO *et al.*, 2012).

Em modelos de AIM induzidos por PolyI:C foi encontrada diminuição da expressão de sinaptofisina no hipocampo sugerindo uma redução da função de liberação da vesícula

pré-sináptica (HAO *et al.*, 2010; OH-NISHI *et al.*, 2010;). Em modelos induzidos por LPS, encontraram diminuição das fibras mielinizadas no hipocampo dos filhotes expostos ao LPS no período pré-natal. Da mesma forma, encontraram diminuição da expressão de sinaptofisina no hipocampo, e ainda, a diferença foi mais evidente nos machos do que nas fêmeas, sugerindo que os hormônios sexuais desempenham um papel protetor no desenvolvimento do cérebro e no dano tecidual ocasionado por estresse oxidativo (WISCHHOF *et al.*, 2015).

Com relação ao GR, sua expressão e função têm sido estudadas principalmente no contexto de depressão e estresse, sendo que tem um papel fundamental na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (NIKKHESLAT *et al.*, 2017). Assim, eventos como AIM poderiam alterar o eixo, levando a disfunções no desenvolvimento sináptico (COIRO *et al.*, 2015).

Estudos em modelos animais de estresse perinatal tem demonstrado associação entre alterações comportamentais e redução da densidade dos GR, assim como redução nos marcadores de plasticidade sináptica como são BDNF e a sinaptofisina no córtex pré-frontal e no hipocampo (FUMAGALLI *et al.*, 2007).

Diante disso, se torna difícil sugerir que as alterações na expressão do OTR no córtex pré-frontal poderiam ter uma relação com as alterações no comportamento social dos animais dado que essas alterações na expressão do OTR não se mantiveram durante a vida adulta, mas as alterações no comportamento social sim. No entanto, nossos dados poderiam indicar um distúrbio na transmissão sináptica no modelo de AIM induzida por LPS no DG16, que poderia ter relação com as alterações comportamentais apresentadas no nosso modelo. Além disso, a exposição do feto à corticosterona materna após o estresse imunológico poderia estar relacionada às alterações encontradas no GR durante a adolescência e sugere disfunções a longo prazo do eixo HPA.

#### 5.4 EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS A MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS

No nosso trabalho, a prole adolescente do grupo LPS apresentou alterações na expressão de proteínas relacionadas a mecanismos epigenéticos, só nas fêmeas não foram encontradas alterações na expressão de Rest e Line1, e também não foram

encontradas diferenças na metilação dessas proteínas em nenhum dos grupos estudados.

O papel do Rest tem sido amplamente estudado no contexto do desenvolvimento, demonstrando que participa da diferenciação neuronal durante a embriogênese, assim como confere resistência ao estresse oxidativo em neurônios e é essencial para manter a viabilidade neuronal (THIEL; EKICI; RÖSSLER, 2014). Em modelos animais de isquemia cerebral, encontrou-se aumento no mRNA e na proteína Rest no hipocampo, levando a morte neuronal por alterações na expressão de diversos genes e as proteínas que estes codificam (BALDELLI; MELDOLESI, 2015).

Kawase e colaboradores (2019) encontraram em um modelo de TEA induzido com VPA em camundongos um aumento na expressão do Rest no córtex somatossensorial, onde também foram observadas alterações na densidade dos espinhos dendríticos.

Em pacientes autistas, análises genéticas demonstraram uma diminuição da expressão de genes alvo do Rest, sugerindo um aumento na ativação desse fator. Da mesma forma, essa diminuição dos genes alvo do Rest também foi demonstrada em camundongos, sugerindo que a ativação anormal do Rest durante o desenvolvimento poderia estar associada com o atraso no neurodesenvolvimento e o comportamento do tipo autista nesses animais (KATAYAMA *et al.*, 2016).

Por outro lado, desde o ponto de vista de inflamação, estudos *in vitro* da expressão do Rest mostraram ativação desse fator desencadeado por IL-1 $\beta$  em células de neuroblastoma e neurônios primários, alterando assim a transmissão sináptica (BUFFOLO *et al.*, 2021). Rest participa na regulação transcricional de genes que codificam proteínas sinápticas, o que poderia explicar as alterações encontradas na sinaptofisina no córtex pré-frontal da prole de fêmeas tratadas com LPS durante a gestação.

Por outro lado, estudos post-mortem realizados em cérebros humanos demonstraram um aumento do número de cópias do Line1 no córtex pré-frontal de pacientes diagnosticados com esquizofrenia, e o sequenciamento completo do genoma revelou inserções de Line1 em genes relacionados com a sinapse e com a fisiopatologia da esquizofrenia, assim como genes relacionados com a migração neuronal e a membrana plasmática, o que pode indicar possíveis falhas na migração celular e nas

sinapses, levando à formação de estruturas sinápticas aberrantes (BUNDO *et al.*, 2014; DOYLE *et al.*, 2017). O aumento da expressão de Line1 foi relacionado a apoptose, bem como dano e reparação do DNA e respostas ao estresse. As alterações do DNA que podem ser induzidas por estes elementos, podem gerar um microambiente inflamatório (ZHANG; ZHANG; YU, 2020).

Bundo e colaboradores (2014) com o objetivo de avaliar se essas alterações em cérebros humanos estariam presentes em modelos animais de fatores de risco ambientais para esquizofrenia, induziram um modelo de AIM com PolyI:C em camundongos confirmando estes achados, sugerindo que o aumento da atividade do Line1 poderia estar relacionado com a fisiopatologia de alterações do neurodesenvolvimento e com um aumento da susceptibilidade dos indivíduos a manifestar sintomas clínicos de esquizofrenia.

Shpyleva e colaboradores (2018) em um estudo post-mortem encontraram aumento dos segmentos ORF1 e ORF2 do Line1 no cerebelo de pacientes diagnosticados com TEA, mas não um aumento global na expressão do Line1, sugerindo que é uma resposta adaptativa (não hereditária) que não refletiu no número total de cópias. Da mesma forma, encontraram uma tendência a diminuição da metilação do Line1 e, além disso, encontraram que a expressão de Line1 poderia ser desencadeada por condições de desbalanço redox e estresse oxidativo (SHPLYEVA *et al.*, 2018). Tangsuwansri e colaboradores (2018) encontraram também uma diminuição na metilação do Line1 em células periféricas de pacientes diagnosticados com TEA com fenótipo de deficiências severas na linguagem, mas não em todos os indivíduos com TEA avaliados.

A respeito da metilação, em análises post-mortem foi encontrada hipermetilação no tecido cerebelar de indivíduos autistas (JAMES *et al.*, 2014; SHPLYEVA *et al.*, 2014;). Além disso, em um modelo genético de TEA em camundongos foram encontrados níveis aumentados de DNMT3a e DNMT3b no cerebelo dos machos, mas não das fêmeas, nem houve alterações na expressão de TET1 e TET2. Esses resultados estiveram relacionados com dano oxidativo do DNA, o que sugere que lesões oxidativas no DNA e padrões de metilação alterados poderiam ser características importantes do fenótipo autista (SHPLYEVA *et al.*, 2014).

Por outro lado, em uma análise epigenética feita em cerebelos de pacientes autistas foram encontrados aumento na expressão de DNMT3A e DNMT3B relacionados com um incremento em 5mC e 5hmC, assim como aumento de TET1 e TET3, sugerindo um aumento compensatório da metilação no cerebelo autista relacionado também a dano oxidativo do DNA (JAMES *et al.*, 2014).

No trabalho de Alex e colaboradores (2019), foram avaliados os SNPs mais relevantes funcionalmente nas DNMTs (DNMT1, 3A, 3B e 3L) em células periféricas de pacientes diagnosticados com TEA. Os pesquisadores encontraram uma associação positiva entre determinados SNPs e o diagnóstico de autismo, especificamente no DNMT1 e DNMT3A. Esses dados sugerem que alguns SNPs podem alterar os padrões de metilação dos genes, influenciando a expressão gênica e, em consequência, levando a uma função cerebral alterada característica de transtornos neuropsiquiátricos como autismo e esquizofrenia (ALEX *et al.*, 2019).

As modificações epigenéticas que acontecem durante o período perinatal podem também ser influenciadas por hormônios esteroidais, manifestando dimorfismo sexual e podem perdurar ao longo da vida (GORE *et al.*, 2014), o que poderia explicar algumas diferenças encontradas nesse trabalho entre fêmeas e machos.

Nossos resultados apresentam algumas limitações dado que não é possível afirmar se as alterações do Rest e o Line1 poderiam estar de fato envolvidas na patogênese das alterações moleculares encontradas até o momento nesse trabalho ou se poderiam ser consideradas como uma resposta homeostática ao estresse imunológico no período perinatal, no entanto, foi evidente uma correlação negativa entre o comportamento social e a expressão desses fatores nos animais expostos ao LPS durante o DG16, sugerindo que a expressão alterada do Rest e Line1 poderiam ter uma relação com as alterações comportamentais encontradas nesse trabalho. Da mesma forma, no nosso trabalho foram avaliados os níveis de expressão das DNMTs e as TETs, mas não a sua atividade. Autores sugerem que padrões aberrantes de metilação poderiam estar envolvidos na fisiopatologia do TEA.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A administração intraperitoneal de lipopolisacarídeo a uma dose de 500µg/kg durante o 16º dia da gestação foi capaz de induzir o comportamento doentio nas fêmeas gestantes, diminuiu a porcentagem de partos e o tamanho das ninhadas como era esperado. Além disso, alterou notavelmente o comportamento social da prole ao longo da vida, sem afetar a memória espacial e de reconhecimento de objetos. No âmbito molecular, afetou com um padrão de dimorfismo sexual a expressão de proteínas relacionadas com o comportamento social, a plasticidade sináptica e a resposta a estresse no córtex pré-frontal da prole. Também alterou a expressão gênica de fatores envolvidos com o neurodesenvolvimento e fatores que medeiam os padrões de metilação do genoma.

Considerando que a inflamação durante a gestação tem sido associada a doenças do neurodesenvolvimento, o nosso modelo de ativação imune materna induzido com LPS demonstrou afetar principalmente a prole masculina no nível molecular no córtex pré-frontal, o que poderia estar relacionado com as alterações encontradas no comportamento social desses animais.

Futuros trabalhos são necessários para estudar as diferenças sexuais das vias pelas quais poderiam se apresentar as alterações comportamentais encontradas nesse trabalho, incluindo o papel da placenta e dos hormônios sexuais no desenvolvimento dessas alterações.



## REFERÊNCIAS

- ALEX, A. M. *et al.* Genetic association of DNMT variants can play a critical role in defining the methylation patterns in autism. **IUBMB Life**, [Inglaterra], v. 71, n. 7, p. 901–907, 1 jul. 2019.
- AL-AMIN, M. M. *et al.* Astaxanthin ameliorates prenatal LPS-exposed behavioral deficits and oxidative stress in adult offspring. **BMC neuroscience**, [Londres], v. 17, p. 11, 8 fev. 2016.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**, Arlington, VA, Fifth Edition, 2013.
- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive processing**, [Alemanha], v. 13, n. 2, p. 93–110, maio 2012.
- AYANLAJA, A. A. *et al.* Distinct Features of Doublecortin as a Marker of Neuronal Migration and Its Implications in Cancer Cell Mobility. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [Suiça], v. 10, p. 199, 28 jun. 2017.
- BATISTA, T. H.; GIUSTI-PAIVA, A.; VILELA, F. C. Maternal protein malnutrition induces autism-like symptoms in rat offspring. **Nutritional Neuroscience**, [Londres], v. 0, n. 0, p. 1–9, 28 jan. 2018.
- BECSKEI, C. *et al.* Inhibitory effects of lipopolysaccharide on hypothalamic nuclei implicated in the control of food intake. **Brain, Behavior, and Immunity**, [Holanda], v. 22, n. 1, p. 56–64, 1 jan. 2008.
- BERECZKI, E. *et al.* Synaptic markers of cognitive decline in neurodegenerative diseases: A proteomic approach. **Brain**, [Londres], v. 141, n. 2, p. 582–595, 2018.
- BINDER, D. K.; SCHARFMAN, H. E. Brain-derived neurotrophic factor. **Growth factors** [Chur], v. 22, n. 3, p. 123–31, set. 2004.
- BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. **Brain, Behavior, and Immunity**, [Holanda], v. 24, n. 6, p. 881–897, 1 ago. 2010.
- BRAUN, A. E. *et al.* “Females are not just ‘Protected’ Males”: Sex-specific vulnerabilities in placenta and brain after prenatal immune disruption. **eNeuro**, [Washington], v. 6, n. 6, 1 nov. 2019.

BUFFOLO, F. *et al.* Neuroinflammation induces synaptic scaling through IL-1 $\beta$ -mediated activation of the transcriptional repressor REST/NRSF. **Cell death & disease**, [Londres], v. 12, n. 2, 1 fev. 2021.

BUNDO, M. *et al.* Increased L1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. **Neuron**, [Cambridge], v. 81, n. 2, p. 306–313, 22 jan. 2014.

CARLSSON, T. *et al.* Early environmental risk factors for neurodevelopmental disorders – a systematic review of twin and sibling studies. **Development and Psychopathology**, [Nova lorque], v. 33, n. 4, p. 1448, 28 out. 2021.

CATALDO, I.; AZHARI, A.; ESPOSITO, G. A Review of Oxytocin and Arginine-Vasopressin Receptors and Their Modulation of Autism Spectrum Disorder. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [Suiça], v. 11, p. 27, 13 fev. 2018.

CEZAR, L. C. *et al.* Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [Inglaterra], v. 84, p. 173–180, 8 jun. 2018.

CHAUDHURY, S. *et al.* Activity-dependent synaptic plasticity modulates the critical phase of brain development. **Brain and Development**, [Holanda], v. 38, n. 4, p. 355–363, 2016.

COIRO, P. *et al.* Impaired synaptic development in a maternal immune activation mouse model of neurodevelopmental disorders. **Brain, Behavior, and Immunity**, [Holanda], v. 50, p. 249–258, 1 nov. 2015.

COYLE, P. *et al.* Maternal dietary zinc supplementation prevents aberrant behaviour in an object recognition task in mice offspring exposed to LPS in early pregnancy. **Behavioural Brain Research**, [Amsterdam], v. 197, n. 1, p. 210–218, 2009.

DANTZER, R. *et al.* From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, [Londres], v. 9, n. 1, p. 46–56, 2008.

DEAK, T., *et al.* Neuroimmune mechanisms of stress: sex differences, developmental plasticity, and implications for pharmacotherapy of stress-related disease. **Stress**, [Amsterdam], v. 18, n. 4, p. 367–380, 2015.

DEPINO, A. M. Early prenatal exposure to LPS results in anxiety- and depression-related behaviors in adulthood. **Neuroscience**, [Nova lorque], v. 299, n. May, p. 56–65, 2015.

DEVERMAN, B. E.; PATTERSON, P. H. Cytokines and CNS development. **Neuron**, [Cambridge], v. 64, n. 1, p. 61–78, 2009.

- DOYLE, G. A. *et al.* Analysis of Line1 Elements in DNA from Postmortem Brains of Individuals with Schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, [Nova lorque], v. 42, n. 13, p. 2602–2611, 6 jun. 2017.
- ENGELAND, C.G., *et al.* Locomotor activity changes following lipopolysaccharide treatment in mice: a multivariate assessment of behavioral tolerance. **Physiology & Behavior**, [Oxford], v. 72, n. 4, p. 481-491. 2001.
- ESTES, M. L.; MCALLISTER, A. K. (2016). Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. **Science**. [Nova lorque], v.353, n.6301, p.772–777. 2016.
- FAGIOLINI, M.; JENSEN, C. L.; CHAMPAGNE, F. A. Epigenetic influences on brain development and plasticity. **Current Opinion in Neurobiology**, [Londres], v. 19, n. 2, p. 207–212, 2009.
- 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. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [Nova lorque], v. 39, n. C, p. 68–78, 2014.
- FRENCH, S. S.; CHESTER, E. M.; DEMAS, G. E. Maternal immune activation affects litter success, size and neuroendocrine responses related to behavior in adult offspring. **Physiology and Behavior**, [Oxford], v. 119, p. 175–184, 2013.
- FUJITA, Y.; ISHIMA, T.; HASHIMOTO, K. Supplementation with D-serine prevents the onset of cognitive deficits in adult offspring after maternal immune activation. **Scientific Reports**, [Londres], n.6, p.37261. 2016.
- FUMAGALLI, F. *et al.* Stress during development: Impact on neuroplasticity and relevance to psychopathology. **Progress in Neurobiology**, [Nova lorque], v. 81, n. 4, p. 197–217, 2007.
- GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. **Physiological Reviews**, [Washington], v.81, n.2, p.629–683. 2001.
- GUERRIN, C. G. J. *et al.* Immune Activation in Pregnant Rats Affects Brain Glucose Consumption, Anxiety-like Behaviour and Recognition Memory in their Male Offspring. **Molecular Imaging and Biology**, [Nova lorque], v. 24, n. 5, p. 740, 2022.
- GUPTA, V. K., *et al.* TrkB receptor signalling: implications in neurodegenerative, psychiatric and proliferative disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, [Suiça], v.14, n.5, p.10122–10142. 2013.
- HAN, M. *et al.* Intake of 7,8-Dihydroxyflavone During Juvenile and Adolescent Stages Prevents Onset of Psychosis in Adult Offspring After Maternal Immune Activation. **Scientific Reports**, [Londres], n.6, p.36087.2016.

HAN, V. X. *et al.* Maternal acute and chronic inflammation in pregnancy is associated with common neurodevelopmental disorders: a systematic review. **Translational Psychiatry**, [Nova lorque], v. 11, n. 1, p. 71, 1 jun. 2021a.

HAN, V. X. *et al.* Maternal immune activation and neuroinflammation in human neurodevelopmental disorders. **Nature Reviews Neurology**, [Londres], v.17, n. 9, p. 564–579, 2 ago. 2021b.

HAO, L. Y. *et al.* Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in cognitive deficits in age-increasing offspring rats. **Neuroscience**, [Nova lorque], v. 166, n. 3, p. 763–770, 31 mar. 2010.

HARVEY, L.; BOKSA, P. Do prenatal immune activation and maternal iron deficiency interact to affect neurodevelopment and early behavior in rat offspring? **Brain, Behavior, and Immunity**, [Holanda], v. 35, p. 144–154, 2014.

HOWERTON, C. L.; BALE, T. L. Prenatal programming: At the intersection of maternal stress and immune activation. **Hormones and Behavior**, [Nova lorque], v. 62, n. 3, p. 237–242, 2012.

JAMES, S. J. *et al.* Elevated 5-hydroxymethylcytosine in the Engrailed-2 (EN-2) promoter is associated with increased gene expression and decreased MeCP2 binding in autism cerebellum. **Translational Psychiatry**, [Nova lorque], v. 4, n. 10, p. e460–e460, 7 out. 2014.

JUREK, B.; NEUMANN, I. D. The Oxytocin Receptor: From Intracellular Signaling to Behavior. **Physiological reviews**, [Washington], v. 98, n. 3, p. 1805–1908, 1 jul. 2018.

KATAYAMA, Y. *et al.* CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. **Nature**, [Londres], v. 537, n. 7622, p. 675–679, 7 set. 2016.

KAWASE, H. *et al.* mS-11, a mimetic of the mSin3-binding helix in NRSF, ameliorates social interaction deficits in a prenatal valproic acid-induced autism mouse model. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, [Phoenix], v. 176, p. 1–5, 1 jan. 2019.

KIRSTEN, T. B. *et al.* Prenatal zinc prevents communication impairments and BDNF disturbance in a rat model of autism induced by prenatal lipopolysaccharide exposure. **Life Sciences**, [Holanda], v. 130, p. 12–17, 1 jun. 2015.

KIRSTEN, T. B. *et al.* Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. **NeuroImmunoModulation**, [Suiça], v. 17, n. 4, p. 240–251, 2010.

KRÄGELOH-MANN, I., *et al.* Plasticity during Early Brain Development Is Determined by Ontogenetic Potential. **Neuropediatrics**, [Stuttgart], v.48, n.2, p.066–071. 2017.

KNUESEL, I., *et al.* Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. **Nature Reviews Neurology**, [Londres], v. 10, n. 11, p. 643–660, 2014.

LEHMANN, J., *et al.* The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [Phoenix], v. 64, n. 4, p. 705–715, 1999.

LENZ, K. M.; NELSON, L. H. Microglia and beyond: Innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function. **Frontiers in Immunology**, [Suiça], v. 9, p. 698, 13 abr. 2018.

LEUNER, B.; CAPONITI, J. M.; GOULD, E. Oxytocin stimulates adult neurogenesis even under conditions of stress and elevated glucocorticoids. **Hippocampus**, [Nova lorque], v. 22, n. 4, p. 861–868, 2012.

MALKOVA, N. V. *et al.* Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. **Brain, Behavior, and Immunity**, [Holanda], v. 26, n. 4, p. 607–616, maio 2012.

MAMPAY, M.; SHERIDAN, G. K. Rest: An epigenetic regulator of neuronal stress responses in the young and ageing brain. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [Nova lorque], v. 53, p. 100744, 1 abr. 2019.

MARTIN, D.; GRAPIN-BOTTON, A. The Importance of Rest for Development and Function of Beta Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [Suiça], v. 5, n. FEB, p. 12, 24 fev. 2017.

MEYER, U. Prenatal Poly(I:C) Exposure and Other Developmental Immune Activation Models in Rodent Systems. **Biological Psychiatry**, [Nova lorque], v. 75, n. 4, p. 307–315, 2014.

MEYER, U., *et al.* The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, [Baltimore], v. 26, n. 18, p. 4752–62, 3 maio 2006.

MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Progress in Neurobiology**, [Nova lorque], v. 93, n. 3, p. 421–443, 2011.

MILNER, T. A.; MCEWEN, B. S.; WATERS, E. M. Estrogen Effects on Hippocampal Synapses. **The Synapse**, [s.l.], v. 95, n. 3, p. 195–219, 2014.

MOR, G., ALDO, P., & ALVERO, A. B. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. **Nature Reviews Immunology**, [Londres], v. 17, n. 8, p. 469–482, 2017.

MOR, G.; CARDENAS, I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. **American Journal of Reproductive Immunology**, [Dinamarca], v.63, n.6, p.425–433. 2010.

MORRIS-ROSENDAHL, D. J.; CROCQ, M. A. Neurodevelopmental disorders—the history and future of a diagnostic concept. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, [Inglaterra], v. 22, n. 1, p. 65, 1 mar. 2020.

MUSCATELLI, F. *et al.* Oxytocin Signaling in the Early Life of Mammals: Link to Neurodevelopmental Disorders Associated with ASD. **Current Topics in Behavioral Neuroscience**. [Heidelberg], v.35, p. 239–268. 2018.

MYCHASIUK, R., *et al.* Effects of rat prenatal exposure to valproic acid on behaviour and neuro-anatomy. **Developmental Neuroscience**, [Suiça], v. 34, n. 2–3, p. 268–276, 2012.

NAITO, H.; TONOUE, T. Sex difference in ultrasound distress call by rat pups. **Behavioural Brain Research**, [Amsterdam], v. 25, n. 1, p. 13–21, 1987.

NARDONE, S.; ELLIOTT, E. The Interaction between the Immune System and Epigenetics in the Etiology of Autism Spectrum Disorders. **Frontiers in neuroscience**, [Suiça], v. 10, n. JUL, 2016.

NIKKHESLAT, N.; ZUNSZAIN, P.; CARVALHO L.; ANACKER, C.; PARIANTE, C. **Antidepressant Actions on Glucocorticoid Receptors**. [s./.] Elsevier Inc., 2017.

NILSSON, A., *et al.* Inflammation-induced anorexia and fever are elicited by distinct prostaglandin dependent mechanisms, whereas conditioned taste aversion is prostaglandin independent. **Brain, Behavior, and Immunity**, [Holanda], v.61, p. 236–243. 2017.

OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s./.], v.132, n.5, p.1033–1044. 2013.

OH-NISHI, A. *et al.* Maternal immune activation by polyribonucleosinic-polyribocytidilic acid injection produces synaptic dysfunction but not neuronal loss in the hippocampus of juvenile rat offspring. **Brain Research**, [s./.], v. 1363, p. 170–179, 6 dez. 2010.

OWEN, M. J. *et al.* Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. **The British Journal of Psychiatry**, [Londres], v. 198, n. 3, p. 173–175, mar. 2011.

PANKSEPP, J. The ontogeny of play in rats. **Developmental Psychobiology**, [Nova Iorque], v.14, n.4, p.327–332. 1981.

PITTS, M. W. Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. **Bio-Protocol**, [California], v.8, n.5. 2018.

PUJOL LOPEZ, Y. et al. Effects of subcutaneous LPS injection on gestational length and intrauterine and neonatal mortality in mice. **NeuroImmunoModulation**, [Suíça] v. 22, n. 4, p. 274–278, 2015.

RACICOT, K.; KWON, J.Y.; ALDO, P.; SILASI, M.; MOR, G. Understanding the Complexity of the Immune System during Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, [Dinamarca], v.72, n.2, p.107–116. 2014.

RAO, J. S. *et al.* Neuroinflammation and synaptic loss. **Neurochemical Research**, NIH Public Access, [Nova Iorque], v.37, n.5, p.903-910, maio 2012.

RATNAYAKE, U., QUINN, T., WALKER, D. W., & DICKINSON, H. Cytokines and the neurodevelopmental basis of mental illness. **Frontiers in Neuroscience**, [Suíça], v.7, n.180. 2013.

ROSENFELD, C. S.; FERGUSON, S. A. Barnes maze testing strategies with small and large rodent models. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, [Estados Unidos], n.84, e51194. 2014.

SCATTONI, M. L.; CRAWLEY, J.; RICCERI, L. Ultrasonic vocalizations: a tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, [Estados Unidos], v. 33, n. 4, p. 508–15, abr. 2009.

SCHEDLOWSKI, M.; ENGLER, H.; GRIGOLEIT, J. S. Endotoxin-induced experimental systemic inflammation in humans: a model to disentangle immune-to-brain communication. **Brain, Behavior, and Immunity**, [Holanda], v. 35, p. 1–8, 2014.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, [Filadélfia], v.182, n.3, p.311–322. 2000.

SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **International Journal of Preventive Medicine**, [Iran], v.4, n.6, p.624–630. 2013.

SERVADIO, M. *et al.* Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autistic-like symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid. **Translational Psychiatry**, [Nova Iorque], v. 6, n. 9, 2016.

SHPYLEVA, S. *et al.* Overexpression of Line1 Retrotransposons in Autism Brain. **Molecular Neurobiology**, [Clifton], v. 55, n. 2, p. 1740–1749, 20 fev. 2017.

SHPYLEVA, S. *et al.* Cerebellar oxidative DNA damage and altered DNA methylation in the BTBR T+tf/J mouse model of autism and similarities with human post mortem cerebellum. **PloS ONE**, [San Francisco], v. 9, n. 11, 25 nov. 2014.

SOLEK, C. M.; FAROOQI, N.; VERLY, M.; LIM, T. K.; RUTHAZER, E. S. Maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. **Developmental Dynamics**, [Nova lorque], v.247, n.4, p.588–619. 2018.

SONG, S.-H.; AUGUSTINE, G. J. Synapsin Isoforms and Synaptic Vesicle Trafficking. **Molecules and Cells**, [Seul], v.38, n.11, p.936–940. 2015.

SWEATT, J. D. **Molecular Genetic Mechanisms for Long-Term Information Storage at the Cellular Level**. Second Edi ed. [s./.] Elsevier Inc., 2010.

SZETO, A. *et al.* Regulation of the macrophage oxytocin receptor in response to inflammation. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, [Bethesda], v. 312, n. 3, p. E183–E189, 2017.

TAN, Y. *et al.* Oxytocin Receptors Are Expressed by Glutamatergic Prefrontal Cortical Neurons That Selectively Modulate Social Recognition. **The Journal of Neuroscience**, [Baltimore], v. 39, n. 17, p. 3249–3263, 2019.

TANGSUWANSRI, C. *et al.* Investigation of epigenetic regulatory networks associated with autism spectrum disorder (ASD) by integrated global Line1 methylation and gene expression profiling analyses. **PloS ONE**, [San Francisco], v. 13, n. 7, p. e0201071, 1 jul. 2018.

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**, [Londres], v. 3, n. 1, p. 15, 14 jun. 2012.

THIEL, G.; EKICI, M.; RÖSSLER, O. G. RE-1 silencing transcription factor (Rest): a regulator of neuronal development and neuronal/endocrine function. **Cell and tissue research**, [Berlin], v. 359, n. 1, p. 99–109, 1 jan. 2015.

THION, M. S.; GAREL, S. On place and time: microglia in embryonic and perinatal brain development. **Current Opinion in Neurobiology**, [Londres], n.47, p.121–130. 2017.

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

VALIBEIGI, N., *et al.* A Modified Barnes Maze for Juvenile Rats. **Bio-protocol**, [California], v.8, n. 22, e3084. 2018.



VAN DEN EYNDE, K., *et al.* Hypolocomotive behaviour associated with increased microglia in a prenatal immune activation model with relevance to schizophrenia. **Behavioural brain research**, [Amsterdam], v. 258, p.179–186. 2014.

VANDERSCHUREN, L. J. M. J.; ACHTERBERG, E. J. M.; TREZZA, V. The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [Fayetteville], v. 70, p. 86–105, 1 nov. 2016.

VAN MOURIK, M. S. M.; MACKLON, N. S.; HEIJNEN, C. J. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. **Journal of Leukocyte Biology**, [Inglaterra], v. 85, n.1, p.4–19. 2008.

VIEIRA, F. **Exposição pré-natal ao lipopolissacarídeo como modelo translacional de transtorno do espectro autista**. 2017. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2017.

VITOR-VIEIRA, F.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Hyperactivation of the amygdala correlates with impaired social play behavior of prepubertal male rats in a maternal immune activation model. **Behavioural Brain Research**, [Amsterdam], v. 414, n. July, p. 113503, 2021.

WANG, F., *et al.* Stress Induced Neuroplasticity and Mental Disorders. **Neural Plasticity**, [Reino Unido], n.9634501. 2017.

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

WOODS, R. M.; *et al.* Maternal immune activation in rodent models: A systematic review of neurodevelopmental changes in gene expression and epigenetic modulation in the offspring brain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [Fayetteville], v. 129, p. 389–421, 1 out. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019). International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (11th ed.). <https://icd.who.int/>

WU, X.; ZHANG, Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. **Nature Reviews Genetics**, [Londres], v. 18, n. 9, p. 517–534, 30 maio 2017.

XIAO, L., *et al.* Critical Role of TLR4 on the Microglia Activation Induced by Maternal LPS Exposure Leading to ASD-Like Behavior of Offspring. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [Lausanne], v. 9, p. 634837, 4 mar. 2021.

ZHANG, S. *et al.* Sepsis-induced selective loss of NMDA receptors modulates hippocampal neuropathology in surviving septic mice. **PLoS ONE**, [San Francisco], v. 12, n. 11, 1 nov. 2017.

ZHANG, J.-C.; YAO, W.; HASHIMOTO, K. Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-TrkB Signaling in Inflammation-related Depression and Potential Therapeutic Targets. **Current Neuropharmacology**, [EmiratosArabesUnidos], v.14, n. 7, 721–731. 2016.

ZHANG, X.; ZHANG, R.; YU, J. New Understanding of the Relevant Role of Line1Retrotransposition in Human Disease and Immune Modulation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [Lausanne], v. 8, 7 ago. 2020.

## APÊNDICE A – Resumo estatística fêmeas gestantes

		Controle		LPS		Valor de p
		Média ± EPM	n	Média ± EPM	n	
<b>Comportamento doentio</b>						
Campo aberto	Distância percorrida	1612 ± 72,31	11	942,3 ± 114,7	14	0,0001
	Tempo de imobilidade	80,45 ± 8,114	11	173,5 ± 12,94	14	<0,0001
	Ganho de peso	12,91 ± 0,857	11	-10,29 ± 3,468	14	<0,0001
	Ingestão alimentar	27,44 ± 1,107	11	7,95 ± 2,521	14	<0,0001

## APÊNDICE B – Resumo estatística experimentos na prole

(continua)

Prole adolescente	Machos					Fêmeas					
	Controle		LPS		Valor de p	Controle		LPS		Valor de p	
	Média ± EPM	n	Média ± EPM	n		Média ± EPM	n	Média ± EPM	n		
VUS	198,2 ± 26,94	15	213,3 ± 22	18	0,6644	173,4 ± 20,62	16	152,4 ± 21,59	14	0,488	
Reconhecimento de objetos 2 horas	Objeto familiar	7,76 ± 1,50	14	7,703 ± 1,00	14	0,9751	6,966 ± 0,856	14	11,2 ± 2,10	14	0,066
	Objeto novo	21,53 ± 2,398	14	15,78 ± 2,44	14	0,1052	18,39 ± 1,772	14	23,41 ± 2,92	14	0,153
	Índice de reconhecimento	0,737 ± 0,034	14	0,655 ± 0,03	14	0,0866	0,723 ± 0,028	14	0,653 ± 0,03	14	0,143
Reconhecimento de objetos 24 horas	Objeto familiar	6,158 ± 1,144	14	5,523 ± 0,902	14	0,666	4,075 ± 0,628	14	7,154 ± 1,021	14	0,016
	Objeto novo	18,32 ± 2,639	14	17,78 ± 1,879	14	0,866	17,84 ± 2,679	14	23,14 ± 2,987	14	0,198
	Índice de reconhecimento	0,7375 ± 0,037	14	0,7481 ± 0,041	14	0,851	0,8 ± 0,031	14	0,683 ± 0,057	14	0,086
Comportamento de brincar	Tempo de interação	56,33 ± 3,807	14	25,68 ± 2,874	14	<0,0001	35,19 ± 4,633	14	21,58 ± 1,652	14	0,01
	Frequência de comportamentos sociais	43,93 ± 3,796	14	22,29 ± 3,656	14	0,001	26,14 ± 2,897	14	18,29 ± 1,251	14	0,015
Labirinto de Barnes	Distância percorrida	1000 ± 61,51	5	1005 ± 63,72	6	0,957	10,68 ± 80,46	5	905,7 ± 78,78	6	0,184
D6	Latência para o buraco alvo	20,92 ± 7,852	5	13,80 ± 4,470	6	0,431	14,16 ± 4,821	5	9,733 ± 3,077	6	0,443
	Frequência no buraco alvo	15,60 ± 1,806	5	17,50 ± 4,039	6	0,698	14 ± 3,688	5	18 ± 3	6	0,416
	Tempo de exploração do buraco alvo	11,44 ± 2,134	5	11,27 ± 1,398	6	0,945	9 ± 2,257	5	10 ± 1,821	6	0,735
	Tempo de exploração quadrante alvo	12,56 ± 2,189	5	12,40 ± 1,413	6	0,95	9,96 ± 2,367	5	11,37 ± 1,793	6	0,454
D10	Frequência no quadrante alvo	19 ± 2,025	5	21,83 ± 4,556	6	0,609	17,40 ± 4,354	5	22,83 ± 2,651	6	0,296
	Nº de erros	11,20 ± 0,86	5	11 ± 2,477	6	0,945	11,20 ± 2,059	5	13,17 ± 2,713	6	0,59
	Distância percorrida	891 ± 81,98	5	1126 ± 76,49	6	0,065	1212 ± 65,31	5	1052 ± 78,11	6	0,16
	Latência para o buraco alvo	10,52 ± 3,187	5	15,40 ± 8,184	6	0,619	13,92 ± 5,584	5	2037 ± 10,85	6	0,632
	Frequência no buraco alvo	6,2 ± 1,985	5	7,5 ± 2,094	6	0,567	8,2 ± 1,114	5	9,833 ± 2,833	6	0,631
	Tempo de exploração do buraco alvo	6,440 ± 0,988	5	7,73 ± 1,771	6	0,562	9,55 ± 0,368	5	12,03 ± 2,949	6	0,52
	Tempo de exploração quadrante alvo	12,56 ± 1,818	5	10,53 ± 2,228	6	0,51	15,68 ± 3,544	5	14,70 ± 3,131	6	0,792
Frequência no quadrante alvo	16,8 ± 3,693	5	15,67 ± 4,055	6	0,843	15,60 ± 1,327	5	16,67 ± 3,49	6	0,797	

## APÊNDICE B – Resumo estatística experimentos na prole

(continuação)

Prole adolescente		Machos					Fêmeas				
		Controle		LPS		Valor de p	Controle		LPS		Valor de p
		Média ± EPM	n	Média ± EPM	n		Média ± EPM	n	Média ± EPM	n	
	Nº de erros	32 ± 4,336	5	30,5 ± 2,349	6	0,756	24,60 ± 1,122	5	34,17 ± 3,341	6	0,034
	Latência até o buraco oposto	29,28 ± 8,935	5	18,37 ± 5,811	6	0,317	18,16 ± 7,584	5	16,60 ± 5,652	6	0,87
	Frequência no buraco oposto	5,6 ± 2,064	5	5,5 ± 1,258	6	0,966	3 ± 1,049	5	7 ± 1,438	6	0,058
	Tempo de exploração buraco oposto	4,28 ± 1,793	5	3,433 ± 1,295	6	>0,999	3,2 ± 1,13	5	4,6 ± 0,891	6	0,349
	Tempo de exploração quadrante oposto	6,00 ± 2,001	5	4,52 ± 0,349	6	0,487	4,56 ± 1,175	5	8,267 ± 1,581	6	0,15
	Frequência no quadrante oposto	10,8 ± 2,518	5	14,50 ± 3,063	6	0,388	6,6 ± 2,112	5	15,17 ± 3,582	6	0,083
<b>Prole adulta</b>											
Campo aberto	Distância percorrida	7805 ± 374	13	6493 ± 498,3	13	0,045	10291 ± 371,4	13	9758 ± 312,5	12	0,287
	Tempo de imobilidade	410,4 ± 22,82	13	514,7 ± 39,82	13	0,032	260,1 ± 13,04	13	301,2 ± 18,40	13	0,081
Reconhecimento de objetos 2 horas	Objeto familiar	10,13 ± 1,181	13	13,35 ± 1,904	13	0,163	14,53 ± 1,841	13	13,19 ± 1,909	13	0,6204
	Objeto novo	29,97 ± 4,277	13	37,19 ± 4,815	13	0,273	39,52 ± 5,169	13	33,61 ± 4,557	13	0,399
	Índice de reconhecimento	0,707 ± 0,062	13	0,724 ± 0,029	13	0,724	0,722 ± 0,002	13	0,675 ± 0,06	13	0,639
Reconhecimento de objetos 24 horas	Objeto familiar	10,17 ± 1,584	13	10,55 ± 1,648	13	0,869	16,13 ± 2,078	13	13,73 ± 1,898	13	0,401
	Objeto novo	26,22 ± 2,714	13	27,45 ± 4,753	13	0,511	37,39 ± 2,638	13	27,97 ± 4,326	13	0,075
	Índice de reconhecimento	0,735 ± 0,027	13	0,726 ± 0,034	13	0,849	0,704 ± 0,02	13	0,630 ± 0,042	13	0,138
Interação social	Tempo de interação	67,90 ± 7,469	13	43,27 ± 5,622	12	0,015	48,64 ± 8,05	12	25,83 ± 3,823	12	0,017
	Frequência de comportamentos sociais	28,75 ± 2,267	13	19,75 ± 1,629	12	0,003	30,17 ± 2,507	12	17,75 ± 2,1	12	0,001
Labirinto de Barnes	Distância percorrida	529,5 ± 22,88	9	537,1 ± 36,79	12	0,873	720,1 ± 33,75	11	783,6 ± 53,77	8	0,308
D6	Latência para o buraco alvo	13,36 ± 2,945	9	15,50 ± 4,571	12	0,719	15,13 ± 3,802	11	12,20 ± 3,656	8	0,598

## APÊNDICE B – Resumo estatística experimentos na prole

(conclusão)

Prole adolescente		Machos					Fêmeas				
		Controle		LPS		Valor de p	Controle		LPS		Valor de p
		Média ± EPM	n	Média ± EPM	n		Média ± EPM	n	Média ± EPM	n	
	Frequência no buraco alvo	7,889 ± 0,824	9	9,083 ± 1,282	12	0,477	5,636 ± 1,138	11	5,375 ± 0,843	8	0,865
	Tempo de exploração do buraco alvo	21,98 ± 2,536	9	23,32 ± 2,277	12	0,7	11,44 ± 1,496	11	10,40 ± 2,027	8	0,678
	Tempo de exploração quadrante alvo	25,71 ± 2,698	9	28,43 ± 2,871	12	0,51	15,64 ± 1,744	11	15,45 ± 2,125	8	0,946
	Frequência no quadrante alvo	16,67 ± 1,302	9	18,08 ± 2,047	12	0,596	14,91 ± 2,705	11	15,75 ± 2,068	8	0,82
	Nº de erros	23,44 ± 3,087	9	21,67 ± 3,175	12	0,699	28,73 ± 2,611	11	26,38 ± 2,412	8	0,533
D10	Distância percorrida	668,4 ± 44,95	9	596,2 ± 38,82	12	0,238	665 ± 41,13	11	550,5 ± 32,18	8	0,055
	Latência para o buraco alvo	25,13 ± 10,64	9	12,57 ± 2,709	12	0,208	15,76 ± 4,789	11	19,03 ± 5,201	8	0,654
	Frequência no buraco alvo	5,667 ± 1,599	9	5,33 ± 0,772	12	0,788	5,545 ± 1,492	11	5,25 ± 0,94	8	0,67
	Tempo de exploração do buraco alvo	10,91 ± 2,941	9	11,50 ± 2,117	12	0,869	10,64 ± 1,769	11	12,58 ± 2,496	8	0,522
	Tempo de exploração quadrante alvo	16,69 ± 2,960	9	17,63 ± 2,683	12	0,816	18,33 ± 2,744	11	16,58 ± 2,348	8	0,65
	Frequência no quadrante alvo	14,33 ± 2,483	9	15,25 ± 1,728	12	0,757	17,09 ± 2,98	11	11,63 ± 0,885	8	0,12
	Nº de erros	34,89 ± 2,643	9	27,42 ± 2,575	12	0,061	32,73 ± 2,42	11	25,63 ± 2,211	8	0,053
	Latência até o buraco oposto	22,58 ± 5,644	9	54,93 ± 9,577	12	0,015	48,09 ± 10,2	11	52,63 ± 11,97	8	0,776
	Frequência no buraco oposto	5,33 ± 0,745	9	1,833 ± 0,548	12	0,001	3,273 ± 1,037	11	1,750 ± 0,773	8	0,308
	Tempo de exploração buraco oposto	2,956 ± 0,388	9	0,75 ± 0,286	12	0,0006	1,182 ± 0,366	11	0,5 ± 0,21	8	0,164
	Tempo de exploração quadrante oposto	5,733 ± 0,521	9	2,45 ± 0,572	12	0,0006	2,891 ± 0,757	11	5,1 ± 1,167	8	0,115
	Frequência no quadrante oposto	10,56 ± 1,119	9	5,33 ± 0,979	12	0,002	6,273 ± 1,096	11	8,125 ± 1,217	8	0,278

### APÊNDICE C – Resumo estatística *Western blot* prole adolescente e adultos

Proteína	MACHOS				FÊMEAS					
	Controle (Média ± EPM)	LPS (Média ± EPM)	Teste t		Controle (Média ± EPM)	LPS (Média ± EPM)	Teste t			
			Valor de p	n			Valor de p	n		
BAX (!)	100 ± 14,72	137,2 ± 25,37	n.s.	0,273	3	100 ± 18,06	94,56 ± 2,71	n.s.	0,780	3
BCL-2 (!)	100 ± 9,29	131,0 ± 4,52	*	0,040	3	100 ± 6,13	109,9 ± 18,02	n.s.	0,629	3
BDNF	100 ± 14,99	82,44 ± 9,86	n.s.	0,347	7	100 ± 14,02	130,1 ± 28,32	n.s.	0,359	7
DCX	100 ± 12,24	82,99 ± 11,15	n.s.	0,328	6	100 ± 9,68	78,45 ± 10,69	n.s.	0,173	5
GFAP	100 ± 10,84	84,72 ± 21,25	n.s.	0,536	6	100 ± 7,33	80,90 ± 8,98	n.s.	0,130	6
GR	100 ± 9,11	72,43 ± 6,69	*	0,03	7	100 ± 16,63	102,3 ± 16,94	n.s.	0,925	5
OTR	100 ± 13,06	181,5 ± 31,14	*	0,032	7	100 ± 5,64	134,2 ± 10,50	*	0,017	6
PSD95 (!)	100 ± 11,14	139,3 ± 43,42	n.s.	0,43	3	100 ± 6,41	296,5 ± 159,8	n.s.	0,286	3
Sinaptofisina	100 ± 4,27	79,25 ± 4,95	*	0,01	5	100 ± 12,82	96,75 ± 17,27	n.s.	0,88	6-7

Proteína	MACHOS				FÊMEAS					
	Controle (Média ± EPM)	LPS (Média ± EPM)	Teste t		Controle (Média ± EPM)	LPS (Média ± EPM)	Teste t			
			Valor de p	n			Valor de p	n		
BDNF	100 ± 13,08	84,35 ± 11,12	n.s.	0,38	7	100 ± 11,57	137,6 ± 18,38	n.s.	0,109	7
DCX						100 ± 8,77	89,99 ± 11,69	n.s.	0,506	7
OTR	100 ± 8,75	92,01 ± 12,43	n.s.	0,62	6-7	100 ± 7,20	97,03 ± 16,77	n.s.	0,873	7
Sinaptofisina	100 ± 6,51	92,84 ± 7,41	n.s.	0,482	7	100 ± 6,66	104 ± 7,48	n.s.	0,656	5-7

## APÊNDICE D – Resumo estatística PCR adolescentes

Epigenética	Machos					Fêmeas				
	Controle		LPS		Valor de p	Controle		LPS		Valor de p
	Média ± EPM	n	Média ± EPM	n		Média ± EPM	n	Média ± EPM	n	
Rest	1,030 ± 0,073	6	8,766 ± 1,832	6	0,004	0,941 ± 0,051	6	2,148 ± 0,709	6	0,12
Line1	1,033 ± 0,085	6	20,22 ± 4,727	6	0,001	1,137 ± 0,085	6	3,412 ± 1,230	6	0,082
Rest (5meC/5hmeC)	1,8 ± 0,298	6	1,778 ± 0,55	6	0,973	2,195 ± 0,473	6	2,223 ± 0,606	6	0,971
Line1 (5meC/5hmeC)	5,7 ± 2,51	6	11,67 ± 6,189	6	0,392	2,475 ± 0,46	6	2,182 ± 0,433	6	0,652
DNMT1	1,053 ± 0,101	6	2,907 ± 0,554	6	0,008	1,388 ± 0,104	6	10,24 ± 2,594	6	0,006
DNMT3a	1 ± 1,29	6	5,56 ± 9,06	6	0,0007	0,945 ± 0,15	6	7,097 ± 2,885	6	0,002
DNMT3b	0,924 ± 0,046	6	8,135 ± 3,245	6	0,075	1,177 ± 0,135	6	8,104 ± 1,573	6	0,004
TET1	1,045 ± 0,096	6	3,817 ± 1,455	6	0,002	1,163 ± 0,151	6	7,742 ± 2,043	6	0,004
TET2	1,053 ± 0,108	6	3,2 ± 0,387	6	0,0003	1 ± 0,059	6	8,243 ± 2,352	6	0,011
TET3	1,06 ± 0,109	6	3,55 ± 0,51	6	0,0008	1,182 ± 0,08	6	5,403 ± 2,271	6	0,015



## ANEXO A - CEUA



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 "Neuroplasticidade na prole de ratas submetidas a ativação imune materna com lipopolissacarídeo", registrada com o nº 17/2019, 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 07/08/2019 a 28/02/2023
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	12 Machos e 23 Fêmeas (Biotério Central da UNIFAL) 128 filhotes (Biotério de Experimentação Animal)
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central da UNIFAL e Biotério de Experimentação Animal

Alfenas, 07 de Agosto de 2019.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida  
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG