

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – MG**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS**  
**FISIOLÓGICAS**

**PRISCILA DE PAULA FRANCO**

**EFEITO DO PSICODÉLICO 25H-NBOME SOBRE O COMPORTAMENTO**  
**SOCIAL EM RATOS SUBMETIDOS À NEUROINFLAMAÇÃO**  
**NEONATAL COM LIPOPOLISSACARÍDEO**

**Alfenas/MG**

**2023**

**PRISCILA DE PAULA FRANCO**

**EFEITO DO PSICODÉLICO 25H-NBOME SOBRE O COMPORTAMENTO  
SOCIAL EM RATOS SUBMETIDOS À NEUROINFLAMAÇÃO  
NEONATAL COM LIPOPOLISSACARÍDEO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas pelo Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG.  
Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia.  
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

**Alfenas/MG**

**2023**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Franco, Priscila de Paula.

Efeito do psicodélico 25H-NBOMe sobre o comportamento social em ratos submetidos à neuroinflamação neonatal com lipopolissacarídeo / Priscila de Paula Franco. - Alfenas, MG, 2023.

116 f. : il. -

Orientador(a): Alexandre Giusti-Paiva.

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

Bibliografia.

1. Neuroinflamação neonatal. 2. Lipopolissacarídeo. 3. Vocalizações ultrassônicas. 4. Psicodélicos. 5. Alucinógenos. I. Giusti-Paiva, Alexandre, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

PRISCILA DE PAULA FRANCO

EFEITO DO PSICODÉLICO 25H-NBOME SOBRE O COMPORTAMENTO SOCIAL EM RATOS SUBMETIDOS À  
NEUROINFLAMAÇÃO NEONATAL 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: 24 de fevereiro de 2023

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

Prof. Dr. Lucas Cezar Pinheiro  
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina  
UFSC

Prof. Dr. Ernane Torres Uchoa  
Instituição: Universidade Estadual de Londrina  
UEL

Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva  
Instituição: Universidade federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Fernando Vitor Vieira  
Instituição: Universidade federal de Alfenas  
UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Giusti Paiva, Professor do Magistério Superior**, em 24/02/2023, às 11:54, 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 **Lucas Cezar Pinheiro, Usuário Externo**, em 24/02/2023, às 11:57, 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 **Fernando Vitor Vieira, Usuário Externo**, em 24/02/2023, às 11:59, 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 **Marcelo Lourenço da Silva, Professor do Magistério Superior**, em 24/02/2023, às 11:59, 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 **Ernane Torres Uchôa, Usuário Externo**, em 24/02/2023, às 11:59, 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 **0905486** e o código CRC **C1F1BF41**.

---

## **AGRADECIMENTOS**

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

## RESUMO

O sistema imunológico é capaz de modular o desenvolvimento do sistema nervoso central durante o neurodesenvolvimento. Nesse contexto, a neuroinflamação durante o período neonatal tem mostrado afetar o desenvolvimento cerebral, contribuindo para diversas disfunções neuronais e comportamentais que podem se manifestar ao longo da vida, como depressão, esquizofrenia ou transtorno do espectro autista. A busca por novos tratamentos mais eficazes para transtornos neuropsiquiátricos é constante, e a descoberta de novas substâncias psicotrópicas, como as drogas NBOMe (N-metoxibenzil), devem ser investigadas quanto ao potencial terapêutico, apesar de seu uso abusivo recreacional. Este trabalho buscou avaliar as alterações comportamentais e proteicas induzidas pela administração de lipopolissacarídeo (LPS, 0,2 ou 1,0 mg/kg, i.p.) em ratos no período neonatal (em um único dia ou por três dias consecutivos), e se essas alterações podem ser revertidas ou atenuadas pelo tratamento com 25H-NBOMe. Pôde-se observar que o LPS diminui o número de vocalizações ultrassônicas (VUS) durante o primeiro desafio imunológico no dia pós-natal 3 (PND3), porém causa o aumento desse parâmetro 2 h após a 3ª aplicação no PND5, quando comparado à salina. Isso sugere um comportamento doentio de prostração inicialmente, seguido por uma resistência ou adaptação ao LPS com aumento da comunicação, ou um comportamento tipo ansioso devido ao segundo contato com o aparato do teste. Entretanto, as alterações comunicativas não foram duradouras, pois não houve diferença entre os grupos quando testados novamente no PND12. O tratamento com LPS também reduziu o peso corporal dos animais até a peripuberdade, onde foi observada uma redução do comportamento de brincar em animais LPS em comparação aos animais salina, especialmente em machos expostos à dose de 1,0 mg/kg por 3 dias consecutivos, os quais reduziram o número de *pouncings* e o tempo total, cheirando e seguindo o animal parceiro. Em animais fêmeas, houve redução apenas do tempo seguindo e no número de *pouncings*. Esses resultados não ocorreram devido à falta de capacidade locomotora, pois não houve diferenças estatísticas relevantes entre animais salina e LPS no teste de campo aberto. O protocolo de aplicação de LPS no período neonatal escolhido para o prosseguimento dos experimentos foi a dose de 1,0 mg/kg aplicada por três dias consecutivos (PND3-5) pois foi o protocolo em que os animais apresentaram mais parâmetros prejudicados no teste de comportamento social. Quando tratados com 25H-NBOMe nas doses de 0,3 e 1,0 mg/kg, o teste de movimentos de contração da cabeça (HTR) demonstrou que o psicodélico foi capaz de aumentar a frequência desses movimentos. Quanto ao comportamento de brincar, o 25H-NBOMe na dose de 0,3 mg/kg foi capaz de reverter a diminuição da frequência de *pouncings*

e os tempos total, cheirando e seguindo o animal parceiro causada pela inflamação neonatal com LPS em animais machos. Entretanto, em animais salina, essa mesma dose reduziu o tempo seguindo e a frequência de *pouncings*, bem como a dose de 1,0 mg/kg, que também reduziu a frequência de *pinnings* nesses animais. Em animais fêmeas, o tratamento com 25H-NBOMe não alterou nenhum parâmetro do comportamento de brincar. A análise da expressão das proteínas GFAP, Iba1 e sinaptofisina no córtex pré-frontal não revelou nenhuma diferença causada pela inflamação neonatal com LPS ou pelo tratamento com 25H-NBOMe. Em conclusão, o estudo de novas drogas e substâncias psicotrópicas como potenciais agentes terapêuticos em transtornos neuropsiquiátricos precisa ser continuamente avaliado a fim de gerar dados confiáveis para encontrar doses eficazes e seguras para embasar estudos clínicos visando o tratamento ou manejo dos sintomas dessas desordens.

**Palavras-chave:** Neuroinflamação neonatal. Lipopolissacarídeo. Vocalizações ultrassônicas. Psicodélicos. Alucinógenos.

## ABSTRACT

The immune system can modulate the development of the central nervous system during neurodevelopment. In this context, neuroinflammation during the neonatal period has been shown to affect brain development, contributing to several neuronal and behavioral dysfunctions that may manifest throughout life, such as depression, schizophrenia, or autism spectrum disorder. The search for new more effective treatments for neuropsychiatric disorders is constant, and the discovery of new psychotropic substances, such as NBOMe drugs (N-methoxybenzil), should be investigated for their therapeutic potential, despite their recreational abuse. This study aimed to evaluate the behavioral and protein alterations induced by the administration of lipopolysaccharide (LPS, 0.2 or 1.0 mg/kg, i.p.) in rats in the neonatal period (in a single day or for three consecutive days), and whether these changes can be reversed or attenuated by treatment with 25H-NBOMe. It was observed that LPS decreases the number of ultrasonic vocalizations (VUS) during the first immunological challenge on postnatal day 3 (PND3) but causes the increase of this parameter 2 h after the 3<sup>rd</sup> application on PND5, when compared to saline. This suggests sickness behavior of prostration initially, followed by resistance or adaptation to LPS with increased communication, or an anxious-like behavior due to the second contact with the test apparatus. However, the communicative alterations were not lasting, as there was no difference between the groups when tested again on PND12. Treatment with LPS also reduced body weight until the prepubescent phase, where a reduction in play behavior was observed in LPS animals compared to saline animals, especially in males exposed to a dose of 1.0 mg/kg for 3 consecutive days, which reduced the number of pouncings and the total, sniffing and following times. In female animals, the differences were more subtle, presenting reductions of the time following and the number of pouncings only. These results did not occur due to lack of locomotor capacity, as there were no statistically relevant differences between saline and LPS animals in the open field test. The protocol for applying LPS in the neonatal period chosen for the continuation of the experiments was the dose of 1.0 mg/kg applied for three consecutive days (PND3-5) because it was the protocol in which the animals presented the most impaired parameters in the social behavior test. When treated with 25H-NBOMe at doses of 0.3 and 1.0 mg/kg, the head twitch response test (HTR) demonstrated that this psychedelic drug was able to increase the frequency of these movements. Regarding play behavior, 25H-NBOMe at a dose of 0.3 mg/kg was able to reverse the decrease in the frequency of pouncings and the total, smelling and following times caused by neonatal inflammation with LPS in male animals. However, in saline animals, this same dose reduced

the time following and frequency of pouncings, as well as the dose of 1.0 mg/kg, which also reduced the frequency of pinnings in these animals. In female animals, treatment with 25H-NBOMe did not alter any parameters of play behavior. Analysis of the expression of GFAP, Iba1 and synaptophysin proteins in the prefrontal cortex revealed no difference caused by neonatal inflammation with LPS nor by treatment with 25H-NBOMe. In conclusion, the study of new drugs and psychotropic substances as potential therapeutic agents in neuropsychiatric disorders needs to be continuously evaluated in order to generate reliable data to find effective and safe doses for clinical studies aimed at treating and managing the symptoms of these disorders.

**Keywords:** Neonatal neuroinflammation. Lipopolysaccharide. Ultrasonic vocalizations. Psychedelics. Hallucinogens.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figura 1 –  | Localização e estrutura da endotoxina LPS.....   | 25 |
| Figura 2 –  | Ativação periférica da resposta imune inata provocada pelo LPS .....   | 26 |
| Figura 3 –  | Sinalização intracelular desencadeada pelo LPS por meio do TLR4.....   | 27 |
| Figura 4 –  | Vias de comunicação aferentes entre a periferia e o SNC.....   | 29 |
| Figura 5 –  | Disfunção da BHE durante a neuroinflamação... ..   | 30 |
| Figura 6 –  | Visão esquemática da comunicação entre neurônios, micróglia e astrócitos.....  | 31 |
| Quadro 1 –  | Associação do LPS com transtornos neuropsiquiátricos de acordo com o período de exposição durante o neurodesenvolvimento ..... | 34 |
| Figura 7 –  | Estrutura química das drogas 2C e suas drogas NBOMes análogas....  | 38 |
| Figura 8 –  | Síntese e liberação de serotonina na fenda sináptica .....   | 41 |
| Figura 9 –  | Efeitos neurotóxicos e neuroprotetores dos metabólitos do TRP.....   | 42 |
| Quadro 2 –  | Grupos experimentais para padronização do modelo de inflamação neonatal.....   | 46 |
| Figura 10 – | Resumo gráfico do delineamento experimental da primeira etapa, em cada dia pós-natal .....                                     | 47 |
| Quadro 3 –  | Grupos experimentais para avaliação do tratamento com 25H-NBOMe .....  | 49 |
| Figura 11 – | Resumo gráfico do delineamento experimental da segunda etapa, em cada dia pós-natal .....                                      | 50 |
| Figura 12 – | Caixa de acrílico individual utilizada para o teste de HTR... ..   | 51 |
| Figura 13 – | Aparatos (cubas de vidro) utilizadas para o teste de comportamento de brincar... ..  | 52 |
| Figura 14 – | Aparato quadrado utilizado no teste de campo aberto.....   | 53 |
| Figura 15 – | Taxa de sobrevivência após a primeira aplicação de LPS .....   | 56 |
| Figura 16 – | Efeito da exposição ao LPS sobre o peso corporal até a puberdade....   | 57 |
| Figura 17 – | Peso corporal de animais expostos ao LPS neonatal no dia do teste de comportamento de brincar (PND33) .....                    | 58 |
| Figura 18 – | Efeito da exposição ao LPS sobre o número de VUS duas horas após a aplicação no PND3... ..                                     | 60 |
| Figura 19 – | Efeito da exposição ao LPS sobre o número de VUS duas horas após   |    |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
|             | a 3 <sup>a</sup> aplicação no PND5.....   | 61 |
| Figura 20 – | Efeito da exposição neonatal ao LPS sobre o número de VUS no dia pós-natal 12 (PND12) em animais machos e fêmeas .....  | 62 |
| Figura 21 – | Efeito da exposição neonatal ao LPS sobre os parâmetros distância percorrida (cm) e tempo de imobilidade (s) no teste de campo aberto no PND30 em animais machos .....  | 64 |
| Figura 22 – | Efeito da exposição neonatal ao LPS sobre os parâmetros distância percorrida (cm) e tempo de imobilidade (s) no teste de campo aberto no PND30 em animais fêmeas .....  | 66 |
| Figura 23 – | Efeito da exposição neonatal ao LPS sobre o comportamento de brincar no PND33 em animais machos .....   | 68 |
| Figura 24 – | Efeito da exposição neonatal ao LPS sobre o comportamento de brincar no PND33 em animais fêmeas .....   | 70 |
| Figura 25 – | Efeito da exposição neonatal ao LPS sobre a quantificação das proteínas GFAP e sinaptofisina em animais machos e fêmeas por <i>Western Blotting</i> .....   | 72 |
| Figura 26 – | Efeito do tratamento agudo com 25H-NBOMe sobre a frequência dos movimentos HTR na peripuberdade em animais machos e fêmeas.....   | 74 |
| Figura 27 – | Efeito do tratamento agudo com 25H-NBOMe sobre o comportamento de brincar na peripuberdade em animais machos.....   | 77 |
| Figura 28 – | Efeito do tratamento agudo com 25H-NBOMe sobre o comportamento de brincar na peripuberdade em animais fêmeas.....   | 79 |
| Figura 29 – | Efeito do tratamento agudo com 25H-NBOMe sobre os parâmetros distância percorrida (cm) e tempo de imobilidade (s) no teste de campo aberto na peripuberdade em animais machos .....                                   | 81 |
| Figura 30 – | Efeito do tratamento agudo com 25H-NBOMe sobre os parâmetros distância percorrida (cm) e tempo de imobilidade (s) no teste de campo aberto na peripuberdade em animais fêmeas.....                                    | 83 |
| Figura 31 – | Efeito do tratamento com 25H-NBOMe sobre a quantificação das proteínas GFAP, Iba1 e sinaptofisina por <i>Western Blotting</i> em animais na peripuberdade machos e fêmeas submetidos à neuroinflamação neonatal ..... | 85 |

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Análise de variância de duas vias sobre o peso corporal em animais machos e fêmeas ao longo dos dias (tempo) e submetidos à administração i.p. de LPS (desafio imunológico).....58
- Tabela 2 – Análise de variância de duas vias sobre o peso corporal em animais machos e fêmeas no PND33 submetidos à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao PND5 (aplicações)... .....59
- Tabela 3 – Análise de variância de duas vias sobre a frequência de vocalizações ultrassônicas em animais machos e fêmeas divididos em grupos quanto à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao PND5 (aplicações), duas horas após a primeira aplicação no PND3 ..... 60
- Tabela 4 – Análise de variância de duas vias sobre a frequência de vocalizações ultrassônicas em animais machos e fêmeas submetidos à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao PND5 (aplicações), duas horas após a terceira aplicação no PND5... ..... 61
- Tabela 5 – Análise de variância de duas vias sobre a frequência de vocalizações ultrassônicas em animais machos e fêmeas no PND12 submetidos à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao PND5 (aplicações)... .....63
- Tabela 6 – Análise de variância de duas vias sobre a distância percorrida e o tempo de imobilidade em animais machos no PND30 submetidos à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao PND5 (aplicações)... ..... 65
- Tabela 7 – Análise de variância de duas vias sobre a distância percorrida e o tempo de imobilidade em animais fêmeas no PND30 submetidas à administração i.p. de LPS (desafio imunológico)

|             |  |    |
|-------------|--|----|
|             | no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao PND5 (aplicações) .....  | 67 |
| Tabela 8 –  | Análise de variância de duas vias sobre os parâmetros do teste de comportamento de brincar em animais machos no PND33 submetidos à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao PND5 (aplicações).....                | 69 |
| Tabela 9 –  | Análise de variância de duas vias sobre os parâmetros do teste de comportamento de brincar em animais fêmeas no PND33 submetidas à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao PND5 (aplicações).....                | 69 |
| Tabela 10 – | Análise de variância de duas vias sobre a quantificação de proteínas por <i>Western Blotting</i> em animais machos e fêmeas no PND33 submetidos à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao PND5 (aplicações)..... | 71 |
| Tabela 11 – | Análise de variância de duas vias sobre a frequência dos movimentos HTR em intervalos de 5 minutos em animais machos submetidos à neuroinflamação neonatal com LPS (desafio imunológico) e tratados com 25H-NBOMe na peripuberdade (tratamento NBOMe).....                                     | 75 |
| Tabela 12 – | Análise de variância de duas vias sobre a frequência dos movimentos HTR em intervalos de 5 minutos em animais fêmeas submetidas à neuroinflamação neonatal com LPS (desafio imunológico) e tratadas com 25H-NBOMe na peripuberdade (tratamento NBOMe).....                                     | 75 |
| Tabela 13 – | Análise de variância de duas vias sobre os parâmetros do teste de comportamento de brincar em animais machos submetidos à neuroinflamação neonatal com LPS (desafio imunológico) e tratados na peripuberdade com 25H-NBOMe (tratamento NBOMe).....   | 78 |
| Tabela 14 – | Análise de variância de duas vias sobre os parâmetros do teste de comportamento de brincar em animais fêmeas submetidas à  |    |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
|             | neuroinflamação neonatal com LPS (desafio imunológico) e tratadas na peripuberdade com 25H-NBOMe (tratamento NBOMe).....   | 78 |
| Tabela 15 – | Análise de variância de duas vias sobre a distância percorrida e o tempo de imobilidade em intervalos de 5 minutos em animais machos submetidos à neuroinflamação neonatal com LPS (desafio imunológico) e tratados na peripuberdade com 25H-NBOMe (tratamento NBOMe)..... | 82 |
| Tabela 16 – | Análise de variância de duas vias sobre a distância percorrida e o tempo de imobilidade em intervalos de 5 minutos em animais fêmeas submetidas à neuroinflamação neonatal com LPS (desafio imunológico) e tratadas na peripuberdade com 25H-NBOMe (tratamento NBOMe)..... | 84 |
| Tabela 17 – | Análise de variância de duas vias sobre a quantificação de proteínas por <i>Western Blotting</i> em animais machos e fêmeas submetidos à neuroinflamação neonatal com LPS (desafio imunológico) e tratados na peripuberdade com 25H-NBOMe (tratamento NBOMe).....          | 86 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                    |   |
|--------------------|---|
| 25H-NBOMe          | 2-(2,5-dimetoxi-fenil)-n-[(2-metoxifenil)metil]etanoamina   |
| 2C                 | 2,5-dimetoxi-fenetilamina   |
| 2C-H               | 4-cloro-2,5-dimetoxi-fenetilamina   |
| 5-HT               | 5-hidroxitriptamina ou serotonina   |
| 5-HT <sub>1</sub>  | receptor de serotonina subtipo 1  |
| 5-HT <sub>2</sub>  | receptor de serotonina subtipo 2  |
| 5-HT <sub>2A</sub> | receptor de serotonina subtipo 2A   |
| Ach                | Acetilcolina  |
| ACTH               | Hormônio adenocorticotrópico  |
| AIDS               | Síndrome da imunodeficiência adquirida  |
| ANOVA              | Análise de variância  |
| AP-1               | Proteína adaptadora 1   |
| BHE                | Barreira hematoencefálica   |
| BMP                | Proteínas morfogênicas do osso  |
| Ca <sup>2+</sup>   | Cálcio  |
| CD14               | Proteína <i>cluster</i> de diferenciação 14   |
| cm                 | Centímetros   |
| COVID-19           | <i>Coronavirus Disease of 2019</i>  |
| COX                | Cicloxigenase   |
| COX-2              | Cicloxigenase 2   |
| CPF                | Córtex pré-frontal  |
| CR3                | Receptor do complemento 3   |
| CRF                | Fator liberador de corticotrofina   |
| CVO                | Órgãos circunventriculares  |
| CXCL12             | Quimiocina 12 de motivo C-X-C   |
| CXCR4              | Receptor de quimiocina C-X-C tipo 4   |
| DA                 | Dopamina  |
| DMSO               | Dimetilsulfóxido  |
| DSM-V              | Manual Diagnostico e Estatístico da Associação Americana de Psiquiatria e Transtornos Mentais 5ª edição |
| EPM                | Erro padrão da média  |
| ERK                | Proteína quinase regulada por sinal extracelular  |

|               |  |
|---------------|--|
| g             | Gramas   |
| GABA          | Ácido gamaaminobutírico                                |
| GC            | Glicocorticóides                                       |
| GFAP          | Proteína ácida fibrilar glial                          |
| HPA           | Hipotálamo-hipófise-adrenal                            |
| HTR           | <i>Head-Twitch Response</i>                            |
| Iba1          | Proteína adaptadora de cálcio ionizada 1               |
| IDO           | Indoleamina 2,3-dioxigenase                            |
| i.p.          | Via intraperitoneal                                    |
| i.v.          | Via intravenosa  |
| IL-1          | Interleucina 1   |
| IL-1 $\beta$  | Interleucina 1 beta                                    |
| IL-2          | Interleucina 2   |
| IL-6          | Interleucina 6   |
| IL-8          | Interleucina 8   |
| IL-12         | Interleucina 12  |
| INF- $\gamma$ | Interferon gama  |
| iNOS          | Óxido nítrico sintase induzido                         |
| IRAK          | Quinase associada ao receptor                          |
| kg            | Quilograma   |
| kHz           | Quilohertz   |
| LBP           | Proteína ligadora de LPS                               |
| LPS           | Lipopolissacarídeo                                     |
| LSD           | Dietilamida do ácido lisérgico                         |
| M             | Molar  |
| MDMA          | 3,4-metilenodioximetanfetamina ou ecstasy              |
| mg            | Miligramas   |
| mg/kg         | Miligramas por quilo                                   |
| ml/kg         | Mililitro por quilo                                    |
| MMP           | Metaloproteinases de matriz                            |
| MyD88         | Proteína adaptadora fator de diferenciação miéloide 88 |
| NBOMe         | N-metoxibenzil   |
| NE            | Noradrenalina  |

|               |   |
|---------------|---|
| NF-k $\beta$  | Fator Nuclear kappa beta                                  |
| ON            | Óxido nítrico   |
| PBS           | Tampão fosfato-salino                                     |
| PG            | Prostaglandinas   |
| PGE2          | Prostaglandina E2   |
| PI3K          | Fosfatidilinositol-3-quinase                              |
| PKC           | Proteína quinase C  |
| PLA           | Fosfolipase A   |
| PLC           | Fosfolipase C   |
| PNDX          | Dia pós-natal X   |
| RAPG          | Receptores acoplados à proteína G                         |
| ROS           | Espécies reativas de oxigênio                             |
| RNS           | Espécies reativas de nitrogênio                           |
| SARS-CoV-2    | <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>    |
| SDF-1         | Fator 1 derivado de células estromais                     |
| SNC           | Sistema Nervoso Central                                   |
| SOD           | Superóxido dismutase                                      |
| TAK-1         | Quinase ativada por TGF- $\beta$ 1                        |
| TDAH          | Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade         |
| TEA           | Transtorno do espectro autista                            |
| TGF $\beta$   | Fator de crescimento transformador beta                   |
| TNF- $\alpha$ | Fator de necrose tumoral alfa                             |
| TLR3          | Receptor <i>toll-like</i> 3                               |
| TLR4          | Receptor <i>toll-like</i> 4                               |
| TRAF6         | Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral 6 |
| TRP           | Aminoácido triptofano                                     |
| VS            | Vesículas sinápticas                                      |
| VUS           | Vocalizações ultrassônicas                                |
| WDS           | <i>Wet Dog Shakes</i>                                     |
| WB            | <i>Western blotting</i>                                   |
| $\beta$ arr2  | $\beta$ -arrestina-2                                      |
| $\mu$ g/kg    | Micrograma por quilo                                      |

## LISTA DE SÍMBOLOS

± Mais ou menos

μ micro

## SUMÁRIO

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>21</b> |
| <b>2</b>     | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | <b>25</b> |
| 2.1          | ENDOTOXEMIA E NEUROINFLAMAÇÃO.....   | 25        |
| 2.2          | NEUROINFLAMAÇÃO NEONATAL E TRANSTORNOS<br>NEUROPSIQUIÁTRICOS RELACIONADOS .....          | 32        |
| 2.3          | SUBSTÂNCIA PSICODÉLICA 25H-NBOMe.....  | 37        |
| <b>3</b>     | <b>JUSTIFICATIVA</b> .....   | <b>43</b> |
| <b>4</b>     | <b>OBJETIVOS</b> .....   | <b>44</b> |
| 4.1          | OBJETIVO GERAL .....   | 44        |
| 4.2          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 44        |
| <b>5</b>     | <b>METODOLOGIA</b> .....   | <b>45</b> |
| 5.1          | ANIMAIS .....  | 45        |
| 5.2          | ACASALAMENTO E PADRONIZAÇÃO DAS NINHADAS .....   | 45        |
| 5.3          | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA PRIMEIRA ETAPA .....  | 46        |
| 5.4          | MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO NEONATAL E GRUPOS<br>EXPERIMENTAIS .....                       | 47        |
| 5.5          | AVALIAÇÃO DA COMUNICAÇÃO.....  | 48        |
| 5.6          | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA SEGUNDA ETAPA .....   | 48        |
| 5.7          | TRATAMENTO COM 25H-NBOMe.....  | 50        |
| 5.8          | TESTES COMPORTAMENTAIS.....  | 50        |
| <b>5.8.1</b> | <b>Teste de contração da cabeça (HTR)</b> .....  | <b>50</b> |
| <b>5.8.2</b> | <b>Comportamento de brincar</b> .....  | <b>51</b> |
| <b>5.8.3</b> | <b>Atividade locomotora e exploratória no campo aberto</b> .....                         | <b>52</b> |
| 5.9          | COLETA E PROCESSAMENTO DE TECIDO CEREBRAL .....  | 53        |
| <b>5.9.1</b> | <b><i>Western Blotting</i></b> .....   | <b>53</b> |
| 5.10         | ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....  | 54        |
| <b>6</b>     | <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>56</b> |
| 6.1          | AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE<br>LPS DURANTE O PERÍODO NEONATAL..... | 56        |
| <b>6.1.1</b> | <b>Taxa de sobrevivência após a aplicação de LPS</b> .....                               | <b>56</b> |

|       |  |           |
|-------|--|-----------|
| 6.1.2 | <b>Peso corporal ao longo do tempo.....</b>  | <b>56</b> |
| 6.1.3 | <b>Número de vocalizações ultrassônicas durante o desafio imunológico.....</b>   | <b>59</b> |
| 6.1.4 | <b>Número de vocalizações ultrassônicas no PND12... ..</b>   | <b>62</b> |
| 6.1.5 | <b>Capacidade locomotora no teste de campo aberto nos animais pré-púberes.....</b>   | <b>63</b> |
| 6.1.6 | <b>Comportamento de brincar nos animais na peripuberdade .....</b>   | <b>67</b> |
| 6.1.7 | <b>Expressão das proteínas GFAP e sinaptofisina no córtex pré-frontal dos animais na peripuberdade por <i>Western Blotting</i> .....</b>   | <b>71</b> |
| 6.2   | <b>INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO AGUDO COM 25H-NBOMe SOBRE O COMPORTAMENTO DE ANIMAIS NA PERIPUBERDADE SUBMETIDOS À NEUROINFLAMAÇÃO NEONATAL.....</b>                                 | <b>73</b> |
| 6.2.1 | <b>Frequência de contrações da cabeça (HTR).....</b>   | <b>73</b> |
| 6.2.2 | <b>Comportamento de brincar.....</b>   | <b>75</b> |
| 6.2.3 | <b>Capacidade locomotora no teste de campo aberto.....</b>   | <b>79</b> |
| 6.3   | <b>INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO AGUDO COM 25H-NBOMe SOBRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE ANIMAIS NA PERIPUBERDADE SUBMETIDOS À NEUROINFLAMAÇÃO NEONATAL .....</b> | <b>84</b> |
| 7     | <b>DISCUSSÃO.....</b>  | <b>87</b> |
| 7.1   | <b>EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE LPS DURANTE O PERÍODO NEONATAL.....</b>   | <b>87</b> |
| 7.2   | <b>INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM 25H-NBOMe SOBRE O COMPORTAMENTO DE ANIMAIS NA PERIPUBERDADE SUBMETIDOS À NEUROINFLAMAÇÃO NEONATAL.....</b>                                       | <b>92</b> |
| 8     | <b>CONCLUSÃO .....</b>   | <b>97</b> |
|       | <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>98</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, muito tem se discutido sobre a alta prevalência de transtornos ou desordens psiquiátricas como a depressão, ansiedade ou autismo, por exemplo. Desde a recente pandemia de COVID-19 causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, a prevalência de desordens mentais aumentou acentuadamente em mais de 200 países, com 53,2 milhões de casos de depressão e 76,2 milhões de casos de ansiedade adicionais devido ao enfrentamento à pandemia (SANTOMAURO *et al.*, 2021). Contudo, não são apenas estressores psicológicos que podem influenciar no surgimento desses transtornos. Influências biológicas, como a genética, estrutura cerebral e funcionamento dos neurotransmissores, também podem predispor indivíduos ao desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos. Nesse contexto, fatores ambientais que afetam o neurodesenvolvimento podem estar relacionados ao surgimento de desordens psicológicas ao longo da vida.

Durante o período perinatal, o sistema nervoso central (SNC) ainda está em desenvolvimento e suscetível a fatores ambientais, como infecções e inflamações. Alguns estudos já mostraram que o sistema imunológico é capaz de modular o desenvolvimento do SNC. Os neurônios, astrócitos e micróglia se comunicam continuamente por meio de citocinas, quimiocinas e neurotransmissores, os quais vêm sendo associados como atuantes no neurodesenvolvimento (BILBO; SCHWARZ, 2013).

Muitas citocinas e quimiocinas são importantes para a manutenção, proliferação e diferenciação de células progenitoras neuronais. A família das citocinas do fator de crescimento transformador beta (TGF $\beta$ ) e das proteínas morfogênicas do osso (BMP) é crítica para a indução neural (GAULDEN; REITER, 2008). As citocinas interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6) demonstraram ter um papel na citogênese no cérebro em desenvolvimento (BOWEN; DEMPSEY; VEMUGANTI, 2011; NAKANISHI *et al.*, 2007).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) liberado por astrócitos promove a transmissão sináptica (STELLWAGEN; MALENKA, 2006). A quimiocina 12 de motivo C-X-C (CXCL12, também chamado fator 1 derivado de células estromais, SDF-1) e seu receptor de quimiocina C-X-C tipo 4 (CXCR4) guiam a migração de novos neurônios em muitas regiões cerebrais (MA *et al.*, 1998).

Além disso, as células microgliais também são necessárias durante o período de neurodesenvolvimento. As micróglia são as principais células fagocíticas do SNC e, portanto, têm um papel importante na fagocitose de detritos apoptóticos após a morte celular programada, um processo que ocorre continuamente e mais abundantemente no cérebro em

desenvolvimento (FERRER; SERRANO; SORIANO, 1990). Quando as proteínas do sistema complemento C1q e C3 marcam sinapses para eliminação, a micróglia reconhece essas proteínas via receptor do complemento 3 (CR3) e fagocita as sinapses marcadas como um mecanismo de poda sináptica (SCHAFER *et al.*, 2012). Sendo assim, insultos inflamatórios ou infecciosos durante essa fase crítica do neurodesenvolvimento podem ser capazes de modular a neurogênese e/ou contatos sinápticos, e isso pode influenciar o comportamento do indivíduo ao longo da vida.

As consequências da neuroinflamação, tanto imediatas quanto duradouras, têm sido avaliadas em modelos pré-clínicos com roedores baseados na administração sistêmica ou intracerebral de lipopolissacarídeo (LPS) (PANG *et al.*, 2003; PANG *et al.*, 2016). O LPS é o principal componente molecular da parede celular de bactérias gram negativas, sendo considerado uma endotoxina. Apesar de uma endotoxina não ser capaz de causar uma infecção por não ser um microrganismo vivo, já é estabelecido que a administração de LPS mimetiza alterações fisiológicas e comportamentais geralmente causadas por uma infecção bacteriana Gram negativa (ALEXANDER; RIETSCHHEL, 2001), a qual possui alta prevalência nos períodos pré-natal e neonatal. Além disso, durante os processos inflamatórios desencadeados pelo LPS, a microglia residente é ativada, o que leva à neuroinflamação e contribui para a lesão cerebral (MICHELS *et al.*, 2014). Essa neuroinflamação está associada à disfunção cerebral aguda e complicações neurológicas a longo prazo que incluem déficits cognitivos, esquizofrenia, depressão, ansiedade e transtorno do espectro autista (ADAM *et al.*, 2013; PANG *et al.*, 2016; TISHKINA *et al.*, 2016; WALKER *et al.*, 2009; WISCHHOF *et al.*, 2015).

Apesar de a inflamação e a disfunção sináptica estarem entre os sintomas iniciais da maioria dos transtornos neurológicos (HENSTRIDGE *et al.*, 2016; LENG, 2020; WYSS-CORAY; MUCKE, 2002), os mecanismos associados à regulação da atividade neuronal pela neuroinflamação associada à micróglia, e consequentemente as interações neuroimunes, ainda não foram completamente elucidados. A modelação sináptica realizada pela micróglia sobre a sinapse tem um papel importante durante o desenvolvimento pós-natal e déficits nessa regulação microglial podem contribuir para anormalidades sinápticas encontradas em algumas desordens do neurodesenvolvimento (PAOLICELLI *et al.*, 2011). Essa modulação sináptica microglial deficiente no córtex pré-frontal de animais *knockout* foi associada à transmissão sináptica prejudicada, diminuição da conectividade funcional cerebral, déficits na interação social e aumento de comportamento repetitivo fenotípico, os quais foram correlacionados ao transtorno do espectro autista (TEA) e outros transtornos do

neurodesenvolvimento e neuropsiquiátricos (ZHAN *et al.*, 2014). Já em modelos de inflamação no período pré-natal induzidos por uma dose alta de LPS, foi observado um aumento dos níveis da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), a qual é um marcador de astrócitos reativos envolvidos no funcionamento da barreira hematoencefálica (BHE), vias de transdução de sinais e interações neurônio-glia (MIDDELDORP, 2011) em várias regiões cerebrais, mostrando que os prejuízos no cérebro da prole podem se manter a longo prazo após o insulto pré-natal inicial (BOKSA, 2010).

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. Proteínas envolvidas na modificação da plasticidade sináptica têm sido utilizadas como marcadores de densidade sináptica, que é um fator importante no desenvolvimento da plasticidade (CHAUDHURY *et al.*, 2016). Entre os reguladores da transmissão sináptica, encontram-se as proteínas sinapsina, sinaptotagmina e sinaptofisina, as quais fazem parte do processo de fusão das vesículas sinápticas (VS), permitindo liberação de neurotransmissores nos terminais sinápticos (XU *et al.*, 2017; SONG; AUGUSTINE, 2015; MILNER *et al.*, 2014) e são relevantes já que poderiam ter um papel no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (BERECZKI *et al.*, 2018).

A sinapsina está envolvida no acoplamento das VS ao citoesqueleto pré-sináptico, formado por filamentos de actina e microtúbulos (ROSAHL *et al.*, 1995). Após o potencial de ação e o influxo de cálcio ( $Ca^{2+}$ ), a sinapsina é fosforilada por proteínas quinases, o que causa o enfraquecimento da sua ligação ao citoesqueleto e permite a mobilização das VS para o ancoramento na membrana pré-sináptica (LLINAS *et al.*, 1991). As sinaptotagminas são proteínas superficiais das VS envolvidas no processo de ancoramento das mesmas. A sinaptotagmina está envolvida na ligação aos íons  $Ca^{2+}$  e em estabilizar as VS no estado ancorado na vesícula pré-sináptica, sendo essencial para a liberação rápida de neurotransmissores (GEPPERT *et al.*, 1994; SEAGAR; TAKAHASHI, 1998; REIST *et al.*, 1998). A sinaptofisina ainda não tem um papel específico muito bem estabelecido, mas, por ser uma proteína vesicular integral, ela é frequentemente utilizada como marcador de integridade e plasticidade sináptica (MORGAN, 2009).

Recentemente, diferentes pesquisas têm sido desenvolvidas testando o efeito de drogas psicodélicas (isso é, que causam alucinações), geralmente utilizadas de maneira recreacional, de modo a avaliar o potencial terapêutico que essas possam vir a ter em transtornos neuropsiquiátricos. O termo “psicodélico” foi cunhado em 1957 por Humphrey

Osmond para uma classe de medicamento capaz de produzir mudanças profundas no pensamento, humor e percepção (OSMOND, 1957). Modelos humanos de terapia assistida por psicodélicos mostram que a experiência psicodélica produzida por essas substâncias parece produzir alterações positivas no comportamento e humor, sendo frequentemente compreendidas de maneira mística, modificando o pensamento e as ações dos usuários (MORAIS, 2019). Um exemplo é a psilocibina que tem sido utilizada para o tratamento da ansiedade diante da morte, cefaleias, transtorno obsessivo-compulsivo, tabagismo e depressão (FARIA, 2017; GRIFFITHS *et al.*, 2016; ROSS *et al.*, 2016).

O motivo pelo qual essa classe de drogas é utilizada como droga de abuso são os efeitos psicotrópicos que possuem. As drogas psicotrópicas são aquelas que agem principalmente no sistema nervoso central, onde alteram a função cerebral e mudam a percepção, o humor, o comportamento e a consciência, modificando a maneira de sentir, de pensar e, muitas vezes, de agir. São relatados capacidade aumentada de comunicabilidade, empatia e autoconhecimento, os quais são efeitos descritos para a grande maioria das drogas que atuam como agonistas dos receptores 5-hidroxitriptamina subtipo 2A (5-HT<sub>2A</sub>), modulando a neurotransmissão serotoninérgica (VOLLENWEIDER, 2020). Esses receptores, localizados por todo o encéfalo, porém em maior densidade no córtex, possuem grande afinidade por várias classes de drogas psicotrópicas, e o potencial alucinógeno dessas drogas está diretamente relacionado ao grau de afinidade que elas possuem pelo receptor (EGAN *et al.*, 1998). Entretanto, a ativação de receptores 5-HT<sub>2A</sub> por meio de psicodélicos pode desencadear efeitos neuromoduladores, modificando rapidamente a dinâmica neural, e melhorando o quadro de pacientes com diferentes formas de depressão e neurose, por exemplo (RUCKER *et al.* 2016; VOLLENWEIDER, 2020).

Atualmente, uma nova classe de psicotrópicos sintéticos denominada NBOMe [drogas com radical N-metoxibenzil análogas as drogas da família 2C (2,5-dimetoxi-fenetilamina)] tem surgido e, oportunamente, se tornou alvo de estudos. Essa nova droga possui propriedades psicodélicas e seu estudo se mostrou de grande importância, principalmente pela associação com casos de intoxicação e até mesmo morte desde seu aparecimento (ANDREASEN *et al.*, 2015). É interessante e importante investigar os potenciais efeitos neuromoduladores de substâncias psicotrópicas, tais como a 25H-NBOMe [2-(2,5-dimetoxi-fenil)-n-[(2-metoxifenil)metil]etanoamina], em diferentes transtornos neuropsiquiátricos. Até o momento, este foi o primeiro estudo na literatura a avaliar o potencial terapêutico da substância psicodélica 25H-NBOMe em um modelo animal de neuroinflamação neonatal induzida por LPS, no que diz respeito ao comportamento social.

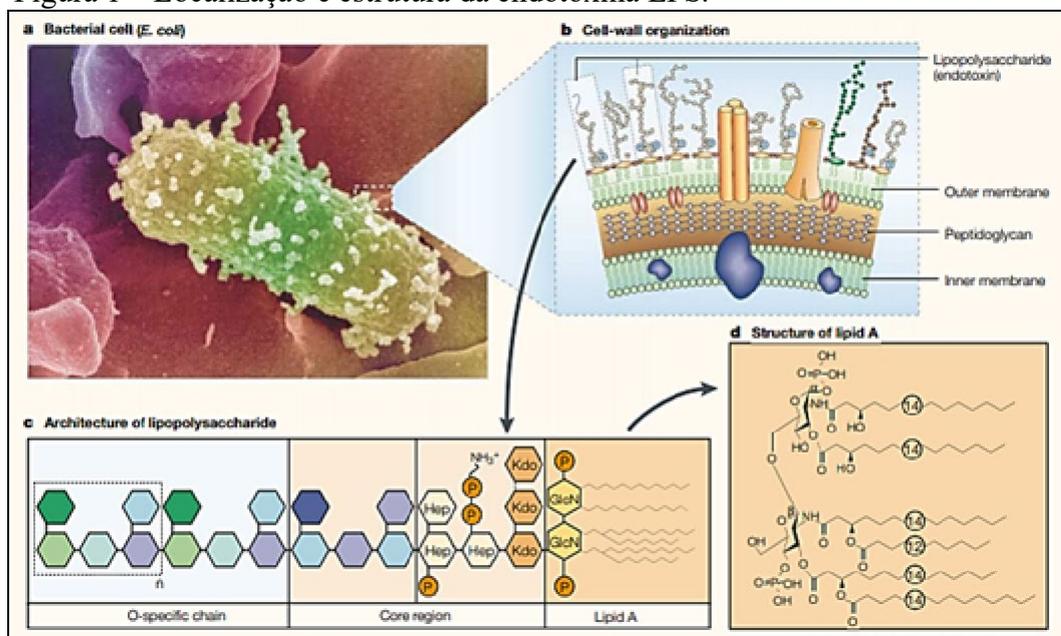
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir, são revisados tópicos relevantes para a compreensão deste trabalho.

### 2.1 ENDOTOXEMIA E NEUROINFLAMAÇÃO

As endotoxinas são componentes externos presentes na parede celular bacteriana. Dentre elas, o lipopolissacarídeo (LPS) é o principal componente molecular da parede celular de bactérias gram negativas, tais como a *Escherichia coli*. A presença destes componentes moleculares bacterianos na corrente sanguínea é denominada endotoxemia, a qual é capaz de mimetizar uma resposta imune inflamatória aguda no hospedeiro (SILVA *et al.*, 2004; SCHEDLOWSKI; ENGLER; GRIGOLEIT, 2014). A administração sistêmica de LPS é amplamente utilizada em modelos pré-clínicos para simular uma ativação do sistema imunológico. Além da praticidade e reprodutibilidade em muitas espécies animais, este modelo permite padronizar doses e simular muitos efeitos observados em pacientes sob processos inflamatórios-infecciosos (REIS *et al.*, 2022; SCHEDLOWSKI; ENGLER; GRIGOLEIT, 2014).

Figura 1 – Localização e estrutura da endotoxina LPS.



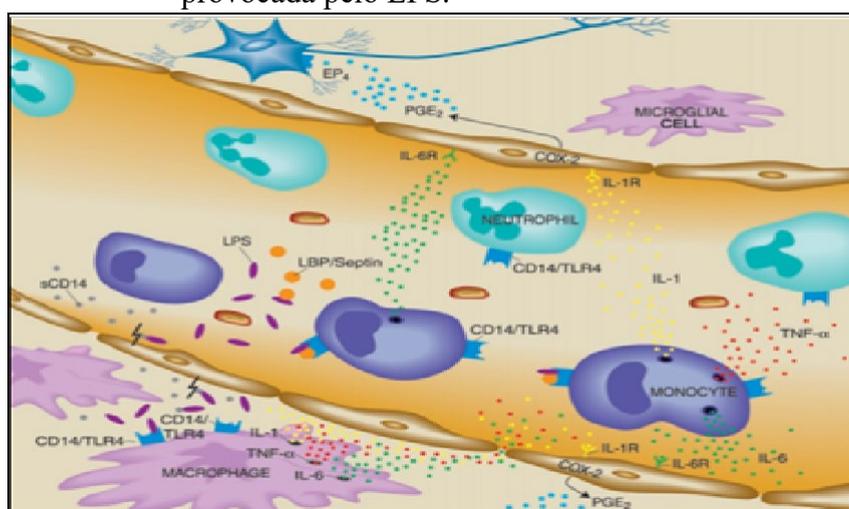
Fonte: adaptado de BEUTLER; RIETSCHER, 2003.

Nota: (A) micrografia eletrônica da bactéria *Escherichia coli*. (B) representação esquemática da parede celular bacteriana e localização do LPS. (C) arquitetura e divisão estrutural do LPS. (D) estrutura primária do componente lipídico A, responsável pela ancoragem do LPS na célula imunológica.

Estruturalmente, o LPS é constituído pelo antígeno-O, oligossacarídeos e componentes do lipídio A (figura 1). O antígeno-O, cuja localização se dá na parte mais externa e hidrofílica da membrana, é composto por 40 unidades repetitivas de fosfolipídios, as quais são responsáveis pela especificidade sorológica das bactérias. Os oligossacarídeos (ou *core*) estão localizados no centro da molécula de LPS. Este componente se liga ao antígeno-O na sua porção externa, e ao lipídio A por meio da sua porção interna. Finalmente, o lipídio A é um componente glicofosfolípideo capaz de ancorar a molécula de LPS na membrana externa das células do sistema imunológico. Sendo assim, é a região responsável por desencadear perifericamente a resposta inflamatória no hospedeiro (MANSOUR; HASSAN; GEORGY, 2017; SU; DING, 2015).

Quando o LPS se encontra na corrente sanguínea do hospedeiro, ele se liga a uma lipoproteína de alta densidade produzida no fígado para ser transportado, a LBP (proteína ligadora de LPS, ou *lipopolysaccharide binding protein*). Essa ligação forma o complexo LPS:LBP, que é reconhecido por receptores CD14 (proteína *cluster* de diferenciação 14) presentes nas membranas de macrófagos, monócitos e neutrófilos circulantes, iniciando a ativação celular (figura 2) (FENTON; GOLENBOCK, 1998; ADEREM; ULEVITCH, 2000; MIYAKE, 2003).

Figura 2 – Ativação periférica da resposta imune inata provocada pelo LPS.

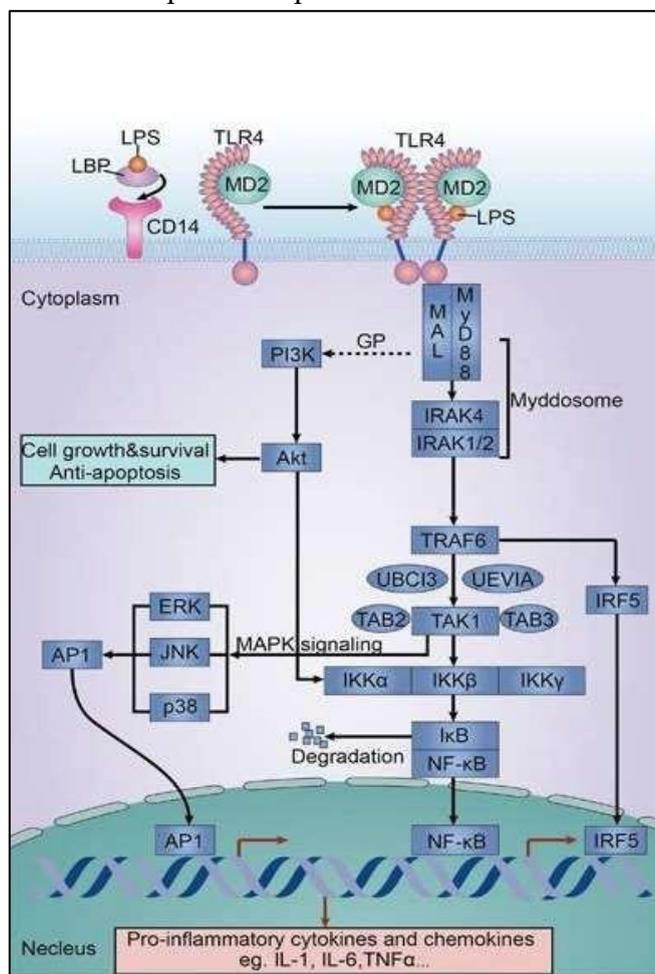


Fonte: HANG; RIVEST, 2003.

Nota: liberação de citocinas por monócitos e neutrófilos circulantes e macrófagos teciduais após exposição ao LPS. A proteína LBP liga-se ao LPS formando um complexo que ativa diferentes células por meio da ligação aos receptores CD14 e TLR4. O complexo LPS:LBP é capaz de ativar células de origem mielóide (neutrófilos, monócitos, macrófagos e micróglia), as quais iniciam a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como: IL-1, TNF e IL-6.

O novo complexo LPS:CD14 ativa a sinalização do receptor semelhante ao Toll-4 (ou *toll-like receptor*, TLR4), ao qual é complexada à proteína MD-2, gerando o sinal transmembrana para o núcleo (figura 3). Esse sinal ativa uma cascata intracelular através da fosforilação de diversas proteínas, incluindo MyD88, IRAK, TRAF6, TAK-1, quinase I $\kappa$ B, AP-1, dentre outras (algumas ainda não elucidadas), culminando na ativação do fator nuclear de transcrição *kappa* beta (NF- $\kappa$ B), envolvido na plasticidade, desenvolvimento e neurodegeneração em neurônios e células da glia (ADEREM; ULEVITCH, 2000; HARJU *et al.*, 2005; HAVA *et al.*, 2006; ROMERO *et al.*, 2007).

Figura 3 – Sinalização intracelular desencadeada pelo LPS por meio do TLR4.



Fonte: YANG *et al.*, 2016.

Nota: o complexo LPS:LBP é reconhecido por receptores de membrana CD14. A proteína MD2 é necessária para que o receptor TLR4 reconheça e se ligue ao LPS e desencadeie uma cascata intracelular de fosforilação de proteínas sinalizadoras, terminando na ativação e translocação nuclear do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Este, por sua vez, contribui para a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ .

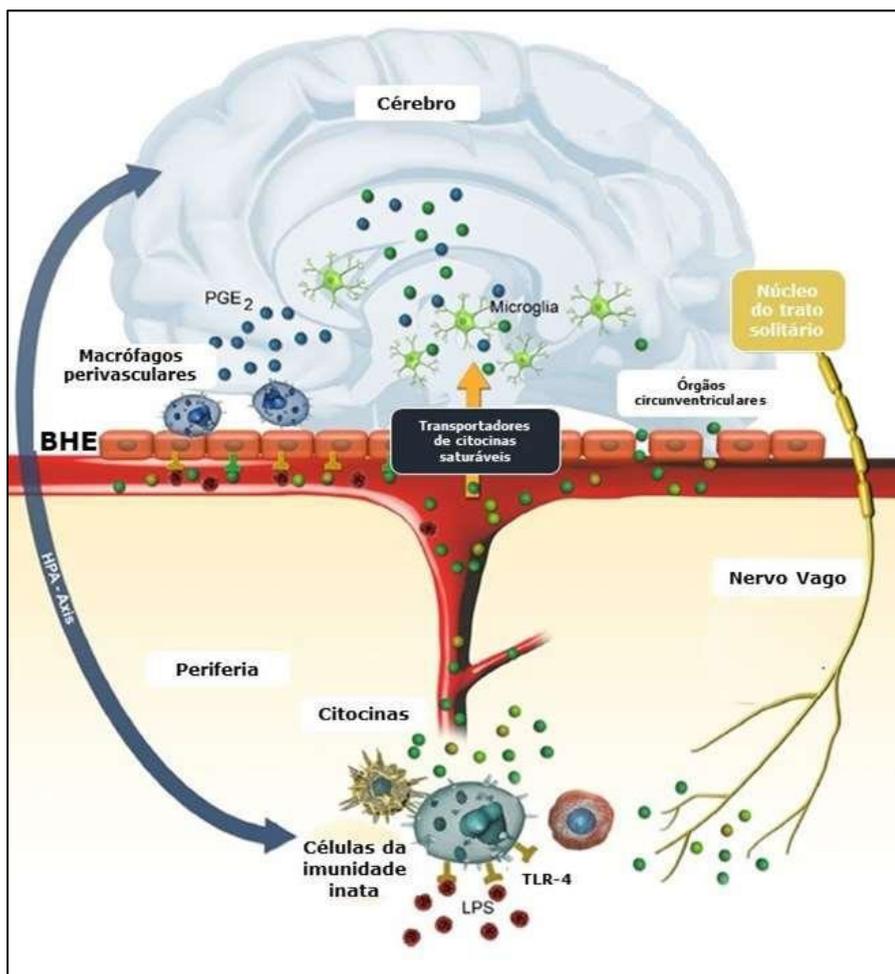
Uma vez ativado, o NF- $\kappa$ B ativa a transcrição de genes que codificam diferentes mediadores pró-inflamatórios envolvidos na defesa contra a infecção, tais como: quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), óxido nítrico (ON), superóxido dismutase (SOD), ciclooxigenase (COX), prostaglandinas (PGs), interferons gama (INF- $\gamma$ ) e citocinas pró-inflamatórias, em especial IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (FLORES-MARTINEZ *et al.*, 2018; GALIC; RIAZI; PITTIMAN, 2012).

As citocinas fazem parte das principais vias de sinalização entre a periferia e o SNC, as quais incluem vias humorais e neurais (figura 4). Devido ao seu peso molecular relativamente alto, as citocinas não são capazes de atravessar a barreira hemato encefálica (BHE). Entretanto, em estruturas localizadas fora da BHE, como os órgãos circumventriculares (CVO) e o plexo coroide, as citocinas podem adentrar o SNC por difusão (ROTH *et al.*, 2004). Em áreas encefálicas que possuem BHE, transportadores de citocinas saturáveis no endotélio cerebral promovem o transporte ativo dessas citocinas (BANKS, 2006).

A via neural ignora a BHE por meio da ativação de nervos aferentes induzida pelas citocinas, principalmente pelo nervo vago (figura 4). Nervos aferentes vagais se projetam para o núcleo do trato solitário, de onde o sinal é encaminhado para outras regiões encefálicas (BLUTHE *et al.*, 1994). Tanto as vias neurais quanto as humorais possuem um papel importante na comunicação entre o sistema imune e o SNC e uma via não é capaz de compensar a ausência da outra (DANTZER *et al.*, 2000). Outra via humoral relacionada ocorre pela recepção e transmissão de sinais inflamatórios pelas células endoteliais encefálicas e macrófagos perivasculares interagindo entre si para liberarem prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (figura 4). Ela então ativa neurônios em diferentes núcleos do tronco encefálico que se projetam para outras regiões cerebrais, levando a alteração da regulação da temperatura e ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (HOPKINS, 2007; SERRATS *et al.*, 2010). As citocinas e a PGE<sub>2</sub> também ativam a micróglia, a qual pode levar ao aumento da modulação da neuroinflamação por meio da liberação de mediadores inflamatórios (HANNESTAD *et al.*, 2012a; HOPKINS, 2007; YIRMIYA; GOSHEN, 2011). Em condições clínicas como a sepse ou neuroinflamação, a BHE pode perder sua integridade estrutural e se tornar permeável a citocinas e células imunológicas periféricas (BANKS, 2006; ENGELHARDT, 2006).

A perda da integridade da BHE é a principal razão para a origem da disfunção cerebral induzida pelo LPS. Isso ocorre devido ao aumento da atividade de proteínas que constituem a BHE, como as metaloproteinases de matriz (MMP), as quais desagregam as células endoteliais culminando no rompimento da barreira. A falha da BHE acarreta distúrbios

Figura 4 – Vias de comunicação aferentes entre a periferia e o SNC.



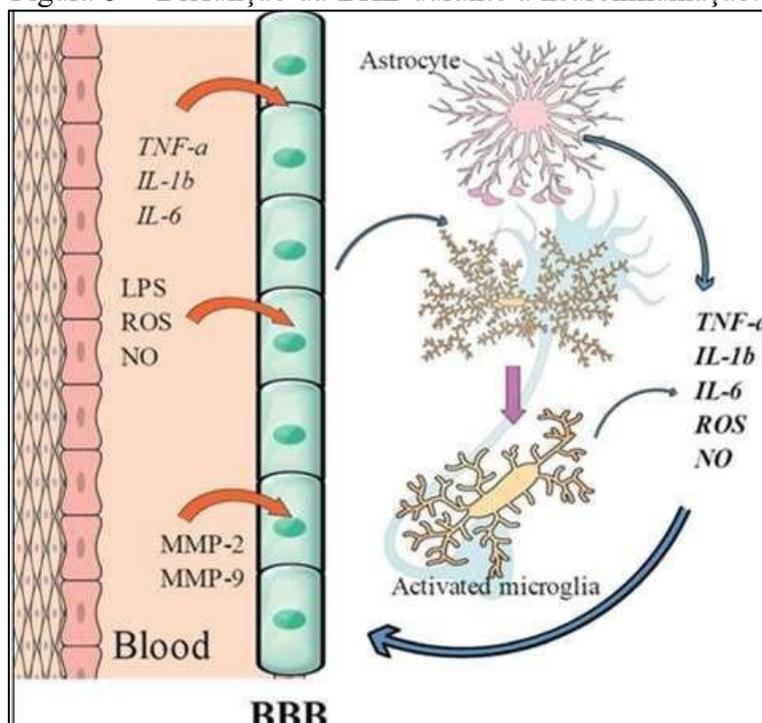
Fonte: adaptado de SCHEDLOWSKI *et al.*, 2014.

Nota: o LPS interage com os receptores TLR4 na membrana das células imunes inatas, desencadeando a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias na circulação sanguínea. As citocinas interagem com o SNC por meio de diferentes vias de sinalização: por transportadores específicos presentes no endotélio da BHE, pelos órgãos circunventriculares, via nervo vago e por receptores TLR4 presentes nas células cerebrais.

homeostáticos iônicos e leva à perda da seletividade e capacidade de impedir a entrada de componentes bacterianos como o LPS e mediadores inflamatórios presentes na circulação sistêmica (BARICHELLO *et al.*, 2021; COMIM *et al.*, 2015). A ruptura da BHE e a presença de fatores deletérios no SNC ativam as células gliais via receptor TLR4, as quais também iniciam o processo de produção e liberação de moléculas inflamatórias e oxidativas (figura 5).

A liberação de citocinas pelos astrócitos e microglia usualmente trata-se de um processo favorável, cujo propósito é proteger o sistema nervoso contra ameaças potencialmente deletérias. Entretanto, durante a neuroinflamação ocorre uma produção exacerbada de fatores pró-inflamatórios e oxidantes pelas células gliais, os quais contribuem

Figura 5 – Disfunção da BHE durante a neuroinflamação.



Fonte: adaptado de DANIELSKY *et al.*, 2018.

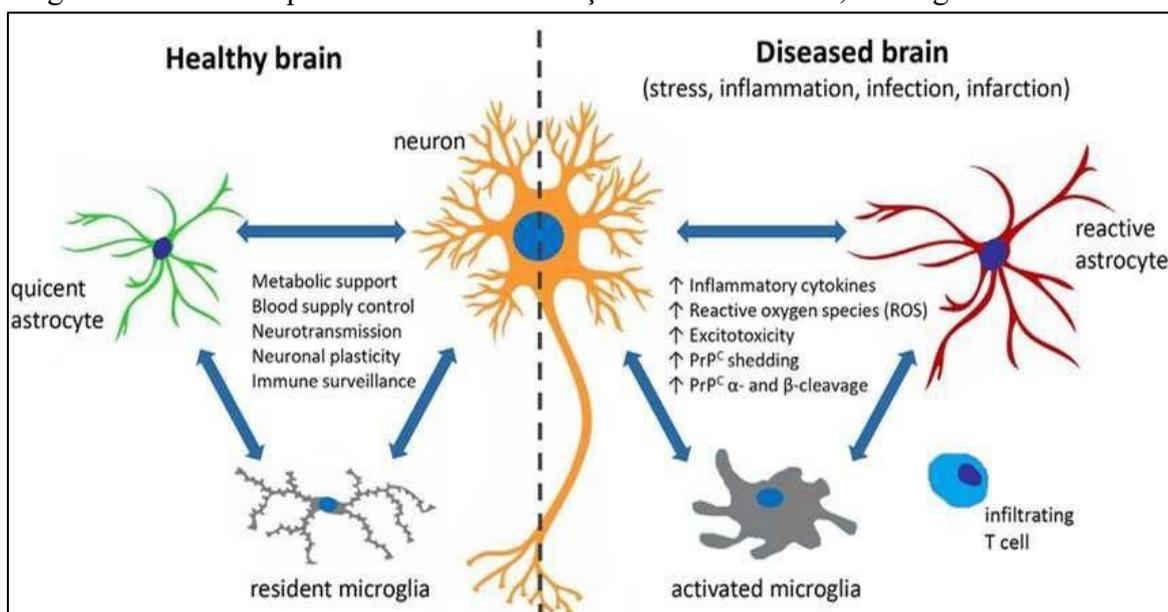
Nota: o LPS e as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6 atuam na BHE ativando suas células, levando ao comprometimento da homeostase e o consequente aumento da permeabilidade. Além disso, esses mediadores ativam as MMP 2 e 9 que quebram as junções entre as células da BHE, a qual perde sua seletividade e passa a permitir a entrada de mediadores periféricos pró- inflamatórios, além do próprio LPS. Essas moléculas então ativam as células gliais (microglia e astrócitos), as quais tentam proteger o SNC de insultos, porém acabam exacerbando a resposta inflamatória liberando ainda mais mediadores pró-inflamatórios e pró-oxidantes.

para o desenvolvimento de uma neuroinflamação crônica e conseqüentemente, no avanço do rompimento da BHE (DANIELSKY *et al.*, 2018; MORAES *et al.*, 2014).

Os astrócitos são células morfológicamente complexas caracterizadas por uma arborização intrincada e por especializações anatômicas que fornecem suporte estrutural e funcional para a BHE, sinapses neuronais, vasos sanguíneos e outras células presentes no SNC (figura 6). A participação dos astrócitos nos mecanismos ligados a neuroinflamação e quebra da BHE ocorre por causa de sua reatividade, caracteristicamente denominada astrogliose (LINNERBAUER; WHEELER; QUINTANA, 2020; YANG; WANG, 2015).

A reatividade astrogliosa é uma das alterações morfológicas observadas durante a neuroinflamação e é classificada de acordo com as propriedades morfológicas e severidade do processo neuroinflamatório desencadeado. A regulação positiva dos filamentos de proteínas intermediárias do citoesqueleto dos astrócitos é uma ferramenta útil para classificar a

Figura 6 – Visão esquemática da comunicação entre neurônios, micróglia e astrócitos.



Fonte: adaptado de SALVESEN; TATZELT; TRANULIS, 2018.

Nota: esquema representativo da comunicação entre neurônios, micróglia e astrócitos no SNC em condições fisiológicas (esquerda) e patológicas (direita). Os astrócitos e a micróglia residentes participam da manutenção da homeostase e da atividade neuronal em condições fisiológicas. Diferentes condições patológicas podem levar à ruptura desta homeostase e causar dano neuronal através da inflamação.

astroglíose. A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é o principal componente dos filamentos intermediários astrocíticos e, portanto, é considerada um marcador específico para astrócitos reativos. A sua expressão aumentada está relacionada ao aumento da síntese de mediadores pró-inflamatórios e oxidantes no cérebro, e à formação de processos astrocíticos estendidos, os quais induzem a morte neuronal (MESSING; BRENNER, 2020; SOFRONIEW, 2015; YANG; PEKNY; PEKNA, 2014; HOL; PEKNY, 2015).

A micróglia são células mielóides semelhantes aos macrófagos residentes no SNC, sendo cruciais para o desenvolvimento e homeostase (figura 6). Com seus processos celulares altamente móveis, a micróglia supervisiona o seu microambiente, atuando não apenas como a primeira linha de defesa, mas também auxiliando na regulação da atividade neuronal (BADIMON *et al.*, 2020; NIMMERJAHN *et al.*, 2005). Já foi estabelecido que a molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1 (Iba1, do inglês *ionized calcium binding adaptor molecule 1*) é especificamente expressa nas células microgliais, e que possui um papel regulador da função microglial, sendo mais expressa na célula microglial ativada (IMAI *et al.*, 1996; ITO *et al.*, 1998). Além disso, essas células possuem um papel importante na patogênese associada à inflamação em diversas doenças neurodegenerativas (BJORKQVIST *et al.*, 2008; LOPES; SPARKS; STREIT, 2008).

Em geral, as células da glia e os neurônios expressam receptores de citocinas em várias regiões encefálicas (AVITSUR; YIRMIYA, 1999). Devido a isso, as citocinas são capazes de modular neurotransmissores centrais como a dopamina (DA), serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), noradrenalina (ou norepinefrina, NE), ácido gama-aminobutírico (GABA), acetilcolina (Ach), neuropeptídeos, dentre outros. Essa modulação ocorre por atuarem sobre a diferenciação, crescimento e migração neuronal para seus alvos, modificando assim a plasticidade sináptica (LORTON *et al.*, 2006; MCAFOOSE; BAUNE, 2009). Entretanto, as citocinas também podem causar efeitos deletérios no SNC, como a morte celular durante o neurodesenvolvimento (DUNN, 2006; HAVA *et al.*, 2006). Além disso, as citocinas são capazes de ativar o eixo HPA, levando à liberação do fator liberador de corticotrofina (CRF) pelo hipotálamo, o qual estimula a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ou corticotrofina, ACTH) pela glândula hipófise, que finalmente estimula a liberação e aumento de glicocorticóides (GC) na corrente sanguínea periférica pelas glândulas adrenais. Os GC têm função basal de atenuar a ativação do sistema imune, porém, em níveis elevados no SNC e em exposições crônicas, eles podem causar efeitos deletérios como a morte neuronal (SAPOLSKY, 2000). Dentre os GC, destaca-se o cortisol em humanos (e corticosterona em ratos), o qual é considerado um marcador biológico de estresse e ansiedade (SAHU *et al.*, 2022).

Portanto, existem diversas vias de atuação nas quais as citocinas podem causar efeitos neuroimunomoduladores. Levando em consideração o delicado processo de neurogênese e desenvolvimento do SNC no início da vida, essa neuroimunomodulação pode estar relacionada a diversos transtornos neuropsiquiátricos, fazendo com que seja de extrema importância estudos de correlação entre neuroinflamação e tais transtornos.

## 2.2 NEUROINFLAMAÇÃO NEONATAL E TRANSTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS RELACIONADOS

A ativação do sistema imunológico no período perinatal regula a programação do desenvolvimento do SNC e é capaz de influenciar o comportamento na vida adulta. A intercomunicação neuroimune é tão significativa que diferentes modelos de ativações imunológicas neonatais influenciam o SNC e comportamento na idade adulta, podendo gerar alterações neurobiológicas que resultam na amplificação de reações inflamatórias sistêmicas ao longo da vida (YANG *et al.*, 2016) ou predispondo o indivíduo a transtornos neuropsiquiátricos como esquizofrenia ou autismo (BROWN *et al.*, 2004; SHI *et al.*, 2003; PANG *et al.*, 2016; RANTAKALLIO *et al.*, 1997).

As adversidades enfrentadas pelo sistema imunológico em neonatos podem contribuir para o desenvolvimento de anormalidades comportamentais e transtornos neuropsiquiátricos. Em roedores neonatos, infecções bacterianas ou a exposição ao LPS são capazes de produzir efeitos a longo prazo em diferentes funções cerebrais. Além disso, pode haver períodos críticos durante os quais o desafio imunológico deve ocorrer, resultando em efeitos comportamentais específicos. A variação do dia pós-natal, da dose de LPS utilizada, da via de administração e do número de repetições durante a primeira infância em roedores adolescentes ou adultos causam efeitos no SNC com gravidades variadas e as consequências podem ser bastante diversas (quadro 1).

Os dias pós-natais (PND) de 1 a 3 em roedores representam as semanas de gestação 23 a 32 em humanos, os quais são caracterizados pelo desenvolvimento do sistema imune e estabelecimento da BHE. Em contraste, durante os PND 5 a 10, o sistema imune ainda está sendo consolidado, enquanto as densidades axonal e dendrítica aumentam e a gliogênese está em pico (SEMPLE *et al.*, 2013). Portanto, o dia neonatal de exposição ao LPS pode ser relevante para as diferenças comportamentais e moleculares observadas em diferentes fases da vida.

Estudos em modelos animais fornecem um apoio convincente para o crescente corpo de evidências epidemiológicas de que as etiologias de algumas doenças psiquiátricas em seres humanos são de origem neurodesenvolvimental. Os transtornos neuropsiquiátricos associados ao desafio imune com LPS durante o neurodesenvolvimento são transtorno do espectro autista (TEA), esquizofrenia, depressão e transtornos de ansiedade.

O Manual Diagnóstico e Estatístico da Associação Americana de Psiquiatria e Transtornos mentais (DSM-V, 2014) é um dos sistemas mais amplamente utilizados para classificar transtornos mentais e fornece critérios diagnósticos padronizados. Segundo o DSM-V, as principais características do TEA seguem os critérios: (A) prejuízo persistente na comunicação social recíproca e na interação social, (B) padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades, (C) sintomas apresentados desde o início da infância e (D) limitação ou prejuízo do funcionamento diário. A incidência de TEA alcança cerca de 1% da população, sendo que o diagnóstico é quatro vezes maior no sexo masculino que no feminino (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Apesar de décadas de pesquisa, muito pouco se sabe sobre a etiologia e/ou fisiopatologia do TEA, que parece ser o resultado da combinação de fatores ambientais, culturais, neurológicos, imunológicos e genéticos. Seu diagnóstico é complexo devido à ausência de sintomas exclusivos do transtorno e pelas diferentes manifestações em relação à severidade e

Quadro 1 - Associação do LPS com transtornos neuropsiquiátricos de acordo com o período de exposição durante o neurodesenvolvimento

| Período de Exposição (PND - dia pós-natal) e animais utilizados | Dose de LPS    | Alterações Observadas   | Transtorno Neuropsiquiátrico associado | Autores                       |
|---|----------------|---|--|-------------------------------|
| PND 3, ratos  | 1 mg/kg        | Fenótipos mistos microgliais (M1, M2)<br>↓ comunicação<br>↓ interação<br>Déficits cognitivos                                    | Autismo                                | PANG <i>et al.</i> , 2016     |
| PND 5, ratos  | 1 mg/kg        | ↑ TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS<br>Hipomielinização<br>Lesão no desenvolv. subst. branca                            | Autismo                                | PANG <i>et al.</i> , 2003     |
| PND 3 e 5, ratos  | 50 $\mu$ g/kg  | ↑ comportamentos de ansiedade<br>↑ corticosterona   | Ansiedade                              | WALKER <i>et al.</i> , 2009   |
| PND 3 e 5, ratos  | 50 $\mu$ g/kg  | ↑ estresse oxidativo<br>↓ interação social  | Depressão                              | MACRAE <i>et al.</i> , 2015   |
| PND 3 e 5, ratos  | 50 $\mu$ g/kg  | ↑ comportamentos de ansiedade e depressão<br>↑ corticosterona<br>Comprometimento no eixo HPA e HC (neuroplasticidade e memória) | Depressão                              | TISHKINA <i>et al.</i> , 2016 |
| PND 3 e 10, camundongos   | 100 $\mu$ g/kg | ↓ TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10<br>↑ Neutrófilos  |  | BARTH <i>et al.</i> , 2016    |
| PND 4 a 6, camundongos  | 6 mg/kg        | ↓ peso corporal e cerebral<br>Hipoplasia cerebelar<br>Perda neuronal<br>Mielinização retardada                                  |  | CARDOSO <i>et al.</i> , 2015  |
| PND 7 e 9, ratos  | 500 $\mu$ g/Kg | ↓ Parvalbumina hipocampo  | Esquizofrenia                          | JENKINS <i>et al.</i> , 2009  |
| PND 10, ratos   | 100 $\mu$ g/kg | ↑ peso corporal<br>↑ ingestão de alimento<br>↑ leptina sérica<br>↓ citocinas HT   | Depressão                              | IWASA <i>et al.</i> , 2010    |
| PND 14, ratos   | 100 $\mu$ g/kg | ↑ IL-6 sérica<br>↑ cox-2 HT   | Depressão                              | KENTNER <i>et al.</i> , 2010  |

Fonte: adaptado de CUSTÓDIO, 2017.

variedade de sinais e sintomas (BARAHONA-CORRA; FILIPE, 2016; SCHWARZ *et al.*, 2011; LANDRIGAN *et al.*, 2010). Dentre os fatores ambientais que podem aumentar a incidência do autismo, existe a neuroinflamação (BERNARDI *et al.*, 2012; ZILBOVICIUS *et al.*, 2006). Em humanos, níveis elevados de citocinas anti e pró-inflamatórias foram encontrados em alguns pacientes autistas em algumas regiões cerebrais. As citocinas pró-inflamatórias resultariam em ativação microglial e neuroinflamação, e de fato, foi observada

uma ativação de células da glia no cérebro e no líquido cérebro-espinhal (PARDO *et al.*, 2005). Além disso, um grupo de pacientes autistas mostrou uma elevação nos níveis de TNF- $\alpha$  no soro e líquido cérebro-espinhal, reforçando a associação entre as citocinas e o autismo (CHEZ *et al.*, 2007).

Já a esquizofrenia é um transtorno neurológico crônico grave e incapacitante, com alterações das funções sociais, comportamentais e cognitivas. Os critérios diagnósticos do DSM-V especificam que dois ou mais sintomas de esquizofrenia devem estar presentes por um período de pelo menos um mês. Um sintoma deve ser delírios (crenças que conflitam com a realidade), alucinações (ver ou ouvir coisas que não existem) ou discurso desorganizado, com palavras que não seguem as regras da linguagem e podem ser difíceis ou impossíveis de entender. O segundo sintoma pode ser um dos seguintes: comportamento grosseiramente desorganizado ou catatônico (pensamento confuso ou comportamento ou movimentos bizarros) ou sintomas negativos, como a incapacidade de iniciar planos, falar, expressar emoções ou sentir prazer. O diagnóstico também requer prejuízos significativos no funcionamento social ou ocupacional por um período de pelo menos seis meses. O início da esquizofrenia geralmente ocorre no final da adolescência ou início dos 20 anos, com os homens geralmente apresentando sintomas mais cedo do que as mulheres (MEYER; FELDON, 2010). Os primeiros sinais da condição que podem ocorrer antes do diagnóstico incluem baixa motivação, relacionamentos difíceis e baixo desempenho escolar (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Vários fatores podem desempenhar um papel no desenvolvimento da esquizofrenia, incluindo genética, disfunções de áreas cerebrais, fatores ambientais, alterações fisiopatológicas e comprometimentos durante o neurodesenvolvimento (ARAÚJO, 2015; MONTE, 2013; MORERA-FUMERO; ABREU-GONZALEZ, 2013). Alguns estudos trazem que um desbalanço no sistema imunológico em fases críticas do neurodesenvolvimento poderia estar envolvido na patogênese da esquizofrenia (RIBEIRO, 2013; BORELLA, 2013; MULLER; SCHWARZ, 2010). Além disso, descobertas de estudos recentes sugeriram que as neurotransmissões serotoninérgicas e glutamatérgicas estão intimamente ligadas na produção de respostas farmacológicas a compostos psicodélicos e medicamentos antipsicóticos, o que pode beneficiar distúrbios psiquiátricos, incluindo a esquizofrenia (MAHMOOD *et al.*, 2022).

Quanto à depressão, os sintomas incluem afastamento do convívio social, anedonia, tristeza, anorexia, perda de peso, retardo psicomotor, ansiedade, tensão, fadiga, dificuldades de concentração, memória falha, irritabilidade, intestino irritável e dor de cabeça (MAES *et al.*, 2010). Já é muito bem estabelecido na literatura que pacientes deprimidos podem apresentar diminuição da serotonina cerebral e alterações nos receptores 5-HT, como diminuição dos

receptores 5-HT<sub>1A</sub> e aumento dos receptores 5-HT<sub>2</sub> (MAES; MELTZER, 1995), bem como secreção elevada de cortisol (DINAN, 2001).

Nas últimas décadas, novos desenvolvimentos na pesquisa psiquiátrica levaram à hipótese de que processos inflamatórios e interações neuroimunes estão envolvidos na patogênese da depressão maior e podem ser a base de alguns dos correlatos serotoninérgicos e adrenocorticais frequentemente observados. Essa hipótese foi denominada hipótese de monócitos-T-linfócitos ou de citocinas da depressão (MAES 1993, 1995, 1999; MAES; SMITH; SCHARPE, 1995). Desde então, tem havido muitos achados consistentes de níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com depressão, como a. interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, INF- $\gamma$  e TNF $\alpha$  (SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005). Além disso, a administração de indutores inflamatórios como lipopolissacarídeo (LPS), IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ou outras citocinas pode induzir comportamento semelhante à depressão em roedores (ZHENG *et al.*, 2021), conectando também a depressão a processos inflamatórios.

Junto à depressão, a ansiedade está entre os transtornos psiquiátricos mais comuns no mundo (SANTOMAURO *et al.*, 2021). A taxa de comorbidade de transtorno de ansiedade e depressão é muito alta, com cerca de 74% dos pacientes deprimidos apresentando sintomas de ansiedade, enquanto 61% dos pacientes ansiosos apresentam sintomas de depressão (ALMEIDA-FILHO *et al.*, 2007). Os transtornos de ansiedade são caracterizados por medo excessivo e persistente, preocupação, ansiedade e distúrbios comportamentais relacionados. O medo envolve uma resposta emocional a uma ameaça, seja essa ameaça real ou percebida, envolvendo a antecipação de que uma ameaça futura pode surgir. Um dos tipos de transtorno de ansiedade é a desordem de ansiedade social: um distúrbio psicológico bastante comum que envolve um medo irracional de ser observado, julgado, humilhado e/ou envergonhado. A ansiedade causada por esse distúrbio pode ter um grande impacto na vida de um indivíduo e dificultar o funcionamento na escola, no trabalho e em outros ambientes sociais (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

A etiologia dos transtornos de ansiedade é atualmente entendida como multifatorial, com a genética e o ambiente contribuindo para a predisposição e início de um transtorno clínico, até mesmo ainda na infância (SHATKIN, 2015). Muitos estudos mostraram consistentemente que a neuroinflamação e as alterações subsequentes nas regiões cerebrais envolvidas na regulação emocional desempenham um papel essencial na patologia da depressão e transtornos de ansiedade (RISBROUGH; VAUGHN; FRIEND, 2022; MILANESCHI *et al.*, 2021; WESTFALL *et al.*, 2021). Níveis de marcadores inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , IL-6, proteína C reativa (PCR), receptor toll-like 3 (TLR3) e TLR4 estavam aumentados em pacientes com

depressão e ansiedade (KIECOLT-GLASER; DERRY; FAGUNDES, 2015). Além disso, estudos recentes demonstram que a neuroinflamação em modelos animais é capaz de desenvolver comportamento tipo ansioso a médio e longo prazos (CHEN *et al.*, 2022; GAN *et al.*, 2022; LEN-RODRIGUEZ *et al.*, 2022).

Uma característica comum entre esses transtornos é a alteração do comportamento social. Além do TEA, esquizofrenia, ansiedade e depressão, outros transtornos neuropsiquiátricos também afetam a sociabilidade dos indivíduos acometidos. O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), a desordem de personalidade antissocial, o transtorno de personalidade esquiva, o transtorno de apego reativo e o transtorno de conduta possuem sintomas característicos que incluem comportamentos sociais anormais (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Sendo assim, este trabalho visou analisar possíveis alterações no comportamento social de animais submetidos a diferentes modelos de neuroinflamação neonatal.

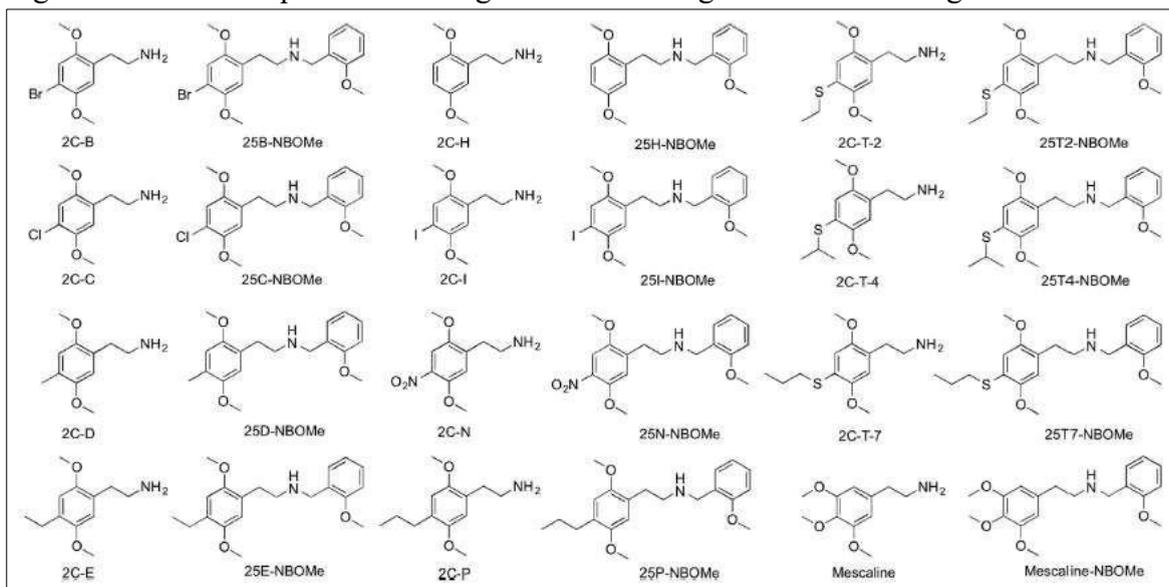
### 2.3 SUBSTANCIA PSICODÉLICA 25H-NBOMe

NBOMe é uma classe de novas substâncias psicoativas que tem emergido e ganhado proeminência no mercado de drogas de abuso, como uma novidade entre as “*designer drugs*”. As NBOMes são fenetilaminas N-2-metoxi-benzil que têm sido utilizadas por serem análogas das drogas psicodélicas da família 2,5-dimetoxi-fenetilamina (2C) (figura 7). Em particular, a droga 25H-NBOMe [2-(2,5-dimetoxi-fenil)-n-[(2-metoxifenil)metil]etanoamina] é a droga NBOMe análoga da droga 2C-H (4-cloro-2,5-dimetoxi-fenetilamina). A substituição N-2-metoxi-benzil aprimora a afinidade de ligação das drogas 2C aos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub>, resultando em um potente agonista desses receptores (BRADEN *et al.*, 2006; HEIM, 2004; NICHOLS *et al.*, 2015) com fortes propriedades alucinógenas tanto em animais quanto em humanos (HALBERSTADT; GEYER, 2014; SRISUMA *et al.*, 2015).

Os alucinógenos são geralmente utilizados não de maneira medicamentosa, mas sim recreacionalmente devido aos seus efeitos psicotrópicos, os quais foram descritos como aumento da capacidade de comunicação, autoconhecimento e empatia (VOLLENWEIDER, 2020). Esses efeitos se relacionam à alta afinidade pelos receptores cerebrais 5-HT por agonismo total ou parcial (se liga a um receptor em seu sítio ativo, mas só produz uma resposta parcial, mesmo quando todos os receptores estão ligados nesse agonista), possibilitando a modulação da neurotransmissão serotoninérgica (EGAN *et al.*, 1998). As drogas com essas propriedades também são conhecidas como psicodélicas, como por exemplo a dietilamida do

ácido lisérgico, popularmente conhecido como LSD, e a psilocibina, que é um psicodélico de ocorrência natural em alguns gêneros de fungos. Os psicodélicos fazem parte de uma família de drogas psicoativas conhecidas por suas propriedades alucinógenas e pelo potencial de alterar o humor, a percepção e a cognição, devido à afinidade por receptores de neurotransmissores no SNC (AGHAJANIAN, 1999).

Figura 7 – Estrutura química das drogas 2C e suas drogas NBOMes análogas.



Fonte: RICKLI *et al.*, 2015.

Nota: estruturas químicas das 2,5-dimetoxi-fenetilaminas (drogas 2C) e suas análogas N-2-metoxi-benzil substituído (NBOMe).

Em um estudo de comparação, foi demonstrado que as drogas NBOMe possuem uma maior afinidade pelos receptores 5-HT<sub>2</sub> do que 5-HT<sub>1</sub>, ao contrário do LSD. Além disso, elas são ligantes altamente potentes do receptor 5-HT<sub>2A</sub>, sendo agonistas parciais desse receptor. Em relação ao potencial alucinógeno, os perfis de ligação *in vitro* sugeriram que as drogas NBOMe têm maior potencial e efeitos alucinógenos do que as drogas 2C originais, e são semelhantes ao LSD, o qual possui alto potencial alucinógeno, devido à sua potência semelhante ou até mais alta nos receptores 5-HT<sub>2A</sub>. Apesar de o 25H-NBOMe, especificamente, ser a única droga NBOMe testada com menor potência em relação ao LSD, ele possui uma maior eficácia de ativação do receptor 5-HT<sub>2A</sub> (RICKLI *et al.*, 2015).

A nível celular, a ativação do receptor 5-HT<sub>2A</sub> por um agonista pode levar ao recrutamento de uma proteína G trimérica para o receptor. No caso do 5-HT<sub>2A</sub>, o receptor interage principalmente com a proteína Gα<sub>q</sub>, resultando na ativação da fosfolipase C (PLC), acúmulo de fosfatidil inositol e diacilglicerol, ativação da proteína quinase C (PKC) e liberação de Ca<sup>2+</sup> intracelular (HOYER *et al.*, 1994). Outros eventos de sinalização incluem a atividade

da fosfolipase A (PLA), associada à liberação de ácido araquidônico e à mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais na membrana celular (KURRASCH-ORBAUGH *et al.*, 2003). Além das vias de sinalização canônicas relacionadas à proteína G, outras proteínas podem interagir com receptores acoplados à proteína G (RAPG) ativados, como a  $\beta$ -arrestina 2 ( $\beta$ arr2). Essa proteína pode não só influenciar a internalização e dessensibilização do receptor, mas também pode induzir eventos de sinalização (NICHOLS, 2016; LOPEZ-GIMENEZ; GONZALEZ- MAESO, 2018; CANAL, 2018).

O receptor 5-HT<sub>2A</sub> foi um dos primeiros RAPG em que a seletividade funcional foi reconhecida (BERG *et al.*, 1998; URBAN *et al.*, 2007). O fenômeno mais bem descrito neste receptor é a ativação seletiva de PLC ou a via de PLA. Neste contexto, vários agonistas com preferência para qualquer uma das vias foram identificados, sendo que um estudo recente demonstrou que a substância psicodélica 25H-NBOMe possui preferência de viés para o recrutamento de  $\beta$ -arr2 em vez de miniG $\alpha_q$ , em comparação com a substância psicodélica de referência LSD (POTTIE; DEDECKER; STOVE, 2020).

Vários transtornos neuropsiquiátricos foram relacionados ao receptor 5-HT<sub>2A</sub>. Pessoas com síndrome de Asperger (a qual faz parte do espectro autista) tiveram uma redução significativa na ligação ao receptor 5-HT<sub>2A</sub> cortical no córtex cingulado total, anterior e posterior; bilateralmente nos lobos frontal e temporal superior; e no lobo parietal esquerdo. Além disso, a ligação reduzida ao receptor foi significativamente relacionada à comunicação social anormal (MURPHY *et al.*, 2006). Os níveis do receptor 5-HT<sub>2A</sub> parecem não ser afetados em pacientes que sofrem de TDAH, mas os polimorfismos do receptor podem ser um fator modulador desse transtorno (PORNNOPPADOL *et al.*, 1999). Um estudo encontrou uma diminuição nos níveis de 5-HT<sub>2A</sub> no hipocampo em pacientes com depressão maior (MINTUN *et al.*, 2004), e outro estudo utilizando camundongos transgênicos com pouca ou nenhuma expressão do receptor 5-HT<sub>2A</sub> no cérebro indica que ele é necessário para a modulação do comportamento tipo ansioso (WEISSTAUB *et al.*, 2006). Quanto à esquizofrenia, o receptor 5-HT<sub>2A</sub> desempenha um papel significativo nesse transtorno, devido ao fato de que a maioria dos medicamentos antipsicóticos típicos e quase todos os atípicos usados na terapia ligam-se aos receptores 5-HT<sub>2A</sub> (KASPER *et al.*, 2003; MELTZER; MCGURK, 1999).

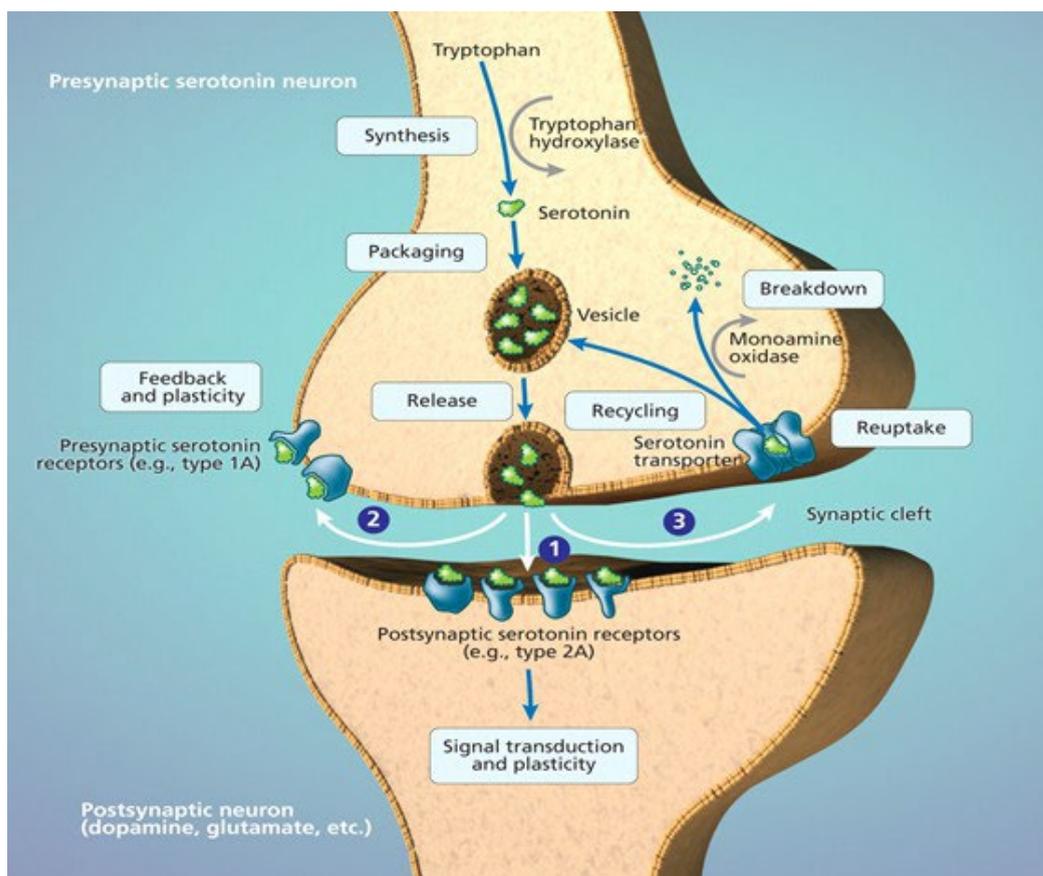
Além disso, as drogas NBOMe também possuem alta afinidade (como agonistas) por receptores adrenérgicos alfa 1 ( $\alpha_1$ ) e receptores associado a traços de aminas do tipo 1 (TAAR1), semelhantemente ao LSD. Entretanto, não possuem afinidade por receptores dopaminérgicos D<sub>1-3</sub> da mesma forma que o LSD, portanto o perfil de ligação das drogas NBOMe apontam para um efeito alucinógeno forte (similar ao LSD), porém com maiores

propriedades estimulantes devido a interações com receptores  $\alpha_1$  (RICKLI *et al.*, 2015). De fato, já foram reportados efeitos cardiovasculares produzidos por drogas NBOMe, além de seus efeitos alucinógenos. Especificamente, sintomas de toxicidade simpatomimética incluindo taquicardia, hipertensão, midríase, agitação e hipertermia foram comumente reportados em casos de intoxicação aguda com NBOMe (HILL *et al.*, 2013; ROSE *et al.*, 2013; SRISUMA *et al.*, 2015; STELLPFLUG *et al.*, 2014; WOOD *et al.*, 2015).

Em paralelo, alguns estudos demonstraram mecanismos potenciais que correlacionam as desordens do neurodesenvolvimento induzidas pela inflamação ao metabolismo do aminoácido triptofano (TRP) no SNC. O TRP é precursor de serotonina e melatonina por meio ativação da enzima triptofano-hidroxilase (TH) (figura 8). Entretanto, a baixa disponibilidade de TRP afeta a neurotransmissão serotoninérgica, causando sintomas de depressão (WIDNER *et al.*, 2002; NEUMEISTER, 2003; FITZGERALD *et al.*, 2008). Isso ocorre porque o TRP também é precursor da via das quinureninas, sendo degradado pela enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) (figura 9). Consequentemente, quando o TRP é desviado para a via das quinureninas, ocorre uma diminuição do substrato disponível para a via serotoninérgica. Essa desregulação é mediada pela inflamação e tem sido associada a transtornos do neurodesenvolvimento incluindo a esquizofrenia (ARAÚJO, 2015) e a depressão (DANTZER *et al.*, 2008a).

Um estudo observou que a administração de LPS intraperitoneal (i.p.) induz a expressão da enzima IDO no cérebro alterando a via das quinureninas e causando alterações comportamentais do tipo depressivo e ansioso (O'CONNOR *et al.*, 2009a). Entretanto, este estudo não identificou o tipo celular que havia produzido a IDO. Sabe-se que a micróglia, astrócitos, neurônios e células endoteliais são capazes de produzir a enzima IDO (DANTZER *et al.*, 2008a). De fato, em um estudo com cultura de células primárias da glia de ratos, foi observado um aumento da expressão de IDO induzido por LPS (CONNOR *et al.*, 2008).

Figura 8 – Síntese e liberação de serotonina na fenda sináptica.

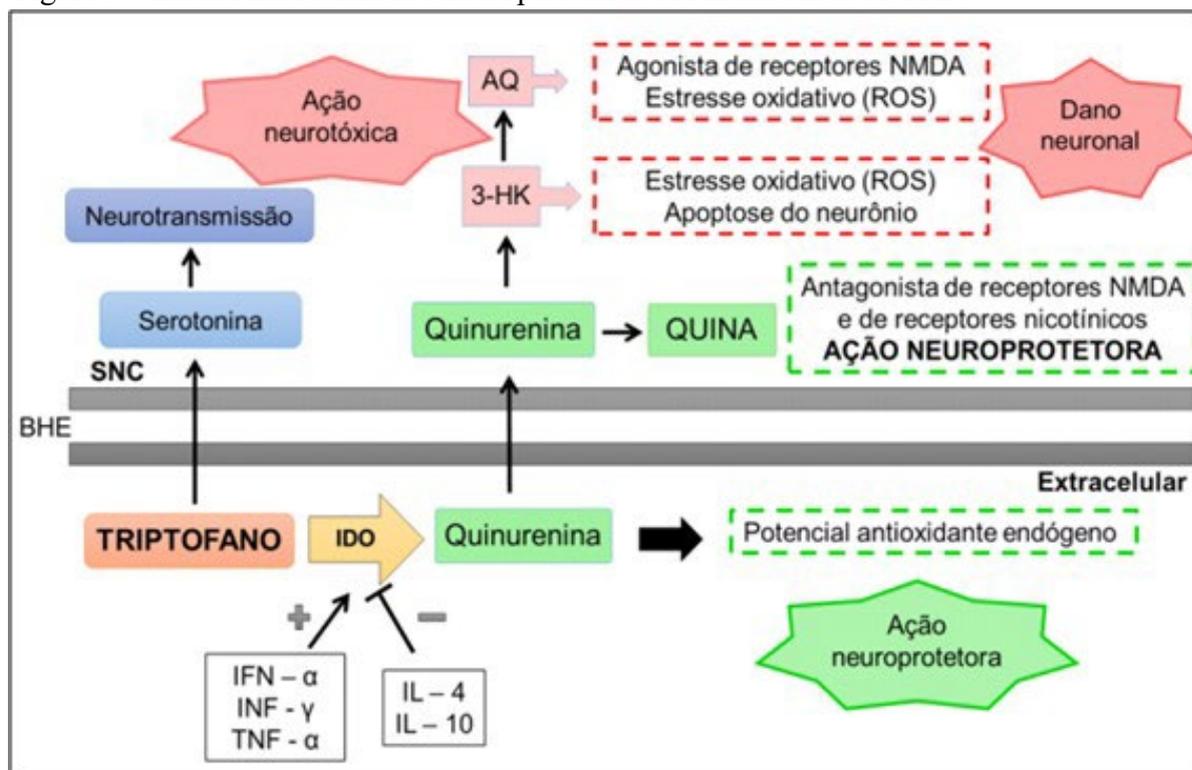


Fonte: AAN HET ROT; MATHEW; CHARNEY, 2009.

Nota: sinapse da serotonina. A serotonina é sintetizada a partir do triptofano pela enzima triptofano hidroxilase. Ela é então armazenada em vesículas para ser liberada na fenda sináptica quando o neurônio é estimulado. Na fenda sináptica, a serotonina pode (1) se ligar aos seus receptores em outros neurônios pós-sinápticos, (2) se ligar em receptores no neurônio pré-sináptico de onde foi liberada, promovendo feedback e regulando a plasticidade neuronal e (3) ser recaptada pelo neurônio pré-sináptico por meio de um transportador, para ser reciclada ou degradada pela enzima monoamina-oxidase e excretada na urina.

A desregulação da via das quinureninas causada pela inflamação tem sido relacionada como um coadjuvante para uma variedade de desordens neurológicas (PÉREZ-DE LA CRUZ *et al.*, 2007). Portanto, levando em consideração que a neuroinflamação neonatal induzida por LPS pode afetar e modular o neurodesenvolvimento, inclusive na via serotoninérgica, é relevante estudar a capacidade de atuação de potenciais agonistas 5-HT como agentes terapêuticos. Sendo assim, este trabalho objetivou avaliar o potencial terapêutico do psicodélico 25H-NBOMe em modelos animais de neuroinflamação com LPS, tanto em machos quanto em fêmeas.

Figura 9 – Efeitos neurotóxicos e neuroprotetores dos metabólitos do TRP.



Fonte: CARVALHO *et al.*, 2017.

Nota: metabolismo do triptofano nas vias da serotonina e das quinureninas. Durante uma inflamação, o IFN- $\alpha$  e o TNF- $\alpha$  estimulam a atividade da enzima IDO, comprometendo a síntese de serotonina e favorecendo a via das quinureninas, bem como a produção de metabólitos neurotóxicos como o ácido 3-hidroxiquinurenina (3-HK) e o ácido quinolínico (AQ). As interleucinas 4 e 10 (IL-4 e IL-10) diminuem a atividade da IDO, conseqüentemente reduzindo o catabolismo do triptofano, sem comprometer a produção de serotonina. O ácido quinurênico (QUINA) atua como antagonista dos receptores NMDA (N- metil-D-aspartato) e dos receptores  $\alpha 7$ -nicotínico de acetilcolina, exercendo ação neuroprotetora.

### 3 JUSTIFICATIVA

A neuroinflamação durante o período neonatal tem mostrado afetar vários aspectos vulneráveis do desenvolvimento cerebral, contribuindo para diversas manifestações de disfunções neuronais e comportamentais que podem se manifestar ao longo da vida. Essa neuroinflamação está associada à disfunção cerebral aguda e complicações neurológicas a longo prazo que incluem déficits cognitivos, esquizofrenia, depressão, ansiedade e transtorno do espectro autista em modelos animais com ratos (ADAM *et al.*, 2013; PANG *et al.*, 2016; TISHKINA *et al.*, 2016; WALKER *et al.*, 2009; WISCHHOF *et al.*, 2015). A busca por novos tratamentos mais eficazes para transtornos neuropsiquiátricos é constante, e a descoberta de novas substâncias psicotrópicas como as drogas NBOMe devem ser investigadas quanto ao potencial terapêutico.

Na literatura, não são encontradas evidências sobre os efeitos das substâncias NBOMe sobre o comportamento social. No entanto, substâncias semelhantes apresentam propriedades terapêuticas em diversos transtornos neuropsiquiátricos, incluindo melhoras na sociabilidade (INSERRA; GREGORIO; GOBBI, 2020). Portanto, torna-se relevante um estudo que possa identificar o potencial terapêutico das drogas NBOMe no tratamento de sintomas de desordens neuropsiquiátricas.

## 4 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são descritos abaixo.

### 4.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar alterações comportamentais e correlacioná-las com alterações proteicas no córtex pré-frontal de ratos na peripuberdade submetidos à inflamação sistêmica neonatal com LPS e verificar se essas alterações podem ser revertidas/atenuadas pelo tratamento com 25H-NBOMe.

### 4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.3.1 Investigar o efeito da administração sistêmica de LPS em uma dose baixa (0,2 mg/kg) e uma dose alta (1 mg/kg) no período neonatal sobre:

- a) a taxa de sobrevivência após a aplicação de LPS;
- b) o peso corporal ao longo do tempo;
- c) o número de vocalizações ultrassônicas durante o desafio imunológico;
- d) o número de vocalizações ultrassônicas no PND12;
- e) a capacidade locomotora no teste de campo aberto nos animais na peripuberdade;
- f) o comportamento de brincar nos animais na peripuberdade;
- g) a expressão das proteínas GFAP e sinaptofisina no córtex pré-frontal dos animais na peripuberdade.

4.3.2 Investigar o efeito agudo da administração sistêmica de 25H-NBOMe em uma dose baixa (0,3 mg/kg) e uma dose alta (1 mg/kg) na peripuberdade de ratos submetidos à neuroinflamação neonatal sobre:

- a) o número de contrações da cabeça (HTR) imediatamente após a administração de 25H-NBOMe;
- b) o comportamento de brincar;
- c) a capacidade locomotora no teste de campo aberto;
- d) a expressão das proteínas GFAP, Iba1 e sinaptofisina no córtex pré-frontal.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* fêmeas e machos (para acasalamento) a partir de 8 semanas de vida, entre 200 e 250 gramas (g) 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  $\pm 22^{\circ}\text{C}$ , em fotoperíodo definido de 12 horas sendo as luzes acesas às 07:00, e com ração comercial e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Alfenas sob o número de protocolo 20/2022 e 28/2021.

### 5.2 ACASALAMENTO E PADRONIZAÇÃO DAS NINHADAS

Após o período de ambientação de no mínimo 7 dias no biotério do Laboratório de Fisiologia Translacional, no final da tarde, as fêmeas foram colocadas para acasalamento com machos experientes na proporção de duas fêmeas para cada macho. Na manhã seguinte foi realizado esfregaço vaginal para avaliar presença de espermatozoides, que foi considerada como o dia zero de gestação (GD0). A fêmea gestante foi então colocada em uma caixa individual sob as mesmas condições ambientais descritas anteriormente.

O dia do nascimento dos filhotes foi considerado o dia pós-natal zero (PND0) e nesse dia não houve manuseio dos animais. No PND1 as ninhadas foram padronizadas em 6 fêmeas e 6 machos cada e marcados com aplicação subcutânea de tinta Nankin. A marcação fez-se necessária pois cada animal da ninhada foi aleatoriamente selecionado para compor um grupo experimental diferente. Sendo assim, não houve influência da ninhada ou do comportamento materno, pois não foram utilizados dois animais de uma mesma ninhada para a composição de um mesmo grupo.

Para a realização deste estudo, foram realizadas duas etapas de procedimentos. A primeira etapa visou selecionar a dose de LPS e procedimento de aplicação em que houvesse maiores alterações comportamentais na peripuberdade. Tendo escolhido a dose de LPS, a segunda etapa utilizou essa dose no período neonatal para que fosse feito o tratamento com 25H- NBOMe na peripuberdade.

### 5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA PRIMEIRA ETAPA

As fêmeas gestantes foram mantidas no biotério até o dia do parto, o qual foi considerado o PND0 da prole. No PND1 as ninhadas foram padronizadas em 6 fêmeas e 6 machos cada e marcados com aplicação subcutânea de tinta Nankin. No PND3, os filhotes foram injetados com salina ou LPS. Foram formados 6 grupos para determinação da dose de LPS: (1) sal aplicada no PND3, (2) LPS 0,2 mg/kg aplicado no PND3, (3) LPS 1,0 mg/kg aplicado no PND3, (4) sal aplicada nos PND3-5, (5) LPS 0,2 mg/kg aplicado nos PND3-5 e (6) LPS 1,0 mg/kg aplicada nos PND3-5, como demonstrado no Quadro 2. Foram escolhidos um macho e uma fêmea aleatoriamente de cada ninhada para a composição dos grupos.

Quadro 2 – Grupos experimentais para padronização do modelo de inflamação neonatal.

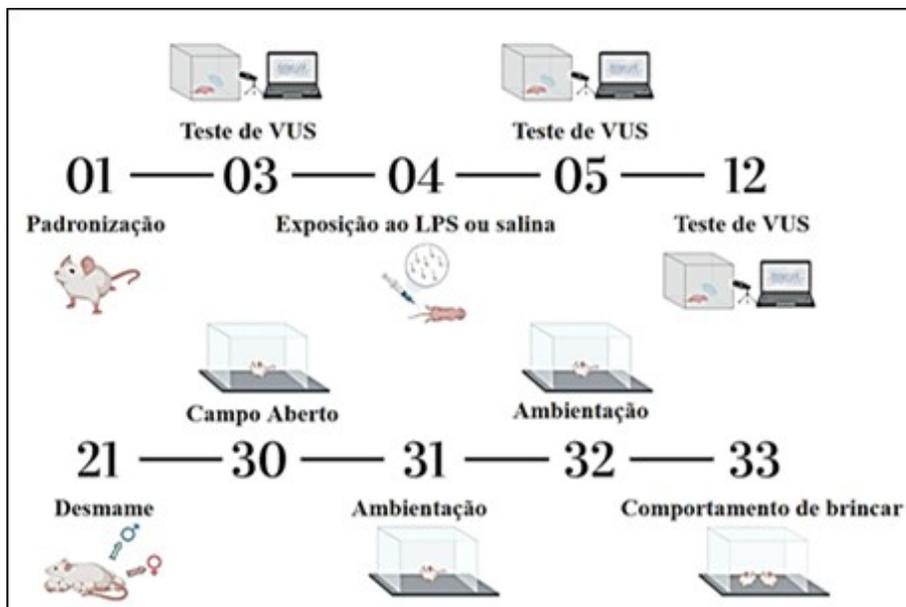
| <b>Animais</b> | <b>Tratamento e dose</b> | <b>Frequência de aplicações</b> | <b>Sigla</b>    |
|----------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------|
| Machos         | Salina 0,9% (1 ml/kg)    | 1 (PND3)                        | 1xSal 1,0 ml/kg |
| Machos         | LPS (0,2 mg/kg)          | 1 (PND3)                        | 1xLPS 0,2 mg/kg |
| Machos         | LPS (1 mg/kg)            | 1 (PND3)                        | 1xLPS 1,0 mg/kg |
| Machos         | Salina 0,9% (1 ml/kg)    | 3 (PND3, 4 e 5)                 | 3xSal 1,0 ml/kg |
| Machos         | LPS (0,2 mg/kg)          | 3 (PND3, 4 e 5)                 | 3xLPS 0,2 mg/kg |
| Machos         | LPS (1 mg/kg)            | 3 (PND3, 4 e 5)                 | 3xLPS 1,0 mg/kg |
| Fêmeas         | Salina 0,9% (1 ml/kg)    | 1 (PND3)                        | 1xSal 1,0 ml/kg |
| Fêmeas         | LPS (0,2 mg/kg)          | 1 (PND3)                        | 1xLPS 0,2 mg/kg |
| Fêmeas         | LPS (1 mg/kg)            | 1 (PND3)                        | 1xLPS 1,0 mg/kg |
| Fêmeas         | Salina 0,9% (1 ml/kg)    | 3 (PND3, 4 e 5)                 | 3xSal 1,0 ml/kg |
| Fêmeas         | LPS (0,2 mg/kg)          | 3 (PND3, 4 e 5)                 | 3xLPS 0,2 mg/kg |
| Fêmeas         | LPS (1 mg/kg)            | 3 (PND3, 4 e 5)                 | 3xLPS 1,0 mg/kg |

Fonte: autora.

Duas horas após a administração de LPS (tanto no PND3 quanto no PND5), a comunicação dos filhotes foi avaliada pelo teste de vocalizações ultrassônicas (VUS), o qual foi repetido no PND12. O desmame foi feito no PND21 quando os animais foram separados por sexo. Todos os filhotes passaram por todos os testes comportamentais sendo previamente ambientados ao ambiente e aparatos. Na peripuberdade (entre os PND30 e PND34), foram realizados os testes de campo aberto (PND30) e comportamento de brincar (PND33). Além disso, todos os animais foram pesados a cada 2 dias em balança analítica. Um resumo gráfico

do delineamento experimental da primeira etapa segue abaixo na figura 10:

Figura 10 – Resumo gráfico do delineamento experimental da primeira etapa, em cada dia pós-natal.



Fonte: autora.

Após o teste de comportamento de brincar, os animais foram eutanasiados por decapitação e imediatamente após foi dissecado o córtex pré-frontal de cada animal. As estruturas foram mantidas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a realização do ensaio de *Western blotting* (WB).

#### 5.4 MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO NEONATAL E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para caracterização do modelo de inflamação no período neonatal, utilizou-se lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, sorotipo 026:B6, Sigma-Aldrich (10 mg/ml) dissolvido em solução salina 0.9%. As aplicações foram realizadas utilizando-se uma seringa de insulina (1 ml) pela via intraperitoneal. Os grupos experimentais foram definidos de acordo com a dose de LPS e frequência de aplicações, como já demonstrado no quadro 2, devido à diversidade de protocolos de inflamação neonatal encontrados na literatura. Portanto, foram definidos seis grupos experimentais que englobassem uma única administração de LPS no PND3, bem como 3 aplicações em dias consecutivos, em duas doses de LPS: uma dose baixa (0,2 mg/kg) e uma dose alta (1 mg/kg). Os grupos controle receberam uma dose equivalente de solução salina 0,9% (1 ml/kg).

Sabe-se que uma única injeção sistêmica de LPS é utilizada para reproduzir uma inflamação sistêmica aguda, enquanto injeções múltiplas imitam uma condição inflamatória

crônica (DINEL *et al.*, 2014; MING *et al.*, 2015). Contudo, o uso de LPS sistêmico de maneira repetitiva ativa a micróglia e causa alterações na barreira hematoencefálica, aumentando a penetração do LPS no SNC e mobilizando outros elementos envolvidos na resposta inflamatória, além de morte neuronal (SCHWARTZ *et al.*, 2000; BENATTI *et al.*, 2009; CERVETTO *et al.*, 2013). Por essas razões, foram utilizados ambos os modelos de aplicações para simular tanto uma neuroinflamação neonatal aguda, quanto persistente. Além disso, os PND 1-3 representam as semanas de gestação 23-32, caracterizadas pelo desenvolvimento do sistema imune e estabelecimento da BHE. Em contraste, durante os PND 5-10 o sistema imune ainda está sendo consolidado, enquanto as densidades axonal e dendrítica aumentam e a gliogênese está em pico (SEMPLE *et al.*, 2013). Portanto, o dia neonatal de exposição ao LPS pode ser de relevante para as diferenças comportamentais observadas na peripuberdade.

## 5.5 AVALIAÇÃO DA COMUNICAÇÃO

A avaliação das vocalizações ultrassônicas (VUS) representa uma forma importante de avaliação das habilidades comunicativas entre o filhote e a mãe. O propósito do teste foi detectar alterações no número de vocalizações 2 horas após a administração de LPS nos PND3 e 5, além de verificar se essas alterações foram duradouras, sendo novamente avaliadas no PND12. Para isso, cada filhote foi separado de sua ninhada e colocado em uma caixa com temperatura controlada (25 °C) por 10 minutos. Após o isolamento, o filhote foi colocado em um recipiente de acrílico situado em uma câmara à prova de som posicionado abaixo de um microfone conectado a um sistema de aquisição computadorizado (ML 221 *PowerLab*, *ADInstruments*, Bella Vista, NSW, Austrália) para detectar as VUS a 35-50 kHz. Os sons foram registrados por 3 minutos e o número total de VUS foram analisados posteriormente. A câmara à prova de som e o recipiente de acrílico foram limpos com uma solução de álcool a 5% após cada teste.

## 5.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA SEGUNDA ETAPA

De igual modo, as fêmeas gestantes foram mantidas no biotério de Fisiologia Translacional até o dia do parto, o qual foi considerado o PND0 da prole. No PND1 as ninhadas foram padronizadas em 6 fêmeas e 6 machos cada e marcados com aplicação subcutânea de tinta Nankin. Para os procedimentos da segunda etapa, a dose de LPS escolhida foi a de 1,0 mg/kg aplicado nos PND3-5, pois foi a dose que causou mais alterações no comportamento

social dos animais. Então, no PND3, os filhotes foram injetados com salina ou LPS 1,0 mg/kg aplicados por 3 dias consecutivos (do PND3 ao 5), de modo a se formar 6 grupos para avaliação das doses de tratamento com 25H-NBOMe (via i.p.) na peripuberdade: (1) Salina-Vei, (2) Salina-NBOMe 0,3 mg/kg, (3) Salina-NBOMe 1,0 mg/kg, (4) LPS-Vei, (5) LPS-NBOMe 0,3 mg/kg e (6) LPS-NBOMe 1,0 mg/kg, como demonstrado no quadro 3. Foram escolhidos um macho e uma fêmea aleatoriamente de cada ninhada para a composição dos grupos.

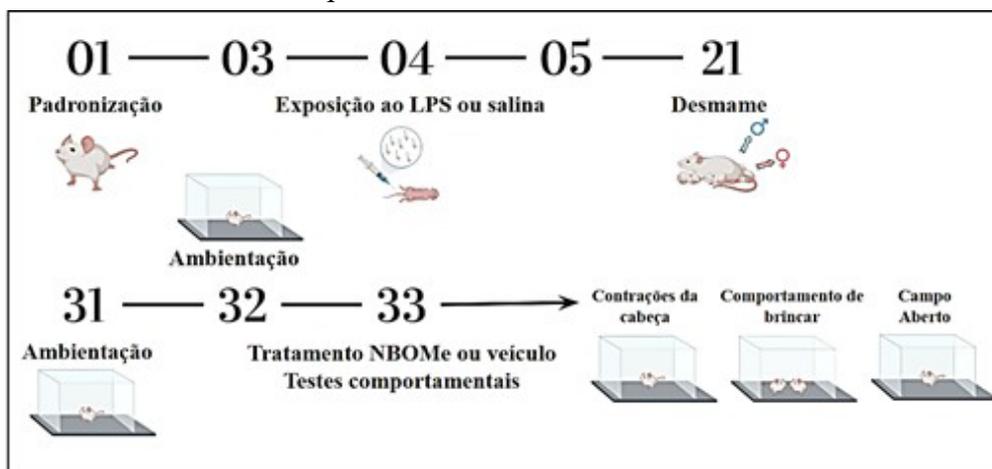
Quadro 3 – Grupos experimentais para avaliação do tratamento com 25H-NBOMe.

| <b>Animais</b> | <b>Exposição Neonatal</b> | <b>Tratamento na Peripuberdade</b> | <b>Sigla</b>        |
|----------------|---------------------------|------------------------------------|---------------------|
| Machos         | Salina 0,9% (1 ml/kg)     | Veículo (1 ml/kg)                  | Sal-Vei 1,0 ml/kg   |
| Machos         | Salina 0,9% (1 ml/kg)     | NBOMe (0,3 mg/kg)                  | Sal-NBOMe 0,3 mg/kg |
| Machos         | Salina 0,9% (1 ml/kg)     | NBOMe (1 mg/kg)                    | Sal-NBOMe 1,0 mg/kg |
| Machos         | LPS (1 mg/kg)             | Veículo (1 ml/kg)                  | LPS-Vei 1,0 ml/kg   |
| Machos         | LPS (1 mg/kg)             | NBOMe (0,3 mg/kg)                  | LPS-NBOMe 0,3 mg/kg |
| Machos         | LPS (1 mg/kg)             | NBOMe (1 mg/kg)                    | LPS-NBOMe 1,0 mg/kg |
| Fêmeas         | Salina 0,9% (1 ml/kg)     | Veículo (1 ml/kg)                  | Sal-Vei 1,0 ml/kg   |
| Fêmeas         | Salina 0,9% (1 ml/kg)     | NBOMe (0,3 mg/kg)                  | Sal-NBOMe 0,3 mg/kg |
| Fêmeas         | Salina 0,9% (1 ml/kg)     | NBOMe (1 mg/kg)                    | Sal-NBOMe 1,0 mg/kg |
| Fêmeas         | LPS (1 mg/kg)             | Veículo (1 ml/kg)                  | LPS-Vei 1,0 ml/kg   |
| Fêmeas         | LPS (1 mg/kg)             | NBOMe (0,3 mg/kg)                  | LPS-NBOMe 0,3 mg/kg |
| Fêmeas         | LPS (1 mg/kg)             | NBOMe (1 mg/kg)                    | LPS-NBOMe 1,0 mg/kg |

Fonte: autora.

O desmame foi realizado no PND21 quando os animais foram separados por sexo. Todos os filhotes passaram por todos os testes comportamentais sendo previamente ambientados ao ambiente e aparatos. Na peripuberdade, foram realizados os testes de contração da cabeça (HTR, *Head-Twitch Response*), comportamento de brincar e campo aberto (entre os PND32-34), feitos nessa ordem e imediatamente após o tratamento com 25H-NBOMe ou veículo, pois o psicodélico NBOMe já elicitava comportamentos HTR após poucos minutos da aplicação. Um resumo gráfico do delineamento experimental da segunda etapa segue abaixo na figura 11:

Figura 11 – Resumo gráfico do delineamento experimental da segunda etapa, em cada dia pós-natal.



Fonte: autora.

Após o teste de campo aberto, os animais foram eutanasiados por decapitação e imediatamente após foi dissecado o córtex pré-frontal de cada animal. As estruturas foram mantidas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a realização do ensaio de *Western blotting* (WB).

## 5.7 TRATAMENTO COM 25H-NBOMe

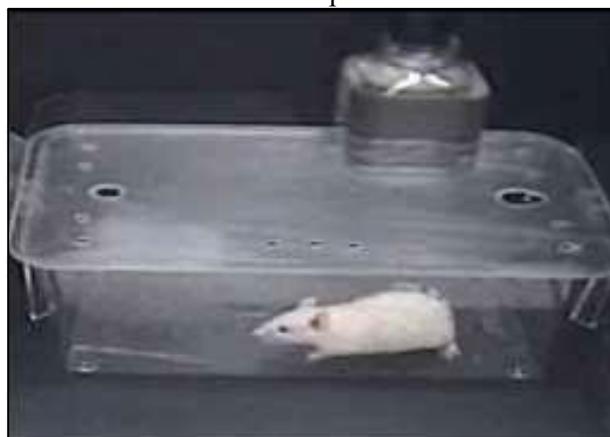
Para comparar e avaliar os efeitos produzidos pelo 25H-NBOMe, as ninhadas foram divididas em grupos para a exposição neonatal ao LPS e para posterior tratamento com as doses de 25H-NBOMe, de modo a se formar 6 grupos para avaliação das doses de tratamento com 25H-NBOMe (via i.p.) na peripuberdade: (1) Salina-Vei, (2) Salina-NBOMe 0,3 mg/kg, (3) Salina-NBOMe 1,0 mg/kg, (4) LPS-Vei, (5) LPS-NBOMe 0,3 mg/kg e (6) LPS-NBOMe 1,0 mg/kg, como já demonstrado no Quadro 3. A substância psicodélica 25H-NBOMe é proveniente do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG. O veículo utilizado para a suspensão da droga foi composto de salina, *Tween* 20 e dimetilsulfóxido (DMSO), na proporção de 8:1:1, respectivamente. A escolha das doses de NBOMe foi feita a partir da revisão de estudos prévios sobre uma substância psicodélica similar (25I-NBOMe) desenvolvidos com ratos (MILIANO *et al.*, 2019), além de já serem doses estabelecidas em outros estudos dentro do grupo de pesquisa.

## 5.8 TESTES COMPORTAMENTAIS

### 5.8.1 Teste de contração da cabeça (HTR)

O teste de contração da cabeça (HTR, do inglês *Head-Twitch Response*) é usado para analisar os estímulos alucinógenos de substâncias psicodélicas levando em consideração a contração da cabeça e o movimento corporal de sacudir do rato. Tais movimentos fazem parte do repertório comportamental natural da maioria das espécies de mamíferos. O movimento de HTR é uma contração rápida da cabeça de um lado para o outro. De acordo com o protocolo mais comumente usado, sugerido por Canal e Morgan (2012), a análise do estímulo alucinógeno é feita pela contagem da frequência de HTR, sendo então um teste preditivo para drogas que atuam no receptor 5-HT<sub>2A</sub>. O teste inicia-se imediatamente após a administração da substância alucinógena e tem duração de 20 minutos, dividida em períodos de análise de 5 minutos, o que permite a quantificação dos estímulos alucinógenos temporalmente. Os aparatos (caixas individuais de acrílico, figura 12) utilizados na execução dos testes foram cuidadosamente limpos com solução de etanol a 5% após cada teste e foram devidamente isolados com cartolina preta para impedir a visão de outros animais. O comportamento foi gravado e a análise foi realizada manualmente.

Figura 12 – Caixa de acrílico individual utilizada para o teste de HTR.



Fonte: autora.

### 5.8.2 Comportamento de brincar

O teste de comportamento de brincar é utilizado para avaliar o desempenho social dos animais na peripuberdade. O teste foi realizado entre o PND 30 e 35, onde o comportamento de brincar é mais elevado (PANKSEPP, 1981). A metodologia foi conduzida de acordo aos protocolos estabelecidos no Laboratório de Fisiologia Translacional. O teste foi realizado em um aparato quadrado de vidro (60 cm x 60 cm x 60 cm, figura 13). Os ratos foram individualmente habituados ao aparato de teste durante 10 minutos por 2 dias antes do

experimento de modo a evitar que o comportamento exploratório atrapalhasse a exibição do comportamento de brincar. No dia do teste (PND 32-34), os animais foram isolados por 3h30min antes do teste para aumentar sua motivação social e assim facilitar a expressão do comportamento de brincar (TREZZA; VANDERSCHUREN; 2008; TREZZA; BAARENDSE; VANDERSCHUREN, 2009). O teste consistiu em colocar dois animais pertencentes ao mesmo grupo experimental, porém de ninhadas diferentes, na arena de teste durante 15 minutos e as interações do comportamento de brincar foram registradas para posterior análise manual. Os parâmetros analisados foram: (1) tempo em segundos gasto em exploração social - cheirando qualquer parte do corpo do parceiro de teste, incluindo a área anogenital (*sniffing*); (2) tempo em segundos seguindo (*following*) - avançando na direção ou seguindo o outro animal, que se afasta; (3) frequência de *poucings* – contato para solicitar a brincadeira, como morder a nuca do parceiro de teste, montar em suas costas e passar por baixo do parceiro; (4) frequência de *pinnings* – contato dorsal de um dos animais com a superfície, enquanto o outro animal fica por cima prendendo-o; (5) e tempo total de interação, onde foram somados os tempos dos parâmetros 1, 2 e 4. Com o objetivo de reduzir as interferências nas respostas comportamentais, os animais em pares não diferiram mais de 20 g no peso corporal e não apresentaram experiência social anterior (MELANCIA *et al.*, 2017).

Figura 13 – Aparatos (cubas de vidro) utilizadas para o teste de comportamento de brincar.



Fonte: autora.

### 5.8.3 Atividade locomotora e exploratória no campo aberto

Este teste tem por finalidade verificar o desempenho motor dos animais. Os animais foram colocados individualmente por 20 min no centro de uma arena quadrada de 60 cm de lado, com paredes transparentes de 50 cm de altura (figura 14). Após cada teste, o aparato de campo aberto foi limpo com álcool 5%. A análise dos resultados foi automatizada (software

Ethovision XT versão 9.0). Foram avaliados a distância percorrida e o tempo de imobilidade a cada 5 min de teste (GOULD; DAO; KOVACSICS, 2009).

Figura 14 – Aparato quadrado utilizado no teste de campo aberto.



Fonte: autora.

## 5.9 COLETA E PROCESSAMENTO DE TECIDO CEREBRAL

Para as análises de *Western Blotting* (WB), todos os animais foram analgesiados subcutâneamente com Tramadol (12 mg/kg) e após um intervalo de 5 minutos os mesmos foram decapitados e os encéfalos coletados. O córtex pré-frontal de cada animal foi dissecado sobre o gelo, em uma temperatura de 4 °C. Imediatamente após a dissecação, as estruturas foram congeladas individualmente em nitrogênio líquido e armazenadas em um freezer à -80 °C, até o momento da utilização.

### 5.9.1 *Western Blotting*

A técnica de WB foi utilizada para avaliar a expressão de GFAP, Iba1 e sinaptofisina no córtex pré-frontal dos animais. As amostras foram descongeladas sobre o gelo a uma temperatura de 4 °C. Em seguida, as mesmas foram maceradas individualmente em tampão de lise com um coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), centrifugadas a 9200 rpm por 15 minutos a 4 °C, e por fim, a concentração de proteínas no sobrenadante foi quantificada pelo método de Bradford. Tampão de lise e tampão *Laemmli* foram adicionados às amostras que em seguida foram fervidas à 100 °C por 5 min e submetidas a análise de WB.

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE a 12% (eletroforese em gel de

poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) e em seguida transferidas para membranas de nitrocelulose por meio de um sistema de transferência por imersão (Loccus, modelo WEST- i10, *eletroblotter*). A membrana foi lavada 3 vezes em tampão fosfato-salina (PBS), bloqueada com solução de 5% de leite desnatado diluído em PBS contendo 0,05% de Tween 20 durante 2 horas à temperatura ambiente, e finalmente incubadas *overnight* a 4 °C com o anticorpo anti- GFAP (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., nº sc-33673), anti-Iba1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., nº sc-32725), e anti-sinaptofisina (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

No dia seguinte, após 3 lavagens em PBS, as membranas foram incubadas durante 1 hora a 4 °C com os respectivos anticorpos secundários específicos *anti-mouse* para GFAP e Iba1 (1:2000, Abcam) e *anti-rabbit* para sinaptofisina (1:2000, Abcam). Após o período de incubação, a membrana foi lavada 3 vezes em PBS 0,1M e aplicou-se um kit de detecção comercial durante aproximadamente 1 a 2 minutos (kit de detecção ECL, Bio-Rad, Hercules, CA). As imagens de análise foram capturadas por analisador de imagem por quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA). Posteriormente, as membranas passaram pelo processo de *stripping* seguido do bloqueio em 5% de leite desnatado em PBS contendo Tween 20 a 0,05% durante 2 horas.

Após o bloqueio, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,1M, seguido por incubação *overnight* a 4 °C com anticorpo primário antiactina (1:4000, Abcam, ab-4700). No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M e incubadas por 1 hora com anticorpo secundário (1:2000, Abcam, ab-6789). Após a incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,1M e em seguida aplicou-se um kit de detecção comercial durante aproximadamente 1 a 2 minutos (kit de detecção ECL, Bio-Rad, Hercules, CA).

As imagens de análise foram capturadas por analisador de imagem por quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA) e as intensidades de banda foram quantificadas utilizando um software específico da Bio-Rad (Image Lab Software, versão 6.1). A intensidade de cada banda foi expressa em relação à da  $\beta$ -actina e os dados expressos foram normalizados para o controle.

## 5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados utilizando-se o software *GraphPad Prism* versão 8.0.1 e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Na primeira etapa do estudo, a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de Newman-Keuls foi utilizada para

comparar os dados entre diferentes doses de LPS (salina, 0,2 mg/kg e 1,0 mg/kg) em diferentes padrões de aplicações (1 ou 3 aplicações consecutivas) sobre alterações nos parâmetros comportamentais dos testes de VUS, campo aberto e comportamento de brincar, bem como sobre a expressão das proteínas GFAP e sinaptofisina.

Na segunda etapa deste trabalho, a ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls foi utilizada para comparar o efeito dos tratamentos (veículo ou 25H-NBOMe, i.p.) em animais submetidos à neuroinflamação neonatal com LPS 1,0 mg/kg (salina ou LPS) sobre todos os parâmetros analisados nos testes comportamentais já mencionados e sobre a expressão das proteínas GFAP, Iba1 e sinaptofisina pela técnica de *Western Blotting*. O nível de significância em ambas as etapas considerou valores de  $p$  inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

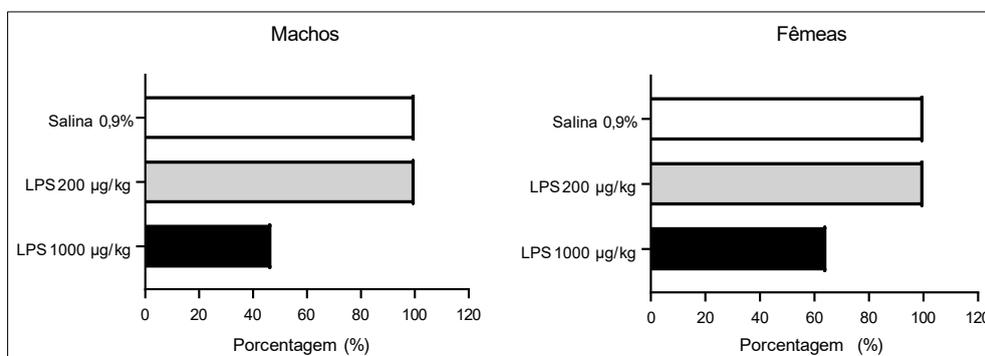
## 6 RESULTADOS

### 6.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE LPS DURANTE O PERÍODO NEONATAL

#### 6.1.1 Taxa de sobrevivência após a aplicação de LPS

Para avaliar o impacto da exposição ao LPS na primeira semana pós-natal, os filhotes foram monitorados quanto a anormalidades representativas de comportamento doentio. Os filhotes LPS apresentaram pele pálida e letargia durante o tratamento, indicando a toxicidade do LPS e sugerindo a ocorrência de um processo inflamatório, como já descrito na literatura (PIRES *et al.*, 2020). A taxa de sobrevivência dos filhotes dos grupos Salina e LPS 0,2 mg/kg foi de 100% após a primeira aplicação no PND3, enquanto a sobrevivência dos animais LPS 1,0 mg/kg foi de 64,4% para as fêmeas e 46,9% para os machos (figura 15). Todas as baixas ocorreram entre os PND3 e 4.

Figura 15 – Taxa de sobrevivência após a primeira aplicação de LPS.



Fonte: autora.

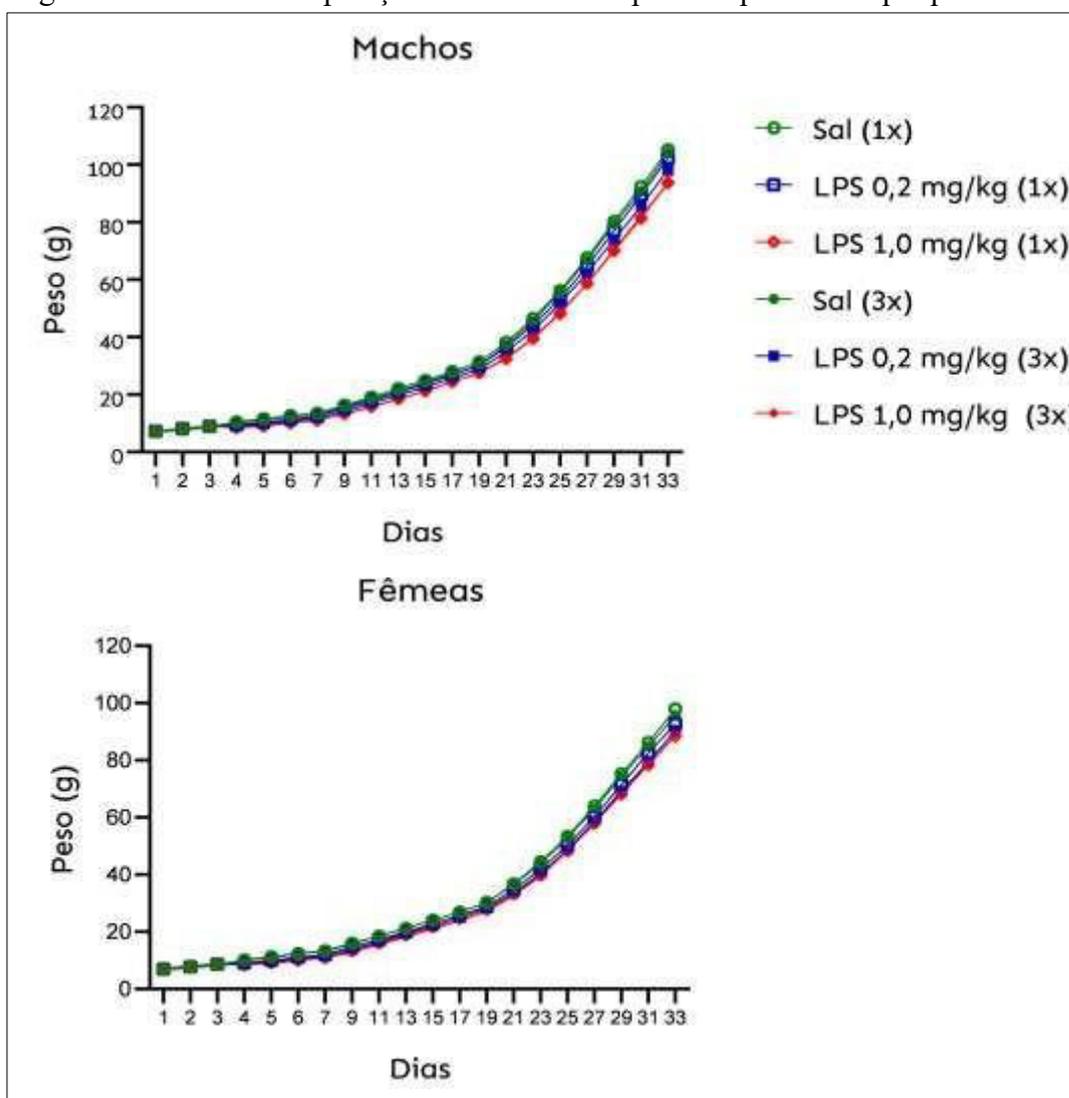
Nota: gráfico comparativo da porcentagem de sobrevivência após a primeira aplicação de LPS no PND3 em ratos machos e fêmeas. O cálculo da porcentagem de sobrevivência foi realizado através da razão entre o número de animais falecidos e o número total de animais que receberam aquele tratamento, multiplicado por 100.

#### 6.1.2 Peso corporal ao longo do tempo

O peso corporal foi diminuído pelo LPS tanto nos filhotes machos quanto nas fêmeas após a sua aplicação no PND3 ( $p < 0,0001$ , figura 16) em comparação à salina. Essa perda de peso causada pelo LPS também evidencia o comportamento doentio demonstrado pelos filhotes na primeira semana pós-natal, após as administrações. O peso reduzido permaneceu

desta forma em animais machos e fêmeas nos quais foi administrado LPS na dose de 1 mg/kg e em fêmeas 3xLPS 0,2 mg/kg, em comparação aos respectivos controles salina, até o PND33 ( $p < 0,0001$ , figura 17), quando foi realizado o teste de comportamento de brincar. É importante lembrar que apesar da diferença de peso entre os grupos, os pares de animais para o teste não diferiram em mais de 20 g no peso corporal pois haviam recebido o mesmo tratamento. Ainda assim, animais machos 1xLPS 0,2 mg/kg e 3xLPS 0,2 mg/kg e fêmeas 1xLPS 0,2 mg/kg foram capazes de recuperar o peso corporal nos PND 15, 33 e 31, respectivamente ( $p < 0,05$ , dados não apresentados).

Figura 16 – Efeito da exposição ao LPS sobre o peso corporal até a peripuberdade.



Fonte: autora.

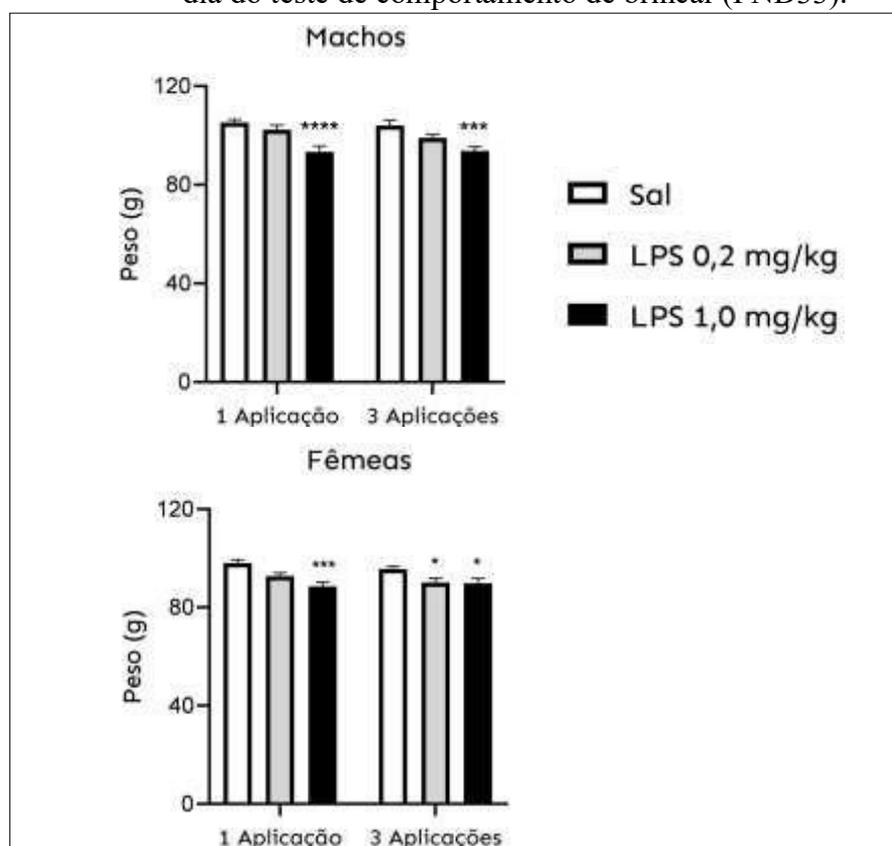
Nota: (A) peso corporal em gramas de animais machos ao longo dos dias. Estatística: ANOVA de duas vias ( $p < 0,0001$  para todos os parâmetros),  $n = 16-18$ . (B) Peso corporal em gramas de animais fêmeas ao longo dos dias. Estatística: ANOVA de duas vias ( $p < 0,0001$  para todos os parâmetros, ver Tabela 1),  $n = 16-18$ . Também foi realizada uma ANOVA de duas vias para cada dia separadamente para verificar diferenças entre grupos (dados não representados graficamente), com pós-teste de Newman-Keuls.

Tabela 1 - Análise de variância de duas vias sobre o peso corporal em animais machos e fêmeas ao longo dos dias (tempo) e submetidos à administração i.p. de LPS (desafio imunológico).

| Parâmetros | Tempo                             | Desafio imunológico               | Interação                          |
|------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Machos     | F (19, 1950) = 7428<br>p < 0,0001 | F (5, 1950) = 117,3<br>p < 0,0001 | F (95, 1950) = 3,961<br>p < 0,0001 |
| Fêmeas     | F (19, 2086) = 7203<br>p < 0,0001 | F (5, 2086) = 74,22<br>p < 0,0001 | F (95, 2086) = 2,132<br>p < 0,0001 |

Fonte: autora.

Figura 17 – Peso corporal de animais expostos ao LPS neonatal no dia do teste de comportamento de brincar (PND33).



Fonte: autora.

Nota: peso em gramas de animais machos (A) e fêmeas (B) no PND33 submetidos à neuroinflamação neonatal com LPS (n = 16-18). Estatística (tabela 2): (A) ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Newman-Keuls. \*\*\*\* p < 0,0001 e \*\*\* p < 0,001 em comparação ao seu respectivo controle salina. (B) ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Newman-Keuls. \*\*\* p < 0,001 e \* p < 0,05 em comparação ao seu respectivo controle salina.

Tabela 2 - Análise de variância de duas vias sobre o peso corporal em animais machos e fêmeas no PND33 submetidos à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao 5 (aplicações).

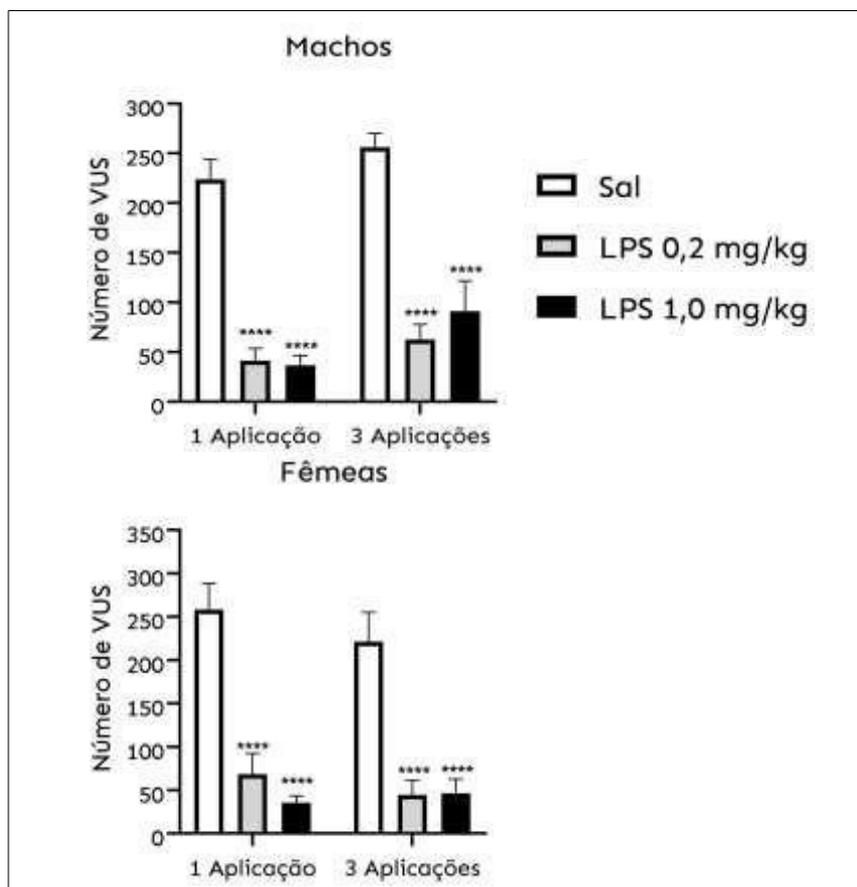
| Parâmetros | Aplicações                        | Desafio imunológico              | Interação                         |
|------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Machos     | F (1, 99) = 0,8117<br>p = 0,3698  | F (2, 99) = 18,57<br>p < 0,0001  | F (2, 99) = 0,4816<br>p = 0,6192  |
| Fêmeas     | F (1, 105) = 0,9742<br>p = 0,3259 | F (2, 105) = 12,46<br>p < 0,0001 | F (2, 105) = 0,9860<br>p = 0,3765 |

Fonte: autora.

### 6.1.3 Número de vocalizações ultrassônicas durante o desafio imunológico

Ainda nas avaliações da primeira semana pós-natal, foram quantificadas as vocalizações ultrassônicas (VUS) emitidas pelos filhotes duas horas após a aplicação dos tratamentos e após separação materna de 10 minutos. No PND3, foi observada uma redução da frequência de VUS nos animais machos e fêmeas tratados tanto com LPS 0,2 mg/kg quanto 1,0 mg/kg ( $p < 0,0001$ , figura 18). Curiosamente, no PND5, 2 horas após a terceira aplicação de salina ou LPS, esses mesmos grupos nas fêmeas obtiveram uma maior frequência de vocalizações quando comparados aos grupos salina, inclusive aqueles que haviam recebido apenas uma aplicação de LPS há 2 dias, no PND3 ( $p < 0,0001$ , figura 19). Em animais machos, apenas os grupos 1xLPS 1,0 mg/kg e 3xLPS 0,2 mg/kg apresentaram maior número de vocalizações quando comparados aos seus respectivos controles salina ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente).

Figura 18 – Efeito da exposição ao LPS sobre o número de VUS duas horas após a aplicação no PND3.



Fonte: autora.

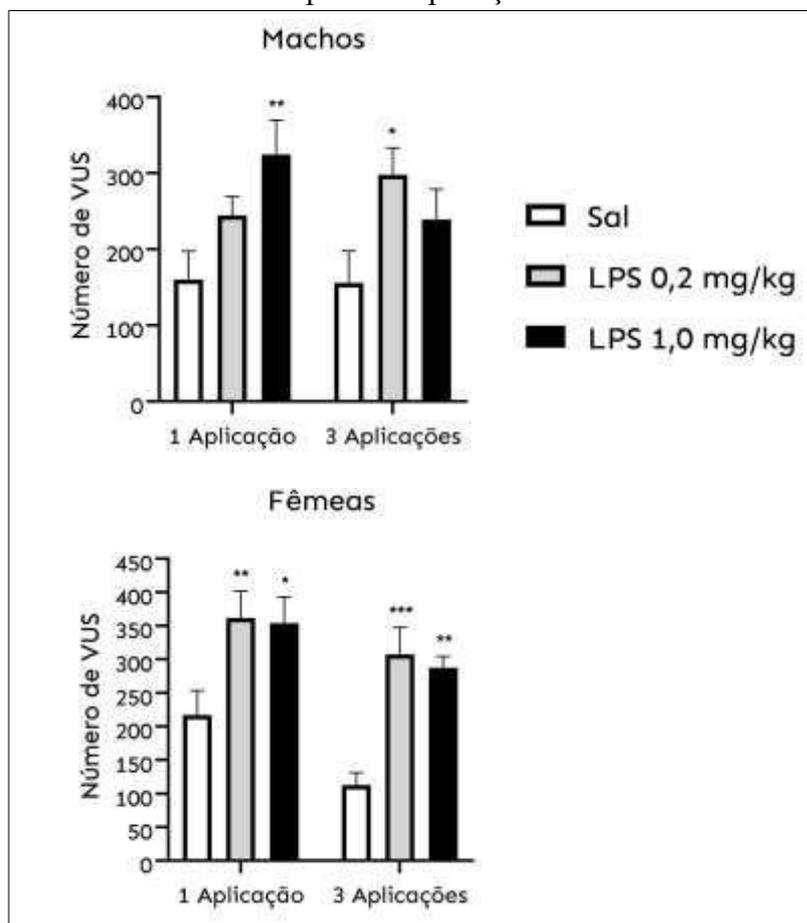
Nota: frequência de vocalizações em animais machos (A) e fêmeas (B) no PND3, duas horas após serem submetidos à administração i.p. de salina ou LPS (n = 16-18). Estatística (tabela 3): ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Newman-Keuls. \*\*\*\* p < 0,0001 em comparação ao seu respectivo controle salina.

Tabela 3 - Análise de variância de duas vias sobre a frequência de vocalizações ultrassônicas em animais machos e fêmeas divididos em grupos quanto à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao 5 (aplicações), duas horas após a primeira aplicação no PND3.

| Parâmetros | Aplicações                       | Desafio imunológico             | Interação                        |
|------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Machos     | F (1, 62) = 6,013<br>p < 0,05    | F (2, 62) = 66,12<br>p < 0,0001 | F (2, 62) = 0,4625<br>p = 0,6319 |
|            | F (1, 63) = 0,8395<br>p = 0,3630 | F (2, 63) = 48,57<br>p < 0,0001 | F (2, 63) = 0,6392<br>p = 0,5311 |

Fonte: autora.

Figura 19 – Efeito da exposição ao LPS sobre o número de VUS duas horas após a 3ª aplicação no PND5.



Fonte: autora.

Nota: frequência de VUS em animais machos (A) e fêmeas (B) no PND5, duas horas após administração i.p. de salina ou LPS (n= 16-18). Estatística (tabela 4): ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Newman-Keuls. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001 em comparação ao seu respectivo controle salina.

Tabela 4 - Análise de variância de duas vias sobre a frequência de vocalizações ultrassônicas em animais machos e fêmeas no PND5 submetidos à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao 5 (aplicações), duas horas após a terceira aplicação no PND5.

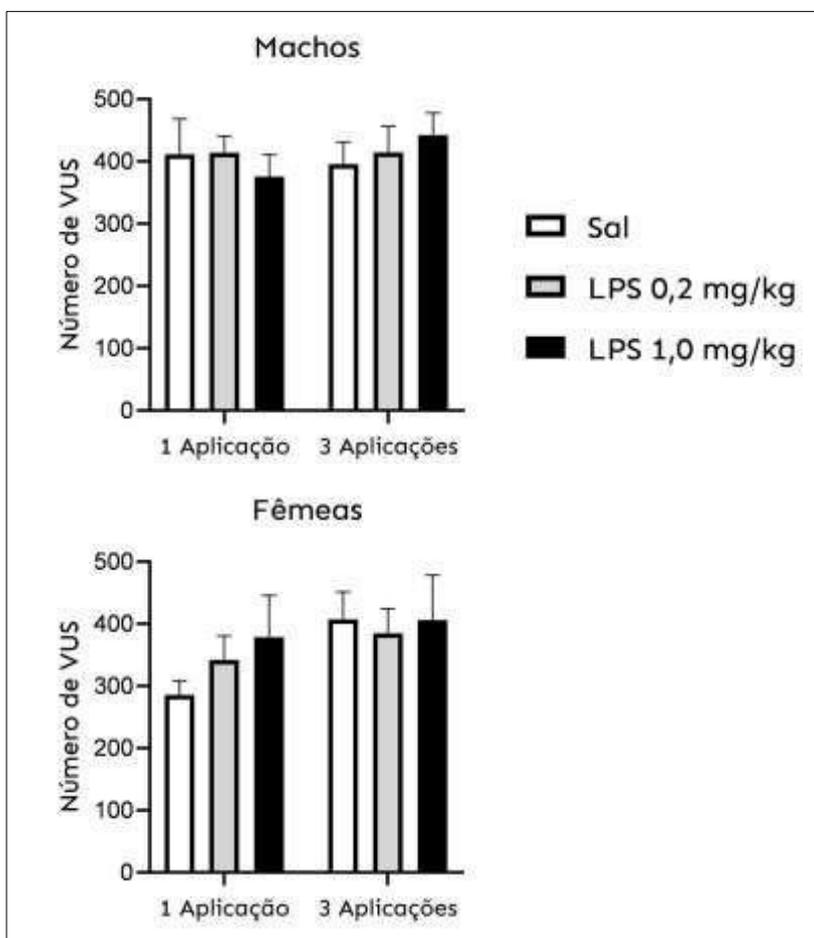
| Parâmetros | Aplicações                       | Desafio imunológico             | Interação                        |
|------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Machos     | F (1, 54) = 0,1525<br>p = 0,6977 | F (2, 54) = 6,577<br>p < 0,001  | F (2, 54) = 1,698<br>p = 0,1928  |
| Fêmeas     | F (1, 54) = 7,621<br>p = 0,0079  | F (2, 54) = 16,05<br>p < 0,0001 | F (2, 54) = 0,3047<br>p = 0,7386 |

Fonte: autora.

### 6.1.4 Número de vocalizações ultrassônicas no PND12

A reavaliação da frequência de VUS no PND12 foi realizada com o objetivo de verificar se as alterações observadas durante o período de tratamento com LPS permaneceriam durante a infância. Não foram observadas diferenças estatísticas entre o número de vocalizações emitidas no PND12, tanto em animais machos ( $p < 0,05$ , figura 20A) quanto em animais fêmeas ( $p < 0,05$ , figura 20B).

Figura 20 – Efeito da exposição neonatal ao LPS sobre o número de VUS no dia pós-natal 12 (PND12) em animais machos e fêmeas.



Fonte: autora.

Nota: frequência de vocalizações em animais machos (A) e fêmeas (B) no PND12 (n = 16-18). Estatística: ANOVA de duas vias (tabela 5) seguida do pós-teste de Newman-Keuls, o qual não revelou diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

Tabela 5 - Análise de variância de duas vias sobre a frequência de vocalizações ultrassônicas em animais machos e fêmeas no PND12 submetidos à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao 5 (aplicações).

| Parâmetros | Aplicações                       | Desafio imunológico               | Interação                        |
|------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Machos     | F (1, 72) = 0,2687<br>p = 0,6058 | F (2, 72) = 0,03191<br>p = 0,9686 | F (2, 72) = 0,6692<br>p = 0,5153 |
| Fêmeas     | F (1, 59) = 2,809<br>p = 0,0990  | F (2, 59) = 0,4923<br>p = 0,6137  | F (2, 59) = 0,6235<br>p = 0,5396 |

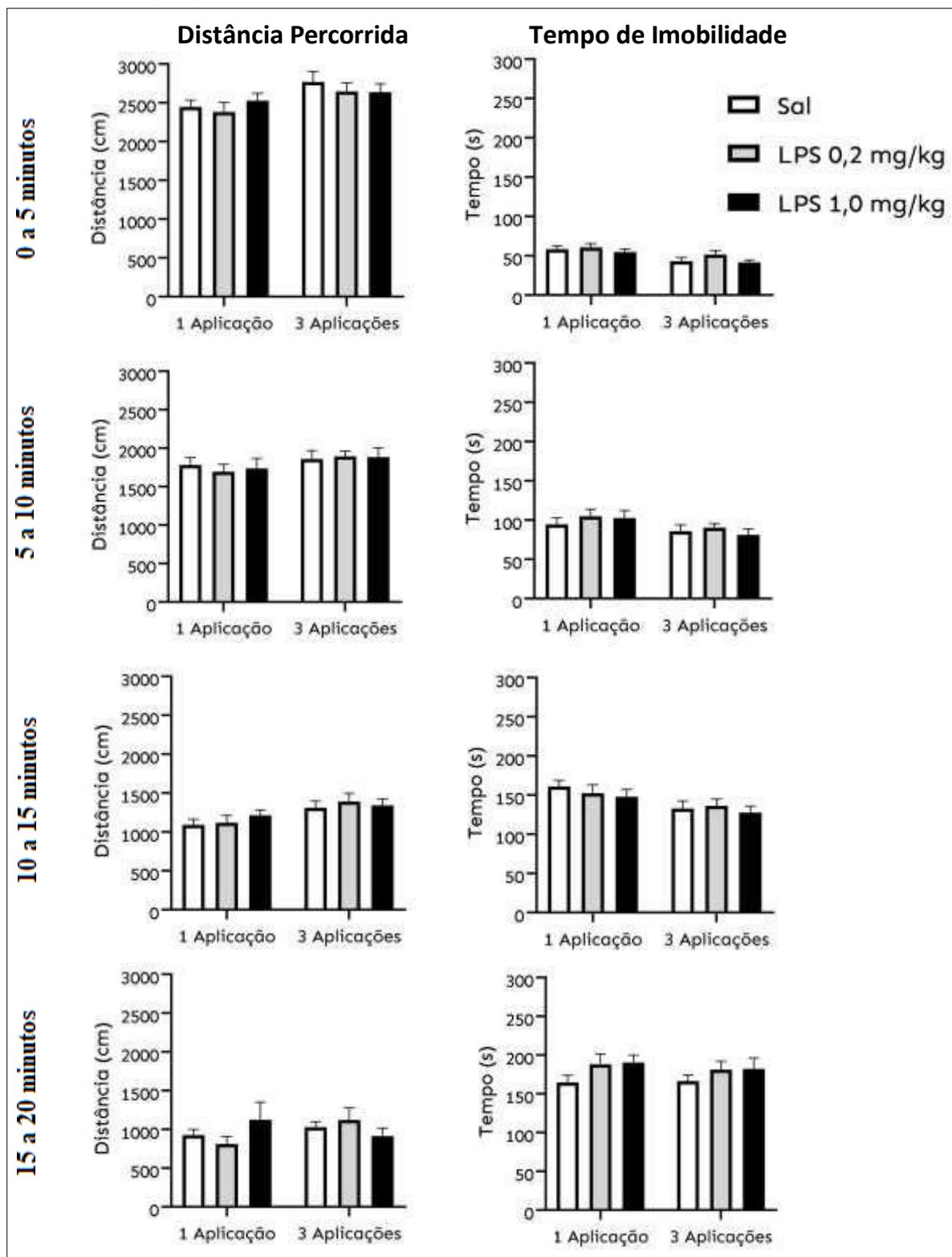
Fonte: autora.

### 6.1.5 Capacidade locomotora no teste de campo aberto nos animais na peripuberdade

O teste no aparato de campo aberto foi realizado para avaliar a capacidade locomotora e exploratória dos animais. Para isso, foram observados os parâmetros distância percorrida (cm) e tempo de imobilidade (s) em intervalos de 5 minutos, por serem inversamente proporcionais (quanto maior a distância percorrida pelo animal, menor o tempo de imobilidade naquele intervalo, e vice-versa). A tendência natural dos animais ao longo dos intervalos é diminuir a exploração e ficarem mais tempo imóveis, à medida que se tornam familiarizados ao aparato.

Os animais machos não apresentaram alterações ( $p > 0,05$ ) entre os grupos LPS e salina em ambos os parâmetros analisados para todos os intervalos de tempos (figura 21). Mesmo assim, pode-se observar que, naturalmente, houve uma diminuição da distância percorrida e aumento do tempo de imobilidade ao longo do tempo em todos os grupos. Em relação às fêmeas, apesar de também ter sido observada essa inversão natural dos parâmetros ao longo do tempo, nos últimos 5 minutos de teste o grupo 3xSAL apresentou maior distância percorrida ( $p < 0,01$ ) e menor tempo de imobilidade ( $p < 0,01$ ) quando comparado ao grupo 1xSAL (figuras 22D e 22H).

Figura 21 – Efeito da exposição neonatal ao LPS sobre os parâmetros distância percorrida (cm) e tempo de imobilidade (s) no teste de campo aberto no PND30 em animais machos.



Fonte: autora.

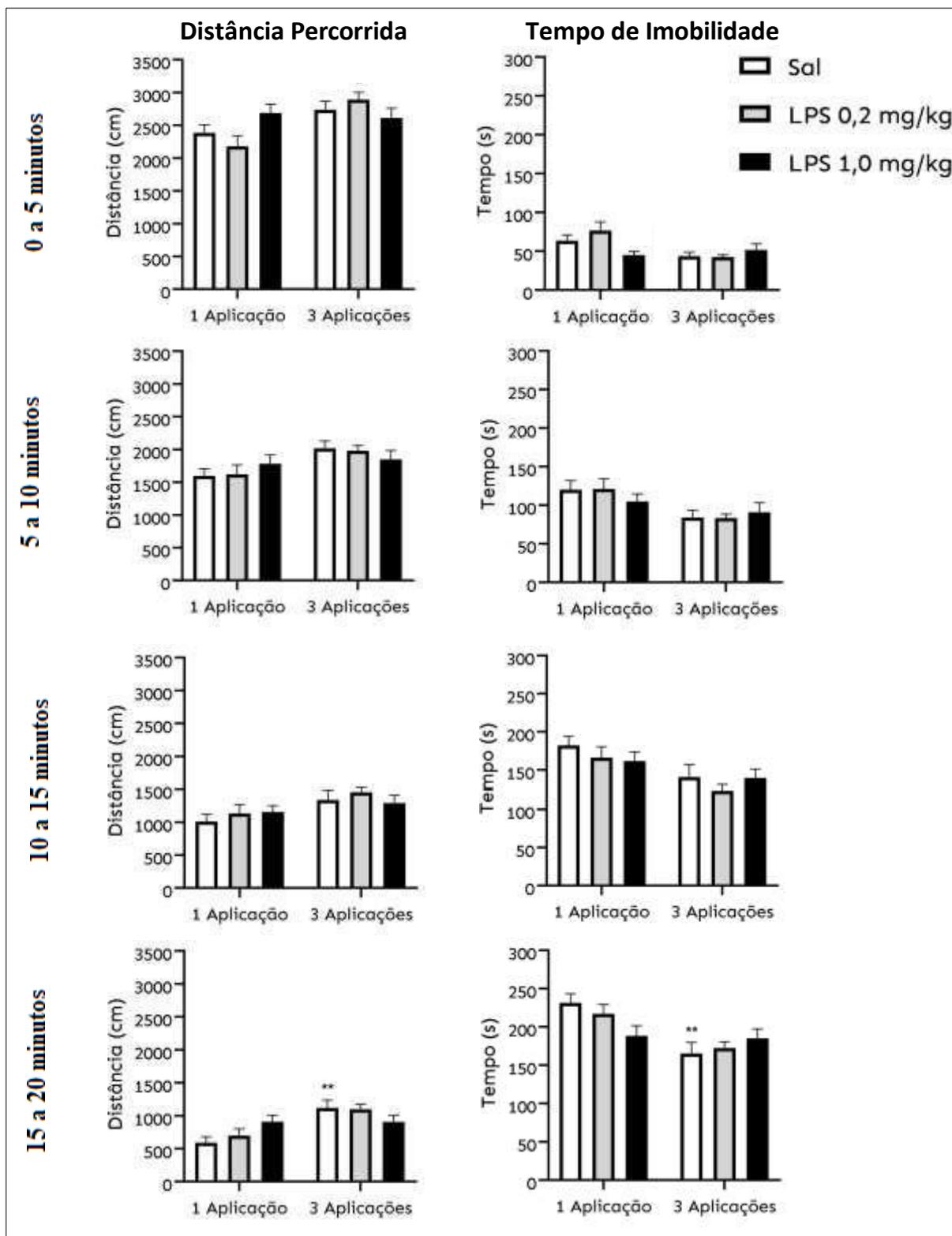
Nota: desempenho dos animais machos no aparato de campo aberto quanto à distância percorrida entre 0 e 5 minutos (A), 5 e 10 minutos (B), 10 e 15 minutos (C) e 15 e 20 minutos (D), e quanto ao tempo de imobilidade entre 0 e 5 minutos (E), 5 e 10 minutos (F), 10 e 15 minutos (G) e 15 e 20 minutos (E). Estatística: ANOVA de duas vias (tabela 6) seguida do pós-teste de Newlman-Keuls, o qual não revelou diferenças estatísticas significativas entre os grupos (n = 16-18).

Tabela 6 - Análise de variância de duas vias sobre a distância percorrida e o tempo de imobilidade em intervalos de 5 minutos em animais **machos** no PND30 submetidos à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao 5 (aplicações).

| Parâmetros                 | Aplicações                       | Desafio imunológico              | Interação                         |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Distância<br>0 a 5 min     | F (1, 89) = 7,800<br>p < 0,01    | F (2, 89) = 0,2294<br>p = 0,7955 | F (2, 89) = 0,4280<br>p = 0,6531  |
| Distância<br>5 a 10 min    | F (1, 89) = 3,233<br>p = 0,0756  | F (2, 89) = 0,4332<br>p = 0,6498 | F (2, 89) = 0,6580<br>p = 0,5204  |
| Distância<br>10 a 15 min   | F (1, 89) = 8,010<br>p < 0,01    | F (2, 89) = 0,2133<br>p = 0,8084 | F (2, 89) = 0,02843<br>p = 0,9720 |
| Distância<br>15 a 20 min   | F (1, 89) = 1,505<br>p = 0,2232  | F (2, 89) = 0,7450<br>p = 0,4777 | F (2, 89) = 0,4939<br>p = 0,6119  |
| Imobilidade<br>0 a 5 min   | F (1, 89) = 12,09<br>p < 0,001   | F (2, 89) = 1,767<br>p = 0,1767  | F (2, 89) = 0,2517<br>p = 0,7780  |
| Imobilidade<br>5 a 10 min  | F (1, 89) = 4,587<br>p < 0,05    | F (2, 89) = 0,9117<br>p = 0,4056 | F (2, 89) = 1,003<br>p = 0,3709   |
| Imobilidade<br>10 a 15 min | F (1, 89) = 8,408<br>p < 0,01    | F (2, 89) = 0,5535<br>p = 0,5769 | F (2, 89) = 0,2254<br>p = 0,7987  |
| Imobilidade<br>15 a 20 min | F (1, 89) = 0,2400<br>p = 0,6254 | F (2, 89) = 2,126<br>p = 0,1253  | F (2, 89) = 0,1172<br>p = 0,8895  |

Fonte: autora.

Figura 22 – Efeito da exposição neonatal ao LPS sobre os parâmetros distância percorrida (cm) e tempo de imobilidade (s) no teste de campo aberto no PND30 em animais **fêmeas**.



Fonte: autora.

Nota: desempenho dos animais machos no aparato de campo aberto quanto à distância percorrida entre 0 e 5 minutos (A), 5 e 10 minutos (B), 10 e 15 minutos (C) e 15 e 20 minutos (D), e quanto ao tempo de imobilidade entre 0 e 5 minutos (E), 5 e 10 minutos (F), 10 e 15 minutos (G) e 15 e 20 minutos (E). Estatística: ANOVA de duas vias (Tabela 7) seguida do pós-teste de Newman-Keuls, \*\*  $p < 0,01$  em relação ao grupo 1xSAL (n = 16-18).

Tabela 7 - Análise de variância de duas vias sobre a distância percorrida e o tempo de imobilidade em intervalos de 5 minutos em animais **fêmeas** no PND30 submetidas à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao 5 (aplicações).

| Parâmetros                 | Aplicações                      | Desafio imunológico                | Interação                         |
|----------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Distância<br>0 a 5 min     | F (1, 100) = 8,569<br>p < 0,001 | F (2, 100) = 0,3776<br>p = 0,6865  | F (2, 100) = 4,094<br>p < 0,05    |
| Distância<br>5 a 10 min    | F (1, 100) = 7,728<br>p < 0,01  | F (2, 100) = 0,00633<br>p = 0,9937 | F (2, 100) = 1,176<br>p = 0,3126  |
| Distância<br>10 a 15 min   | F (1, 100) = 7,497<br>p < 0,01  | F (2, 100) = 0,5167<br>p = 0,5981  | F (2, 100) = 0,4204<br>p = 0,6579 |
| Distância<br>15 a 20 min   | F (1, 100) = 13,95<br>p < 0,001 | F (2, 100) = 0,1572<br>p = 0,8548  | F (2, 100) = 3,788<br>p < 0,05    |
| Imobilidade<br>0 a 5 min   | F (1, 100) = 7,282<br>p < 0,01  | F (2, 100) = 1,171<br>p = 0,3141   | F (2, 100) = 4,040<br>p < 0,05    |
| Imobilidade<br>5 a 10 min  | F (1, 100) = 10,84<br>p < 0,01  | F (2, 100) = 0,1084<br>p = 0,8974  | F (2, 100) = 0,7540<br>p = 0,4731 |
| Imobilidade<br>10 a 15 min | F (1, 100) = 11,01<br>p < 0,01  | F (2, 100) = 0,8013<br>p = 0,4516  | F (2, 100) = 0,3759<br>p = 0,6876 |
| Imobilidade<br>15 a 20 min | F (1, 100) = 13,92<br>p < 0,001 | F (2, 100) = 0,4668<br>p = 0,6284  | F (2, 100) = 3,345<br>p < 0,05    |

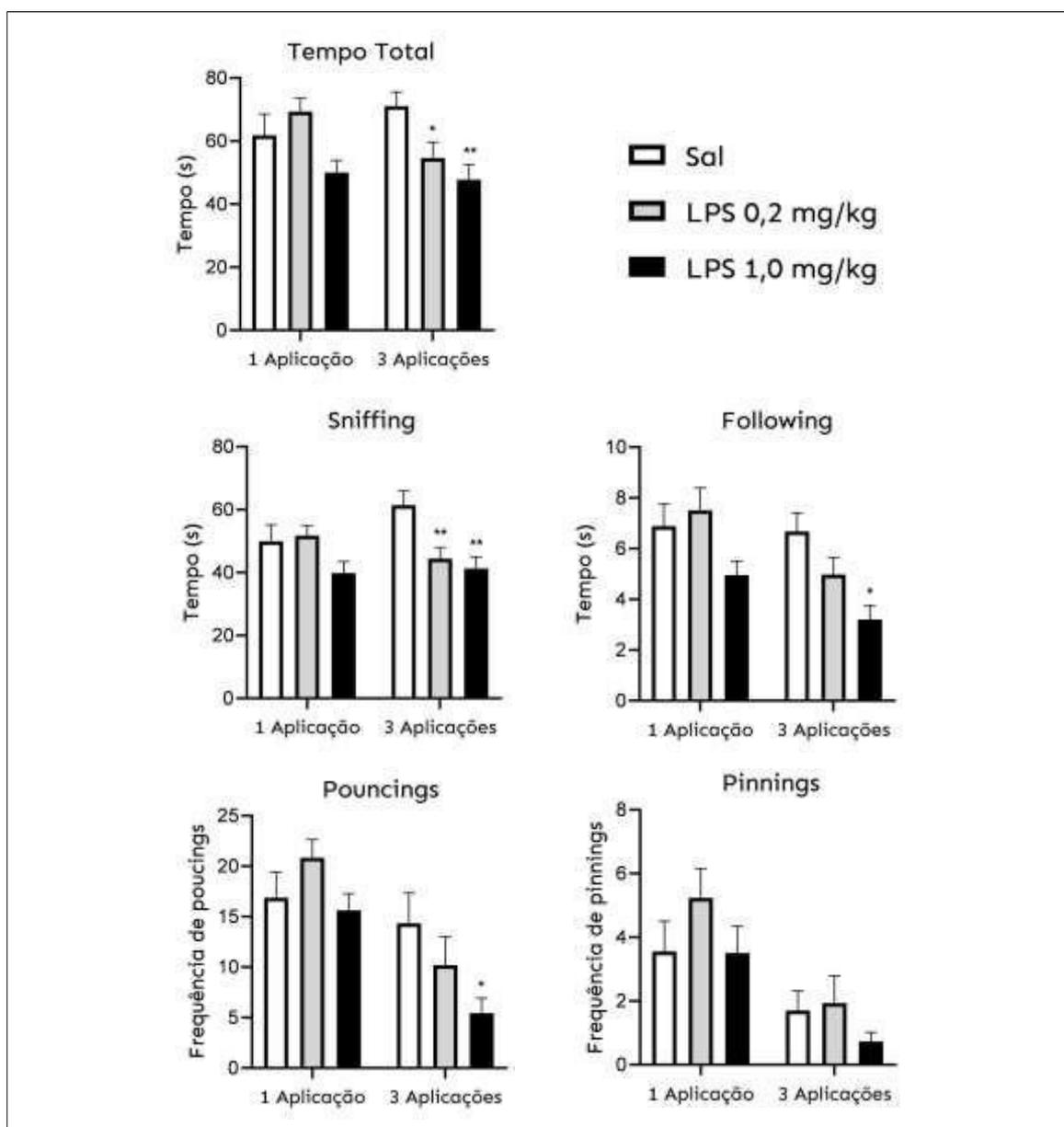
Fonte: autora.

### 6.1.6 Comportamento de brincar nos animais na peripuberdade

Em animais machos, o grupo 3xLPS 0,2 mg/kg, apresentou menor tempo cheirando ( $p < 0,01$ , figura 23B) e, em consequência, menor tempo total de interação ( $p < 0,05$ , figura 23A) em comparação ao seu respectivo controle 3xSAL. O grupo que demonstrou mais alterações no comportamento social foram os animais 3xLPS 1,0 mg/kg, os quais tiveram menor tempo seguindo ( $p < 0,05$ , figura 23C), cheirando ( $p < 0,01$ , figura 23B) e de interação total ( $p < 0,01$ , figura 23A), além de uma menor frequência de *pouncings* ( $p < 0,05$ , figura 23D). Os demais grupos LPS 1x não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle 1x salina ( $p < 0,05$ , figura 23).

Em animais fêmeas, não foram observadas muitas diferenças em relação ao comportamento de brincar entre animais salina e LPS (figura 24). Apenas o grupo que sofreu exposição ao LPS por 3 dias consecutivos na dose mais alta (1,0 mg/kg) passou menos tempo seguindo o animal parceiro (figura 24C) e teve menor frequência de comportamento *pouncings* (figura 24D) em relação ao controle 3xSAL.

Figura 23 – Efeito da exposição neonatal ao LPS sobre o comportamento de brincar no PND33 em animais **machos**.



Fonte: autora.

Nota: desempenho dos animais machos submetidos à neuroinflamação neonatal com LPS no teste de comportamento de brincar sobre os parâmetros: (A) tempo total de interação entre os animais. (B) tempo gasto cheirando o animal parceiro. (C) tempo gasto seguindo o animal parceiro. (D) frequência do comportamento “pouncing”. (E) frequência do comportamento “pinning”. Estatística: ANOVA de duas vias (tabela 8) seguida do pós-teste de Newman-Keuls, \* p < 0,05 e \*\* p < 0,01 em relação ao grupo 3xSAL (n = 16-18).

Tabela 8 - Análise de variância de duas vias sobre os parâmetros do teste de comportamento de brincar em animais **machos** no PND33 submetidos à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao 5 (aplicações).

| Parâmetros                     | Aplicações                       | Desafio imunológico             | Interação                        |
|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Tempo Total                    | F (1, 94) = 0,3972<br>p = 0,5301 | F (2, 94) = 6,315<br>p < 0,01   | F (2, 94) = 2,992<br>p = 0,0550  |
| <i>Sniffing</i><br>(Cheirando) | F (1, 92) = 0,3070<br>p = 0,5808 | F (2, 92) = 6,670<br>p < 0,01   | F (2, 92) = 2,770<br>p = 0,0679  |
| <i>Following</i><br>(Seguindo) | F (1, 91) = 6,171<br>p < 0,05    | F (2, 91) = 7,292<br>p < 0,01   | F (2, 91) = 1,340<br>p = 0,2669  |
| <i>Poucing</i>                 | F (1, 94) = 16,38<br>p < 0,001   | F (2, 94) = 2,865<br>p = 0,0620 | F (2, 94) = 1,945<br>p = 0,1488  |
| <i>Pinning</i>                 | F (1, 91) = 16,39<br>p < 0,001   | F (2, 91) = 1,708<br>p = 0,1871 | F (2, 91) = 0,4465<br>p = 0,6413 |

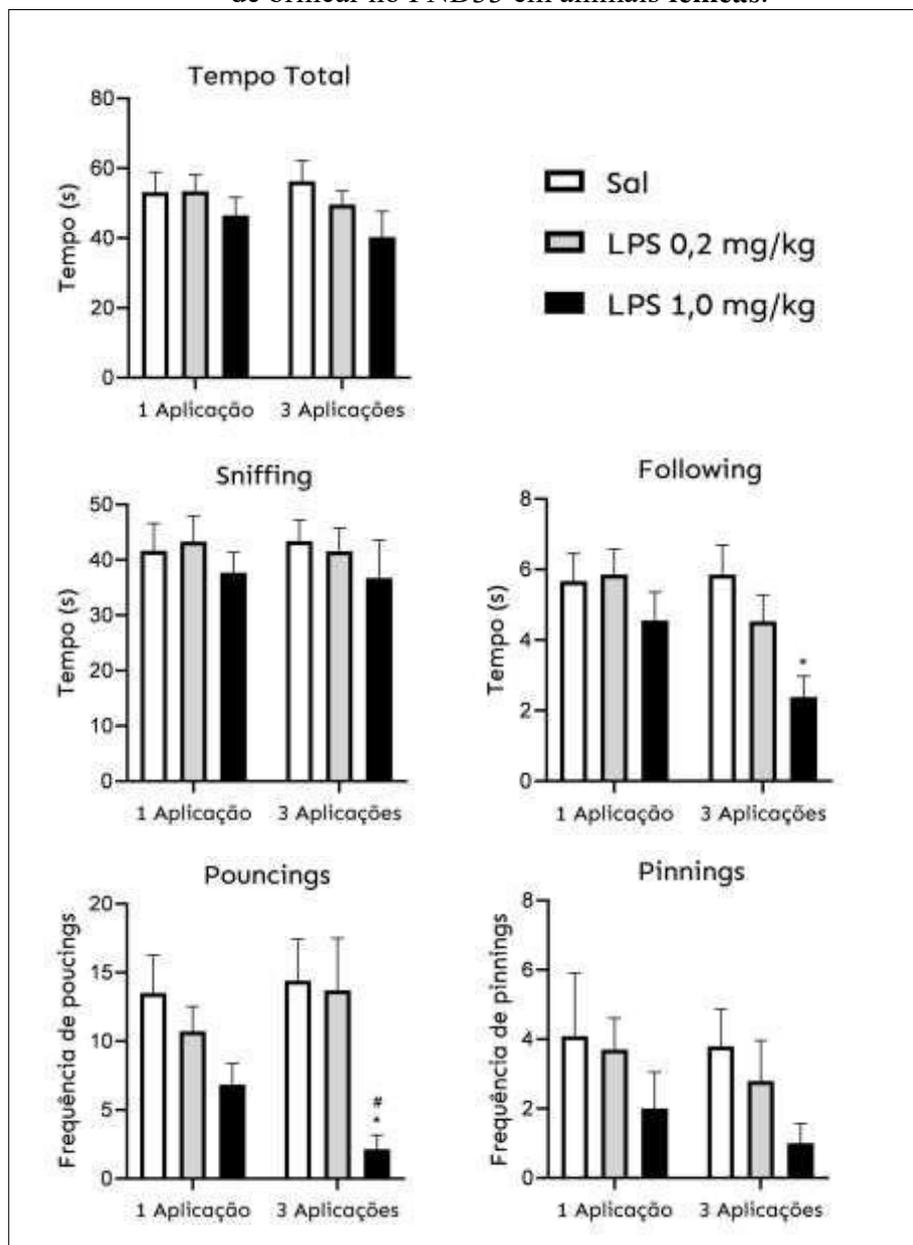
Fonte: autora.

Tabela 9 - Análise de variância de duas vias sobre os parâmetros do teste de comportamento de brincar em animais **fêmeas** no PND33 submetidas à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao 5 (aplicações).

| Parâmetros                     | Aplicações                         | Desafio imunológico              | Interação                         |
|--------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Tempo Total                    | F (1, 56) = 0,2598<br>p = 0,6123   | F (2, 56) = 2,186<br>p = 0,1219  | F (2, 56) = 0,3823<br>p = 0,6841  |
| <i>Sniffing</i><br>(Cheirando) | F (1, 54) = 0,007137<br>p = 0,9330 | F (2, 54) = 0,8349<br>p = 0,4394 | F (2, 54) = 0,07767<br>p = 0,9254 |
| <i>Following</i><br>(Seguindo) | F (1, 57) = 3,059<br>p = 0,0857    | F (2, 57) = 4,633<br>p < 0,05    | F (2, 57) = 1,199<br>p = 0,3090   |
| <i>Poucing</i>                 | F (1, 56) = 0,01622<br>p = 0,8991  | F (2, 56) = 6,989<br>p < 0,01    | F (2, 56) = 1,077<br>p = 0,3475   |
| <i>Pinning</i>                 | F (1, 55) = 0,5319<br>p = 0,4689   | F (2, 55) = 2,089<br>p = 0,1335  | F (2, 55) = 0,04990<br>p = 0,9514 |

Fonte: autora.

Figura 24 – Efeito da exposição neonatal ao LPS sobre o comportamento de brincar no PND33 em animais fêmeas.



Fonte: autora.

Nota: desempenho dos animais fêmeas submetidas à neuroinflamação neonatal com LPS no teste de comportamento de brincar sobre os parâmetros: (A) tempo total de interação entre os animais. (B) tempo gasto cheirando o animal parceiro. (C) tempo gasto seguindo o animal parceiro. (D) frequência do comportamento “pouncing”. (E) frequência do comportamento “pinning”. Estatística: ANOVA de duas vias (tabela 9) seguida do pós-teste de Newman-Keuls, \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo 3xSAL; #  $p < 0,05$  em relação ao grupo 3xLPS 0,2 mg/kg (n = 16-18).

### 6.1.7 Expressão das proteínas GFAP e sinaptofisina no córtex pré-frontal dos animais na peripuberdade por *Western Blotting*

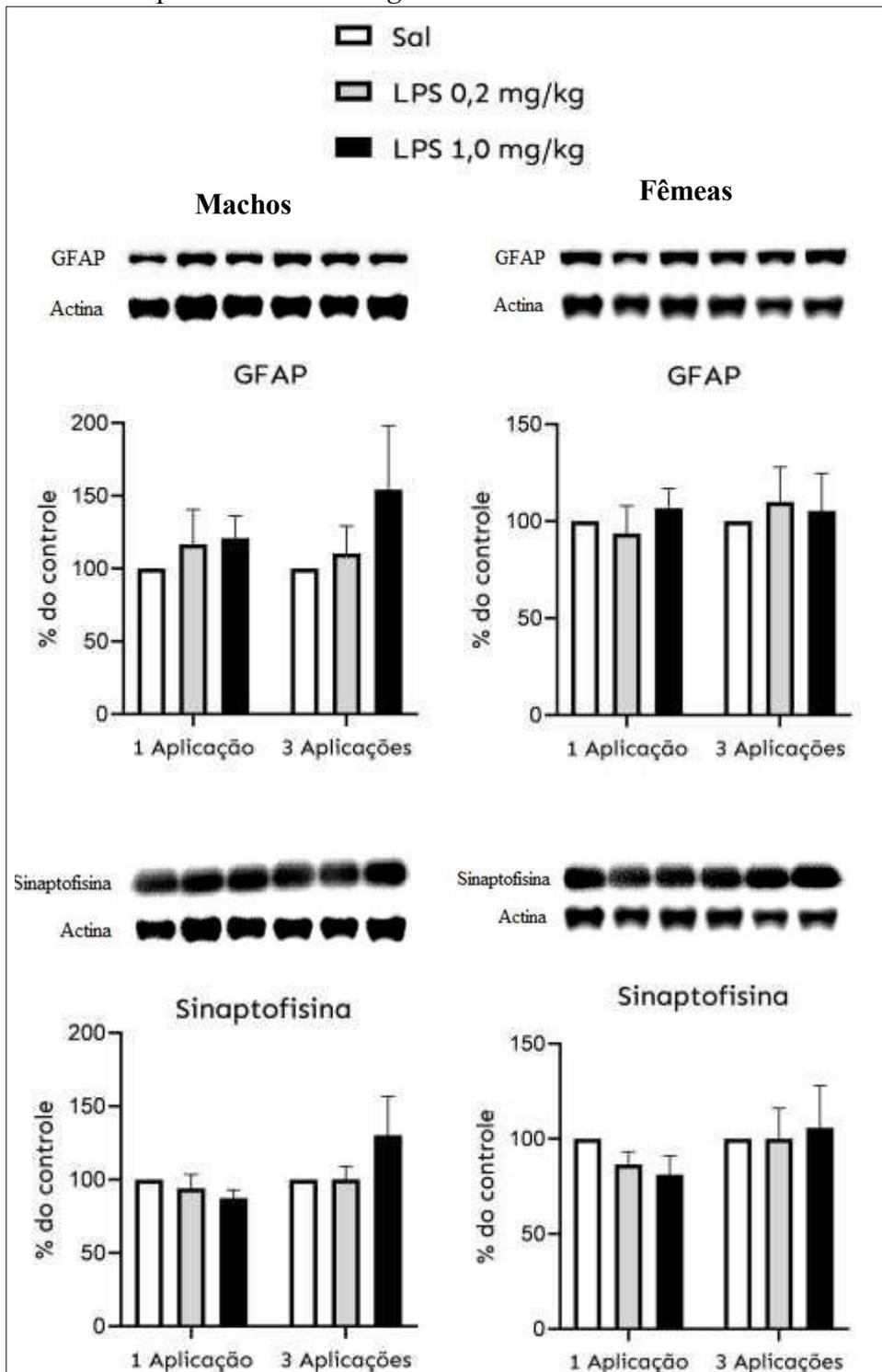
O desafio imunológico com LPS no período neonatal não alterou estatisticamente a quantificação da expressão das proteínas GFAP ou sinaptofisina no córtex pré-frontal tanto em animais machos ( $p < 0,05$ , figuras 25A e 25B) quanto em animais fêmeas ( $p < 0,05$ , figuras 25C e 25D) durante a peripuberdade, em nenhuma das doses e aplicações testadas, em comparação ao tratamento com salina (análise estatística: tabela 10).

Tabela 10 - Análise de variância de duas vias sobre a quantificação de proteínas por *Western Blotting* em animais machos e fêmeas no PND33 submetidos à administração i.p. de LPS (desafio imunológico) no período neonatal em 1 aplicação no PND3 ou 3 aplicações do PND3 ao 5 (aplicações).

| Parâmetros                | Aplicações                       | Desafio imunológico              | Interação                        |
|---------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| GFAP<br>(machos)          | F (1, 33) = 0,3440<br>p = 0,5615 | F (2, 33) = 2,079<br>p = 0,1411  | F (2, 33) = 0,5893<br>p = 0,5604 |
| Sinaptofisina<br>(Machos) | F (1, 29) = 3,396<br>p = 0,0756  | F (2, 29) = 0,6184<br>p = 0,5458 | F (2, 29) = 2,216<br>p = 0,1272  |
| GFAP<br>(Fêmeas)          | F (1, 26) = 0,2516<br>p = 0,6202 | F (2, 26) = 0,1308<br>p = 0,8780 | F (2, 26) = 0,3213<br>p = 0,7280 |
| Sinaptofisina<br>(Fêmeas) | F (1, 30) = 1,640<br>p = 0,2101  | F (2, 30) = 0,1960<br>p = 0,8230 | F (2, 30) = 0,5154<br>p = 0,6024 |

Fonte: autora.

Figura 25 – Efeito da exposição neonatal ao LPS sobre a quantificação das proteínas GFAP e Sinaptofisina em animais machos e fêmeas por *Western Blotting*.



Fonte: autora.

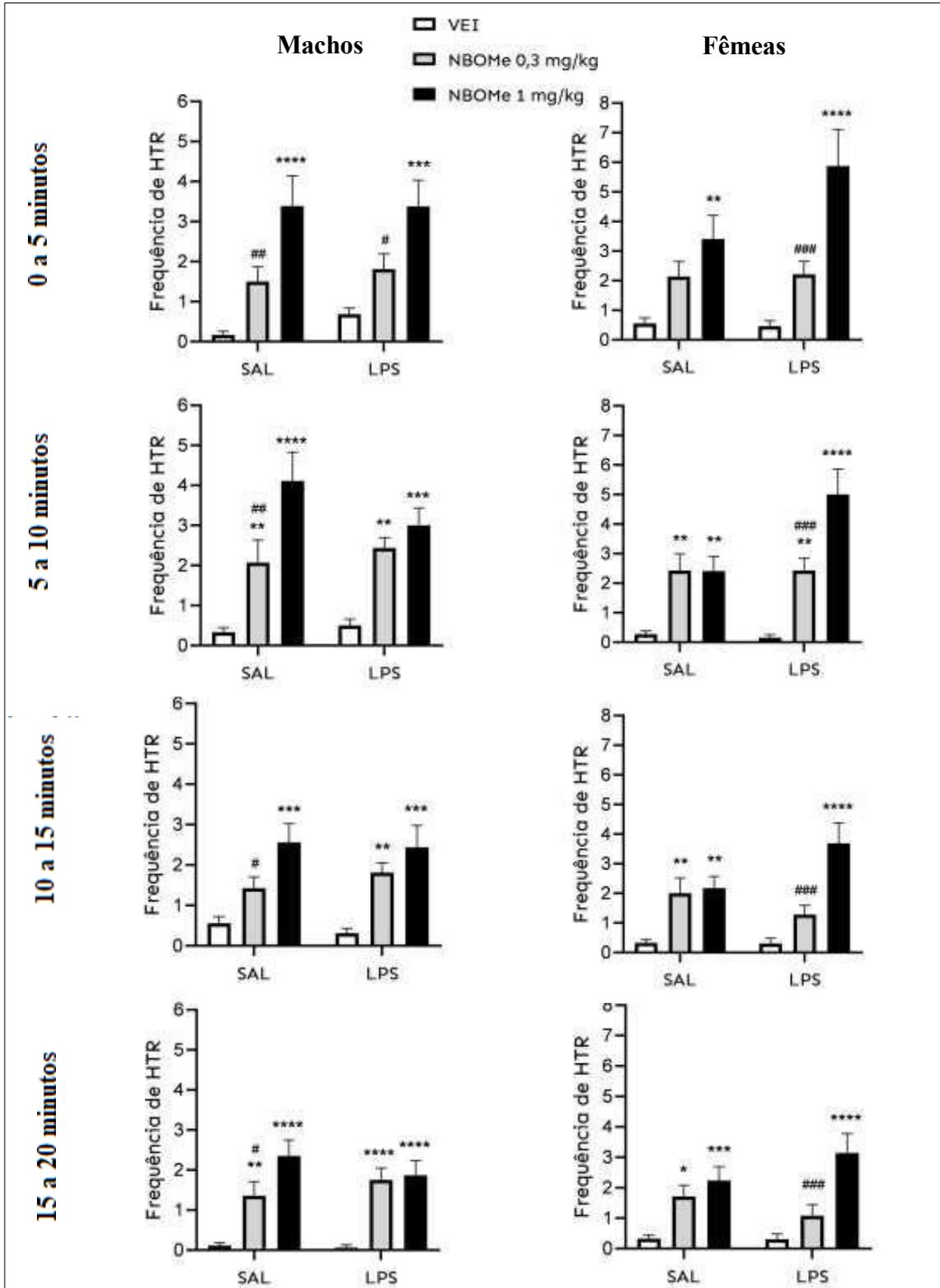
Nota: expressão de GFAP no córtex pré-frontal de machos (A) e fêmeas (C) submetidos à neuroinflamação neonatal com LPS. Em seguida, temos a expressão de sinaptofisina no córtex pré-frontal de machos (B) e fêmeas (D) submetidos à neuroinflamação neonatal com LPS. Coleta de estruturas encefálicas realizada na peripuberdade (PND33). Estatística: ANOVA de duas vias, ver tabela 10 (n = 6).

## 6.2 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO AGUDO COM 25H-NBOMe SOBRE O COMPORTAMENTO DE ANIMAIS NA PERIPUBERDADE SUBMETIDOS À NEUROINFLAMAÇÃO NEONATAL

### 6.2.1 Frequência de contrações da cabeça (HTR)

A frequência dos movimentos HTR indica os estímulos alucinógenos causados por uma substância psicodélica. O teste demonstrou que o 25H-NBOMe foi capaz de induzir o aumento da frequência desses movimentos em ambas as doses e durante todos os intervalos de tempo do teste tanto em animais machos quanto em animais fêmeas, em comparação ao veículo (figura 26). É interessante observar também que a dose de 1,0 mg/kg causou mais movimentos HTR do que a dose inferior de 0,3 mg/kg em animais machos salina e animais fêmeas LPS em todos os intervalos de tempo do teste. Porém, não houve diferença na frequência de HTR entre as doses de 25H-NBOMe em animais machos LPS após os 5 primeiros minutos de teste, nem em animais fêmeas salina durante todo o teste.

Figura 26 – Efeito do tratamento agudo com 25H-NBOMe sobre a frequência dos movimentos HTR na peripuberdade em animais machos e fêmeas.



Fonte: autora.

Nota: desempenho dos animais machos e fêmeas nos testes de movimentos HTR. Estatística: ANOVA de duas vias (tabelas 11 e 12) seguida do pós-teste de Newman-Keuls, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em comparação ao seu respectivo controle veículo (salina ou LPS), #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  e ####  $p < 0,0001$  em comparação ao seu respectivo grupo NBOMe 1,0 mg/kg (salina ou LPS) (n = 16-18).

Tabela 11 - Análise de variância de duas vias sobre a frequência dos movimentos HTR em intervalos de 5 minutos em animais **machos** submetidos à neuroinflamação neonatal com LPS (desafio imunológico) e tratados com 25H-NBOMe na peripuberdade (tratamento NBOMe).

| Parâmetros         | Tratamento NBOMe                | Desafio imunológico               | Interação                        |
|--------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| HTR<br>0 a 5 min   | F (2, 92) = 19,84<br>p < 0,0001 | F (1, 92) = 0,4826<br>p = 0,4890  | F (2, 92) = 0,1634<br>p = 0,8495 |
| HTR<br>5 a 10 min  | F (2, 92) = 26,84<br>p < 0,0001 | F (1, 92) = 0,2881<br>p = 0,5927  | F (2, 92) = 1,682<br>p = 0,1916  |
| HTR<br>10 a 15 min | F (2, 92) = 18,95<br>p < 0,0001 | F (1, 92) = 0,0007<br>p = 0,9784  | F (2, 92) = 0,4486<br>p = 0,6399 |
| HTR<br>15 a 20 min | F (2, 90) = 27,83<br>p < 0,0001 | F (1, 90) = 0,04127<br>p = 0,8395 | F (2, 90) = 1,151<br>p = 0,3210  |

Fonte: autora.

Tabela 12 - Análise de variância de duas vias sobre a frequência dos movimentos HTR em intervalos de 5 minutos em animais **fêmeas** submetidas à neuroinflamação neonatal com LPS (desafio imunológico) e tratadas com 25H-NBOMe na peripuberdade (tratamento NBOMe).

| Parâmetros         | Tratamento NBOMe                | Desafio imunológico               | Interação                       |
|--------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| HTR<br>0 a 5 min   | F (2, 86) = 18,66<br>p < 0,0001 | F (1, 86) = 2,045<br>p = 0,1564   | F (2, 86) = 2,206<br>p = 0,1164 |
| HTR<br>5 a 10 min  | F (2, 86) = 24,78<br>p < 0,0001 | F (1, 86) = 3,892<br>p = 0,0517   | F (2, 86) = 4,713<br>p < 0,05   |
| HTR<br>10 a 15 min | F (2, 86) = 20,14<br>p < 0,0001 | F (1, 86) = 0,5616<br>p = 0,4556  | F (2, 86) = 3,762<br>p < 0,05   |
| HTR<br>15 a 20 min | F (2, 82) = 19,37<br>p < 0,0001 | F (1, 82) = 0,06823<br>p = 0,7946 | F (2, 82) = 1,937<br>p = 0,1507 |

Fonte: autora.

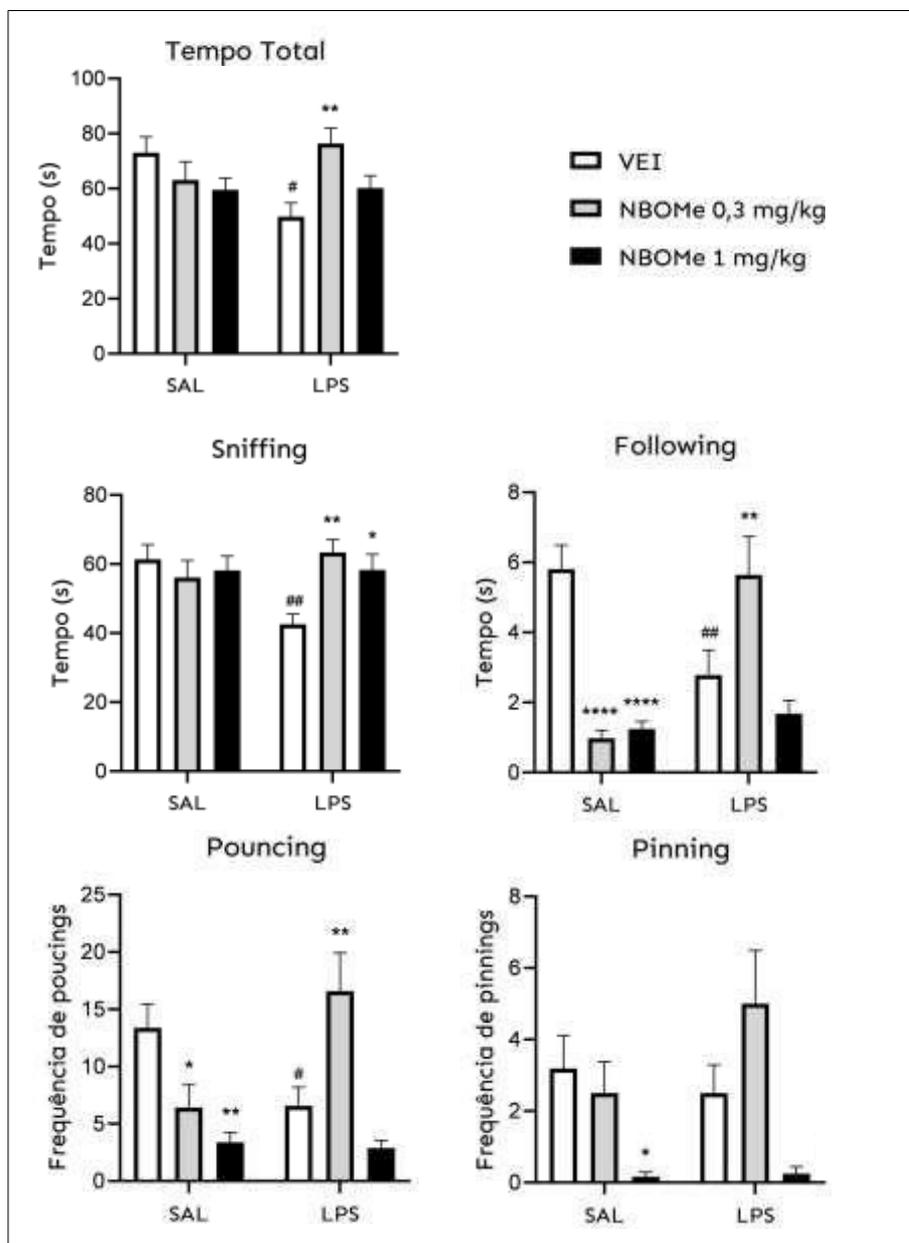
### 6.2.2 Comportamento de brincar

Em animais machos, o tratamento com 25H-NBOMe na dose de 0,3 mg/kg foi capaz de reverter os prejuízos causados pela inflamação neonatal com LPS, aumentando a frequência de *pouncings* (p < 0,01, figura 28D) e os tempos total (p < 0,01, figura 28A), cheirando

( $p < 0,01$ , figura 28B) e seguindo ( $p < 0,01$ , figura 28C) o animal parceiro. Entretanto, em animais salina, essa mesma dose causou a redução do tempo seguindo ( $p < 0,0001$ , figura 28C) e a frequência de *pouncings* ( $p < 0,05$ , figura 28D). Além disso, a dose mais alta de 25H-NBOMe também afetou animais salina reduzindo o tempo gasto seguindo ( $p < 0,0001$ , figura 28C) e as frequências de *pouncings* ( $p < 0,01$ , figura 28D) e *pinnings* ( $p < 0,05$ , figura 28E). Apesar de a dose de 1,0 mg/kg de 25H-NBOMe ter aumentado o tempo cheirando em animais LPS ( $p < 0,05$ , figura 25B), ela também reduziu o número de *pinnings* nesses animais.

Em animais fêmeas, apesar de o desafio imunológico ter tido efeito em diminuir os parâmetros de seguir ( $p < 0,01$ , tabela 14, figura 29C) e *pouncings* ( $p < 0,05$ , tabela 14, figura 29D), o pós-teste não revelou nenhuma diferença entre os grupos. Além disso, o tratamento agudo com 25H-NBOMe não causou nenhum efeito nos parâmetros avaliados no teste ( $p > 0,05$ , figura 29) em nenhuma das doses avaliadas.

Figura 27 – Efeito do tratamento agudo com 25H-NBOMe sobre o comportamento de brincar na peripuberdade em animais machos.



Fonte: autora.

Nota: desempenho dos animais machos submetidos à neuroinflamação neonatal com LPS no teste de comportamento de brincar após tratamento agudo com 25H-NBOMe sobre os parâmetros: (A) tempo total de interação entre os animais. (B) tempo gasto cheirando o animal parceiro. (C) tempo gasto seguindo o animal parceiro. (D) frequência do comportamento “pouncing”. (E) frequência do comportamento “pinning”. Estatística: ANOVA de duas vias (tabela 13) seguida do pós-teste de Newman-Keuls, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao seu respectivo controle veículo (salina ou LPS). Em (A), (B), (C) e (D): #  $p < 0,05$  e ##  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sal-Vei ( $n = 16-18$ ).

Tabela 13 - Análise de variância de duas vias sobre os parâmetros do teste de comportamento de brincar em animais **machos** submetidos à neuroinflamação neonatal com LPS (desafio imunológico) e tratados na peripuberdade com 25H-NBOMe (tratamento NBOMe).

| Parâmetros                     | Tratamento NBOMe                | Desafio imunológico              | Interação                       |
|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Tempo Total                    | F (2, 90) = 1,963<br>p = 0,1463 | F (1, 90) = 0,5189<br>p = 0,4732 | F (2, 90) = 6,048<br>p < 0,01   |
| <i>Sniffing</i><br>(Cheirando) | F (2, 90) = 1,940<br>p = 0,1497 | F (1, 90) = 1,247<br>p = 0,2672  | F (2, 90) = 5,142<br>p < 0,01   |
| <i>Following</i><br>(Seguindo) | F (2, 91) = 10,58<br>p < 0,0001 | F (1, 91) = 1,752<br>p = 0,1889  | F (2, 91) = 17,71<br>p < 0,0001 |
| <i>Poucing</i>                 | F (2, 87) = 11,46<br>p < 0,0001 | F (1, 87) = 0,3749<br>p = 0,5420 | F (2, 87) = 9,714<br>p < 0,001  |
| <i>Pinning</i>                 | F (2, 87) = 10,79<br>p < 0,0001 | F (1, 87) = 0,9339<br>p = 0,3365 | F (2, 87) = 2,019<br>p = 0,1390 |

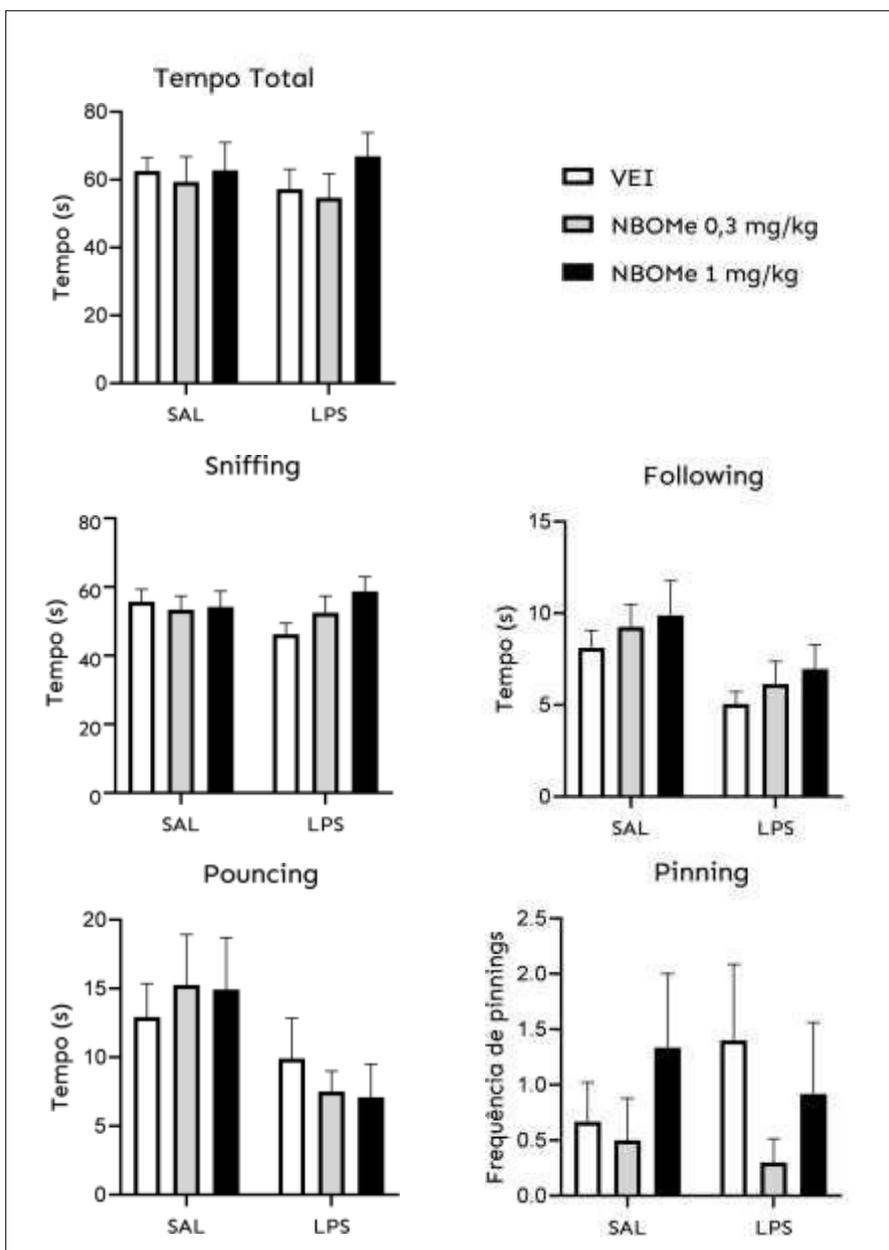
Fonte: autora.

Tabela 14 - Análise de variância de duas vias sobre os parâmetros do teste de comportamento de brincar em animais **fêmeas** submetidas à neuroinflamação neonatal com LPS (desafio imunológico) e tratadas na peripuberdade com 25H-NBOMe (tratamento NBOMe).

| Parâmetros                     | Tratamento NBOMe                  | Desafio imunológico                | Interação                          |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Tempo Total                    | F (2, 68) = 0,6754<br>p = 0,5124  | F (1, 68) = 0,1357<br>p = 0,7137   | F (2, 68) = 0,3474<br>p = 0,7078   |
| <i>Sniffing</i><br>(Cheirando) | F (2, 88) = 0,9287<br>p = 0,3989  | F (1, 88) = 0,3241<br>p = 0,5706   | F (2, 88) = 1,509<br>p = 0,2267    |
| <i>Following</i><br>(Seguindo) | F (2, 62) = 1,172<br>p = 0,3164   | F (1, 62) = 8,348<br>p < 0,01      | F (2, 62) = 0,002872<br>p = 0,9971 |
| <i>Poucing</i>                 | F (2, 59) = 0,01305<br>p = 0,9870 | F (1, 59) = 6,713<br>p < 0,05      | F (2, 59) = 0,4610<br>p = 0,6329   |
| <i>Pinning</i>                 | F (2, 58) = 0,9484<br>p = 0,3933  | F (1, 58) = 0,007431<br>p = 0,9316 | F (2, 58) = 0,6482<br>p = 0,5267   |

Fonte: autora.

Figura 28 – Efeito do tratamento agudo com 25H-NBOMe sobre o comportamento de brincar na peripuberdade em animais fêmeas.



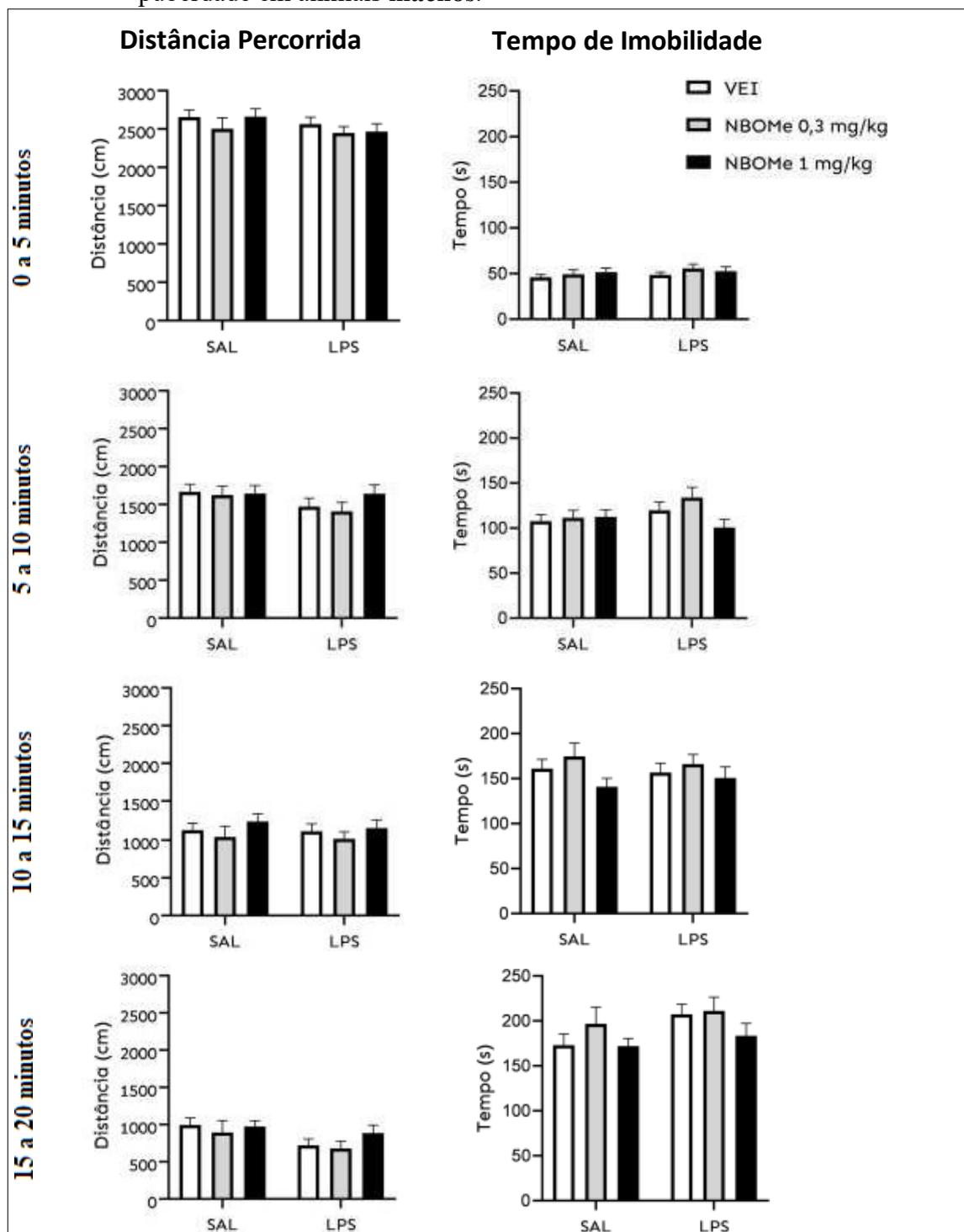
Fonte: autora.

Nota: desempenho de animais fêmeas submetidas à neuroinflamação neonatal com LPS no teste de comportamento de brincar após tratamento agudo com 25H-NBOMe sobre os parâmetros: (A) tempo total de interação entre os animais. (B) tempo gasto cheirando o animal parceiro. (C) tempo gasto seguindo o animal parceiro. (D) frequência do comportamento “pouncing”. (E) frequência do comportamento “pinning”. Estatística: ANOVA de duas vias (tabela 14) seguida do pós-teste de Newman-Keuls, o qual não revelou diferenças estatísticas entre grupos ( $p < 0,05$ ,  $n = 16-18$ ).

### 6.2.3 Capacidade locomotora no teste de campo aberto

Após tratamento com 25H-NBOMe, os animais machos não apresentaram alterações ( $p > 0,05$ ) entre os grupos em ambos os parâmetros analisados para todos os intervalos de tempos (figura 30). Ainda assim, naturalmente, ocorreu uma diminuição da distância percorrida e aumento do tempo de imobilidade ao longo do tempo em todos os grupos. No que diz respeito às fêmeas, também foi observada essa inversão natural dos parâmetros ao longo do tempo, porém, nos entre 5 e 10 minutos do teste, as fêmeas do grupo LPS-NBOMe 0,3 mg/kg percorreram menor distância ( $p < 0,05$ , figura 31B) e, conseqüentemente, tiveram menor tempo de imobilidade ( $p < 0,05$ , figura 31F) quando comparadas ao grupo LPS-VEI. Entretanto, essas diferenças não persistiram ao longo dos demais intervalos, com exceção da menor distância percorrida entre 10 e 15 minutos de teste ( $p < 0,05$ , figura 31C).

Figura 29 – Efeito do tratamento agudo com 25H-NBOMe sobre os parâmetros distância percorrida (cm) e tempo de imobilidade (s) no teste de campo aberto na pré-adolescência em animais machos.



Fonte: autora.

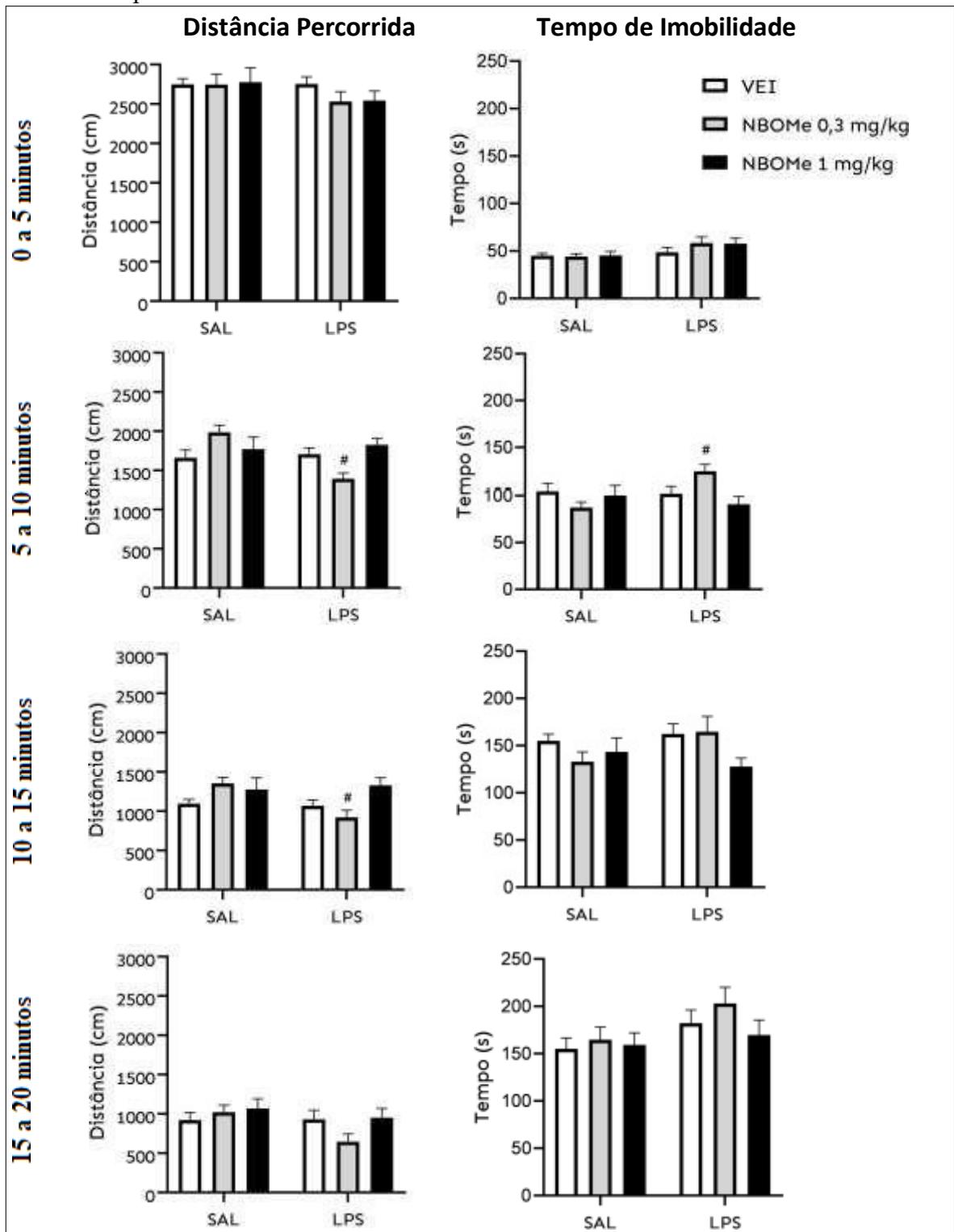
Nota: desempenho dos animais machos submetidas à neuroinflamação neonatal com LPS no aparato de campo aberto quanto à distância percorrida entre 0 e 5 minutos (A), 5 e 10 minutos (B), 10 e 15 minutos (C) e 15 e 20 minutos (D), e quanto ao tempo de imobilidade entre 0 e 5 minutos (E), 5 e 10 minutos (F), 10 e 15 minutos (G) e 15 e 20 minutos (E) após tratamento agudo com 25H-NBOMe. Estatística: ANOVA de duas vias (tabela 15) seguida do pós-teste de Newman-Keuls, o qual não revelou diferenças estatísticas significativas entre os grupos (n = 16-18).

Tabela 15 - Análise de variância de duas vias sobre a distância percorrida e o tempo de imobilidade em intervalos de 5 minutos em animais **machos** submetidos à neuroinflamação neonatal com LPS (desafio imunológico) e tratados na peripuberdade com 25H-NBOMe (tratamento NBOMe).

| Parâmetros                 | Tratamento NBOMe                 | Desafio imunológico               | Interação                         |
|----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Distância<br>0 a 5 min     | F (2, 90) = 0,8338<br>p = 0,4377 | F (1, 90) = 1,859<br>p = 0,1761   | F (2, 90) = 0,2366<br>p = 0,7898  |
| Distância<br>5 a 10 min    | F (2, 90) = 0,6522<br>p = 0,5234 | F (1, 90) = 2,353<br>p = 0,1286   | F (2, 90) = 0,5598<br>p = 0,5733  |
| Distância<br>10 a 15 min   | F (2, 90) = 1,398<br>p = 0,2523  | F (1, 90) = 0,2510<br>p = 0,6176  | F (2, 90) = 0,07971<br>p = 0,9234 |
| Distância<br>15 a 20 min   | F (2, 90) = 0,9216<br>p = 0,4016 | F (1, 90) = 5,124<br>p < 0,05     | F (2, 90) = 0,4349<br>p = 0,6487  |
| Imobilidade<br>0 a 5 min   | F (2, 90) = 1,069<br>p = 0,3477  | F (1, 90) = 1,005<br>p = 0,3187   | F (2, 90) = 0,2180<br>p = 0,8046  |
| Imobilidade<br>5 a 10 min  | F (2, 90) = 1,635<br>p = 0,2007  | F (1, 90) = 1,084<br>p = 0,3006   | F (2, 90) = 1,962<br>p = 0,1466   |
| Imobilidade<br>10 a 15 min | F (2, 90) = 2,335<br>p = 0,1027  | F (1, 90) = 0,01075<br>p = 0,9176 | F (2, 90) = 0,3633<br>p = 0,6964  |
| Imobilidade<br>15 a 20 min | F (2, 90) = 1,893<br>p = 0,1566  | F (1, 90) = 3,457<br>p = 0,0663   | F (2, 90) = 0,4549<br>p = 0,6360  |

Fonte: autora.

Figura 30 – Efeito do tratamento agudo com 25H-NBOMe sobre os parâmetros distância percorrida (cm) e tempo de imobilidade (s) no teste de campo aberto na pré-adolescência em animais fêmeas.



Fonte: autora.

Nota: desempenho de animais fêmeas submetidas à neuroinflamação neonatal com LPS no aparato de campo aberto quanto à distância percorrida entre 0 e 5 minutos (A), 5 e 10 minutos (B), 10 e 15 minutos (C) e 15 e 20 minutos (D), e quanto ao tempo de imobilidade entre 0 e 5 minutos (E), 5 e 10 minutos (F), 10 e 15 minutos (G) e 15 e 20 minutos (E) após tratamento agudo com 25H-NBOMe. Estatística: ANOVA de duas vias (tabela 16) seguida do pós-teste de Newman-Keuls, #  $p < 0,05$  em relação ao respectivo controle salina ( $n = 16-18$ ).

Tabela 16 - Análise de variância de duas vias sobre a distância percorrida e o tempo de imobilidade em intervalos de 5 minutos em animais **fêmeas** submetidas à neuroinflamação neonatal com LPS (desafio imunológico) e tratadas na peripuberdade com 25H-NBOMe (tratamento NBOMe).

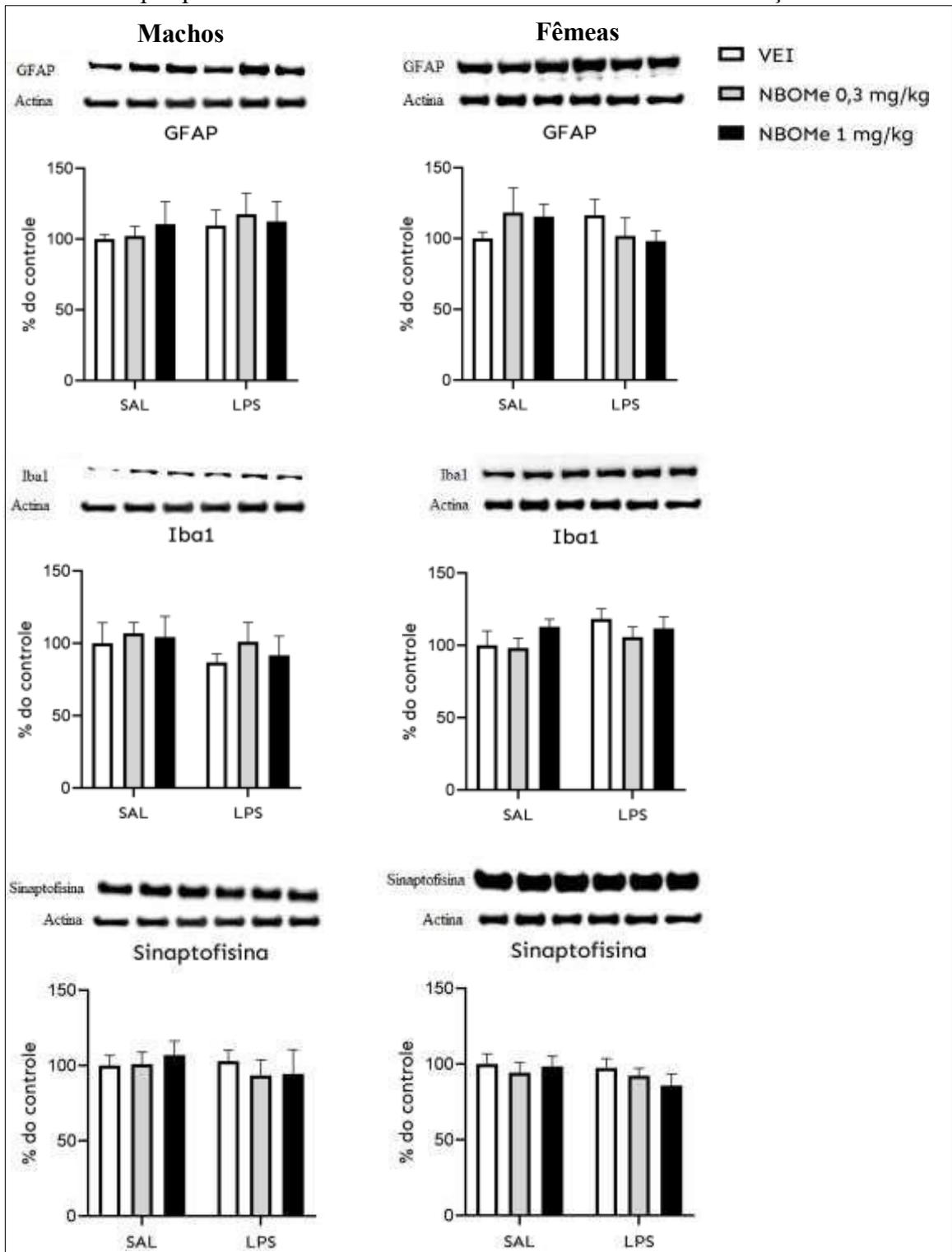
| Parâmetros                 | Tratamento NBOMe                 | Desafio imunológico              | Interação                        |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Distância<br>0 a 5 min     | F (2, 81) = 0,5213<br>p = 0,5957 | F (1, 81) = 4,208<br>p < 0,05    | F (2, 81) = 1,385<br>p = 0,2562  |
| Distância<br>5 a 10 min    | F (2, 81) = 1,782<br>p = 0,1748  | F (1, 81) = 5,812<br>p < 0,05    | F (2, 81) = 6,103<br>p < 0,01    |
| Distância<br>10 a 15 min   | F (2, 81) = 3,701<br>p < 0,05    | F (1, 81) = 3,677<br>p = 0,0587  | F (2, 81) = 2,934<br>p = 0,0589  |
| Distância<br>15 a 20 min   | F (2, 81) = 1,934<br>p = 0,1512  | F (1, 81) = 4,290<br>p < 0,05    | F (2, 81) = 1,538<br>p = 0,2210  |
| Imobilidade<br>0 a 5 min   | F (2, 81) = 0,6561<br>p = 0,5216 | F (1, 81) = 7,002<br>p < 0,01    | F (2, 81) = 0,7386<br>p = 0,4810 |
| Imobilidade<br>5 a 10 min  | F (2, 81) = 1,050<br>p = 0,3547  | F (1, 81) = 1,846<br>P=0,1781    | F (2, 81) = 5,425<br>p < 0,01    |
| Imobilidade<br>10 a 15 min | F (2, 81) = 2,008<br>p = 0,1409  | F (1, 81) = 0,6503<br>p = 0,4224 | F (2, 81) = 2,030<br>p = 0,1379  |
| Imobilidade<br>15 a 20 min | F (2, 81) = 0,9944<br>p = 0,3744 | F (1, 81) = 4,653<br>p < 0,05    | F (2, 81) = 0,4988<br>p = 0,6091 |

Fonte: autora.

### 6.3 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO AGUDO COM 25H-NBOMe SOBRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE ANIMAIS PRÉ-PÚBERES SUBMETIDOS À NEUROINFLAMAÇÃO NEONATAL

O tratamento agudo com 25H-NBOMe também não foi capaz de alterar a expressão de nenhuma das proteínas testadas em animais salina ou LPS ( $p > 0,05$ , figura 32, tabela 17).

Figura 31 – Efeito do tratamento com 25H-NBOMe sobre a quantificação das proteínas GFAP, Iba1 e Sinaptofisina por *Western Blotting* em animais na peripuberdade machos e fêmeas submetidos à neuroinflamação neonatal.



Fonte: autora.

Nota: expressão de proteínas no córtex pré-frontal de animais submetidos à neuroinflamação neonatal com LPS e tratados com 25H-NBOMe na peripuberdade. Temos a expressão de GFAP em animais machos (A) e fêmeas (B). Em seguida, temos a expressão de Iba1 de machos (C) e fêmeas (D), e a expressão de sinaptofisina em animais machos (E) e fêmeas (F). Estatística: ANOVA de duas vias, ver tabela 17 (n = 8).

Tabela 17 - Análise de variância de duas vias sobre a quantificação de proteínas por *Western Blotting* em animais machos e fêmeas submetidos à neuroinflamação neonatal com LPS (desafio imunológico) e tratados na peripuberdade com 25H-NBOMe (tratamento NBOMe).

| Parâmetros                | Tratamento NBOMe                  | Desafio imunológico              | Interação                         |
|---------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| GFAP<br>(machos)          | F (2, 42) = 0,1719<br>p = 0,8426  | F (1, 42) = 0,8424<br>p = 0,3639 | F (2, 42) = 0,1643<br>p = 0,8491  |
| Iba1<br>(Machos)          | F (2, 40) = 0,4049<br>p = 0,6698  | F (1, 40) = 1,191<br>p = 0,2817  | F (2, 40) = 0,05916<br>p = 0,9426 |
| Sinaptofisina<br>(Machos) | F (2, 42) = 0,1041<br>p = 0,9014  | F (1, 42) = 0,4688<br>p = 0,4973 | F (2, 42) = 0,3033<br>p = 0,7400  |
| GFAP<br>(Fêmeas)          | F (2, 42) = 0,04220<br>p = 0,9587 | F (1, 42) = 0,3954<br>p = 0,5329 | F (2, 42) = 1,490<br>p = 0,2370   |
| Iba1<br>(Fêmeas)          | F (2, 42) = 1,002<br>p = 0,3756   | F (1, 42) = 1,827<br>p = 0,1837  | F (2, 42) = 0,8601<br>p = 0,4304  |
| Sinaptofisina<br>(Fêmeas) | F (1, 42) = 1,174<br>p = 0,2848   | F (2, 42) = 0,5891<br>p = 0,5593 | F (2, 42) = 0,4220<br>p = 0,6585  |

Fonte: autora.

## 7 DISCUSSÃO

A seguir serão discutidos os resultados encontrados em nosso estudo.

### 7.1 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE LPS DURANTE O PERÍODO NEONATAL

Esta etapa do trabalho avaliou a resposta à inflamação de ratos neonatos quanto à sobrevivência, peso, vocalizações e comportamento social na peripuberdade. Primeiramente, vimos que uma dose alta de LPS (1,0 mg/kg) é capaz de reduzir a sobrevivência dos animais neonatos em comparação a uma dose mais baixa. Um estudo demonstrou que, durante a primeira semana de vida, o sistema imunológico é qualitativa e quantitativamente imaturo em comparação à idade adulta (GEORGOUNTZOU; PAPADOPOULOS, 2017). As diferenças entre neonatos e adultos em relação à imunidade foram relatadas tanto em humanos quanto em roedores, de maneira que os mecanismos que fornecem imunidade aos recém-nascidos são funcionalmente imaturos, caracterizados por células B, produção de anticorpos e resposta de células T insuficientes funcionalmente (ADKINS *et al.*, 2004). O processo de maturação varia individualmente e é dependente de diferentes moléculas, células, vias bioquímicas, sinalizações e exposição ao antígeno. Essa imaturidade do sistema imune no início da vida pode ser responsável pela menor taxa de sobrevivência durante eventos inflamatórios graves. Mesmo que o manuseio dos neonatos para os procedimentos experimentais e a troca de filhotes para o ajuste do tamanho da ninhada possa ter algum efeito na mortalidade, acredita-se que a baixa sobrevivência dos animais LPS 1,0 mg/kg foi causada pela alta dose recebida, uma vez que seus companheiros de ninhada dos grupos LPS 0,2 mg/kg e salina não sofreram baixas. Outro motivo para a baixa sobrevivência desses animais seria a letargia provocada pela inflamação, a qual impediria que o filhote realizasse movimentos de membros anteriores, promovendo rotação e direcionamento do neonato para a região ventral materna, necessários para que haja sucesso em encontrar e fixar-se no mamilo (SOUZA; CASTRO; NOGUEIRA, 2003). Dessa forma, os filhotes deixam de se alimentar e falecem por inanição, ou podem até se alimentar menos frequentemente e por menos tempo, causando diminuição do peso corporal.

De fato, o segundo achado desse trabalho foi a diminuição do peso corporal causada pela inflamação induzida por LPS em neonatos, o qual não foi recuperado em animais LPS 1,0 mg/kg até a peripuberdade. Outros trabalhos também demonstraram que a aplicação de LPS no

período neonatal causa redução aguda do peso corporal. Pires e colaboradores (2020) obtiveram um resultado semelhante ao tratarem ratos neonatos com LPS 1,0 mg/kg em dias alternados após o nascimento (PND1, 3, 5 e 7), encontrando uma redução do peso corporal na primeira semana pós-natal, mas que foi recuperado nos dias subsequentes. Entretanto, seu trabalho utilizou apenas machos na padronização da ninhada, além de um menor número de filhotes por ninhada (8, em comparação a 12 utilizados neste trabalho), o que pode ter impactado no tempo e quantidade de mamadas. Utilizando o mesmo protocolo de aplicação de LPS de Pires *et al.*, Silva *et al.* (2019) também obteve o resultado de redução do peso em animais LPS. Entretanto, também foram utilizados animais fêmeas para a composição das ninhadas e foi constatado que os animais tratados com LPS neonatal continuaram apresentando peso inferior aos animais controle até o 89º dia de vida. Juntos, nossos dados demonstram que a aplicação de LPS neonatal causa uma redução aguda do peso corporal devido ao comportamento doentio, mas que pode ou não ser recuperado dependendo de outros fatores como o tamanho da ninhada ou a presença de ambos os sexos na ninhada.

Outro achado desse trabalho foi a diminuição das vocalizações emitidas pelos filhotes durante o primeiro desafio imunológico com LPS, mas que podem aumentar após o terceiro desafio (em animais 3x) ou devido a uma segunda exposição ao teste (em animais 1x). As vocalizações ultrassônicas são emitidas por filhotes de ratos desde o dia seguinte ao nascimento até o desmame (HOFER, *et al.*, 2001). Este teste foi baseado na descoberta que os ratos se comunicam vocalmente utilizando vocalizações ultrassônicas que variam entre 10-100 kHz (BORTA; WOHR; SCHWARTING, 2006). Em filhotes de ratos, o breve isolamento de suas genitoras estimula a emissão de chamados característicos entre 35-40 kHz, e esse comportamento pode ser usado para avaliar o desenvolvimento da comunicação social (WOHR, 2015). De modo geral, a separação de um único filhote de seus companheiros de ninhada e da mãe em uma nova câmara de teste (isolamento) provoca uma alta frequência de VUS. O isolamento é o paradigma mais usado e potente para induzir as VUS em estudos experimentais e elas demonstraram obter respostas para o reestabelecimento materno, sugerindo que as VUS podem funcionar como sinais de chamada (SMOTHERMAN *et al.*, 1974; EHRET, 2005). Muitos artigos se limitam a pesquisa da vocalização ultrassônica em neonatos por considerar essa fase a que possui maiores alterações, no que diz respeito aos transtornos do neurodesenvolvimento (RABELO, 2021).

A diminuição do número de VUS duas horas após a primeira aplicação de LPS no PND3 pode indicar um prejuízo na comunicação entre o filhote e a mãe, causado pela inflamação desencadeada pelo LPS. Até o momento, não foram encontrados outros trabalhos

na literatura que avaliaram as VUS de ratos neonatos durante um desafio imunológico com LPS. Entretanto, um trabalho utilizando ratos adultos também encontrou uma redução do número de vocalizações 4 horas após a administração de LPS (100 µg/kg, i.p.), que foram gravadas ao mesmo tempo em que o animal era avaliado quanto ao comportamento doentio no teste de campo aberto, o qual evidenciou prostração e diminuição da exploração nesses animais (KIRSTEN *et al.*, 2015a). Silva (2018) avaliou a frequência de VUS em camundongos pré-púberes (PND30-32) durante o desafio imunológico com LPS (100 µg/kg, i.p.) e observou, 2 h após a administração, que os animais LPS não emitiram vocalizações e apresentaram comportamento doentio no teste de campo aberto realizado concomitantemente.

Esses resultados corroboram os achados deste trabalho e sugerem que a redução das VUS pode ser um parâmetro utilizado para a verificação do comportamento doentio causado pelo LPS em situações em que não é possível realizar os testes clássicos de comportamento doentio, como redução da ingestão alimentar e da capacidade locomotora no campo aberto (REIS, 2022). O prejuízo na comunicação durante um desafio imunológico pode ser uma resposta adaptativa da espécie, pois pode diminuir a chance de contaminação de sua colônia, além de diminuir a exposição a predadores (HART, 1988).

Interessantemente, demonstramos nesse trabalho que, na segunda exposição ao teste de VUS no PND5, os animais LPS aumentaram o número de vocalizações em comparação aos respectivos controles salina. Nesse dia, duas situações ocorreram: (1) os animais salina e LPS 3x receberam a terceira aplicação de LPS ou salina e, após 2 h, foram submetidos ao teste de VUS, e (2) os animais salina e LPS 1x foram simplesmente avaliados quanto às VUS no PND5, pois já haviam sido expostos ao LPS no PND3.

Em relação à primeira situação, outros estudos também encontraram aumento da frequência de VUS durante um segundo desafio imunológico com LPS. No trabalho de Silva (2018) citado anteriormente, os mesmos camundongos utilizados na primeira exposição ao LPS nos PND30-32 foram novamente expostos ao LPS nos PND45-47 e, dessa vez, aumentaram o número de VUS, além de apresentarem comportamento doentio atenuado, em comparação à primeira exposição ao LPS. Além disso, outro estudo mostrou que os níveis de corticosterona plasmática 4 h após a primeira aplicação de LPS (0,05 mg/kg de *Salmonella enteritidis*, i.p.) no PND3 aumentaram 4 vezes mais em comparação à salina, porém, 4 h após a segunda aplicação no PND5, esse aumento foi bem menos expressivo, indicando menor ativação do eixo HPA (WALKER; MARCH; HODGSON, 2004). De igual modo, ratos infectados no PND4 com *Escherichia coli* tiveram uma resposta atenuada de corticosterona plasmática quando desafiados com LPS na vida adulta (BILBO *et al.*, 2008). Esses achados podem indicar uma

adaptação da resposta inflamatória, fazendo com que ela seja atenuada no segundo desafio imunológico e permitindo que o animal possa voltar a vocalizar.

Quanto à segunda situação no PND5, consideramos apenas o fator de reexposição ao teste, pois os animais não haviam sido injetados com salina ou LPS naquele dia. As vocalizações induzidas por isolamento também podem ser consideradas um marcador de ansiedade, sendo a sua taxa aumentada por agentes ansiogênicos e diminuída por agentes ansiolíticos (WINSLOW; INSEL, 1991). Sendo assim, o aumento desse parâmetro no PND5 pode indicar um comportamento tipo ansioso nos filhotes LPS 1x, os quais foram reexpostos ao aparato do teste de VUS no PND5, mas não estavam passando pelo desafio imunológico e, mesmo assim, aumentaram a frequência de vocalizações.

A análise da emissão de VUS foi realizada novamente no PND12, mas não foram encontradas diferenças na frequência entre animais salina e LPS. Estudos de exposição pré-natal ao LPS também não encontraram diferenças entre filhotes salina e LPS quanto ao número de vocalizações, tanto em Vieira (2017), avaliadas no PND13, quanto em Kirsten *et al.* (2015b), avaliadas no PND11. Entretanto, no presente estudo não foram avaliados a duração dos chamados e o tempo de silêncio realizado pelos animais, os quais podem ser afetados mesmo sem ter havido prejuízo no número de chamados (KIRSTEN *et al.*, 2015b). Apesar de não termos demonstrado, utilizando esses modelos e doses de LPS, que a neuroinflamação neonatal causa prejuízos comunicativos duradouros, um de nossos modelos causou comprometimento da interação social durante a peripuberdade.

Como mencionado anteriormente, o DSM-V afirma que o diagnóstico de TEA é baseado em quatro critérios de inclusão por categorias de sintomas. Considerando os critérios A: prejuízo persistente na comunicação social recíproca e na interação social e C: esses sintomas devem estar presentes no período de desenvolvimento precoce, este trabalho demonstrou que a neuroinflamação induzida por administração de LPS (1,0 mg/kg, i.p.) no período neonatal (PND3-5) desencadeou prejuízos na interação social de animais machos, evidenciados pela diminuição dos tempos cheirando, seguindo e tempo total de interação, bem como a frequência de *pouncings*, na peripuberdade, que condiz ao período de desenvolvimento precoce. Já nas fêmeas submetidas a esse mesmo modelo de inflamação, os prejuízos no comportamento social foram observados na redução do tempo seguindo e da frequência de *pouncings*.

Bilbo e colaboradores (2008) também avaliaram o comportamento social de ratos machos adultos que haviam sido infectados com *Escherichia coli* no PND4 e encontraram redução no tempo total de interação dos animais infectados, em comparação aos animais

controle. Em outro estudo, ratos machos e fêmeas tratados com LPS (100 µg/kg, i.p.) no PND14 apresentaram tempo de interação social reduzido, avaliado na adolescência (PND40), quando comparados a ratos salina (DOENNI *et al.*, 2016). Macrae e pesquisadores (2015) trataram ratos machos e fêmeas com LPS (50 µg/kg, i.p.) nos PND3 e 5 e observaram redução do tempo de interação social nesses animais na adolescência (PND40), quando comparados a animais salina. Esses achados corroboram os achados desse trabalho, indicando que a neuroinflamação durante o neurodesenvolvimento em ratos é capaz de causar prejuízos no comportamento social ao longo da vida.

É importante destacar também que, geralmente, os transtornos do neurodesenvolvimento apresentam uma maior incidência e gravidade em indivíduos do sexo masculino (LEUNG; CHUE; PSYCH, 2000; FOMBONNE, 2009) e, nesse trabalho, os ratos machos demonstraram esse perfil de maneira mais acentuada que as fêmeas. Diferenças sexuais no que diz respeito à fisiologia e função do sistema imune periférico como os processos neurais básicos, comportamentos e resposta a modelos animais já foram documentados (BRUNTON *et al.*, 2015; DAVIS; EMORY, 1995; PAPAIOANNOU, 2002) e um estudo também observou uma resposta atenuada a citocinas em fêmeas tratadas com LPS no período neonatal (KENTNER *et al.*, 2010).

As fêmeas de muitas espécies geralmente apresentam aumento da resposta imune e da resistência à infecção em comparação aos machos (SCHWARZ; BILBO, 2012). Essas diferenças sexuais têm sido geralmente atribuídas às ações imunomoduladoras de hormônios esteroides sexuais. Os hormônios femininos, especialmente o estrógeno, são conhecidos por causar efeitos anti-inflamatórios, influenciando a função e produção de citocinas (BAKER, 2004; LIAO *et al.*, 2002; SCHWARZ *et al.*, 2012). Geralmente, o estradiol exógeno tem efeitos estimulantes na imunidade humoral, mas pode aumentar ou suprimir a imunidade mediada por célula, dependendo da dose. Já a testosterona exógena, em geral, deprime a imunidade humoral e mediada por células, aumentando a susceptibilidade a infecções bacterianas e virais. É provável que haja efeitos sexo-dependentes na função do sistema neuroimune em resposta a um desafio imunológico na fase inicial da vida, fazendo com que machos e as fêmeas apresentem diferentes respostas à ativação neonatal do sistema imune, devido à diferença entre o número de células da glia e os níveis moleculares do sistema imune (BARTH *et al.*, 2016).

Em contrapartida, nosso trabalho não encontrou diferenças significativas na expressão das proteínas GFAP (marcador de astrócitos) ou Iba1 (marcador de micróglia) no córtex pré-frontal de animais na peripuberdade submetidos à inflamação neonatal. No trabalho de Pang *et al.*, 2003, foram encontrados astrócitos e micróglia reativos nove dias após a administração

intracerebral de LPS 1,0 mg/kg no PND3, bem como as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e óxido nítrico sintase induzida (iNOS), e a coadministração de um antagonista do receptor IL-1 reduziu os prejuízos causados pelo LPS. Vale ressaltar que em nosso estudo a quantificação dessas proteínas foi realizada 28 dias após a administração intraperitoneal de LPS. Além disso, a expressão de GFAP e Iba1 indica apenas reatividade quanto à estrutura dessas células, mas não indica dados quanto aos mediadores pró-inflamatórios que podem estar sendo liberados, os quais são responsáveis pela neuromodulação e podem afetar o comportamento. No tópico 7.2 será discutido os possíveis mecanismos que podem ter desencadeado o desinteresse social nesses animais, o qual foi revertido pelo tratamento com 25H-NBOMe.

## 7.2 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM 25H-NBOMe SOBRE O COMPORTAMENTO DE ANIMAIS NA PERIPUBERDADE SUBMETIDOS À NEUROINFLAMAÇÃO NEONATAL

Para confirmar a ação do psicodélico 25H-NBOMe no receptor 5-HT<sub>2A</sub>, a frequência de movimentos HTR foi avaliada e foi demonstrado que ambas as doses utilizadas foram capazes de elicitar essas respostas nos animais tratados, sendo que a maior dose (1,0 mg/kg) elicitou mais movimentos HTR do que a menor dose (0,3 mg/kg). A primeira descrição de uma droga desencadeando respostas de movimentos HTR foi reportada por Keller e Umbreit (1956) após administração intravenosa (i.v.) de LSD em camundongos. Eles descobriram respostas facilmente observáveis e quantificáveis após a administração de LSD, caracterizadas por um balanço rápido e violento da cabeça, sendo então chamado de *Head Twitch Response*, ou HTR. Ratos também demonstram movimentos HTR após a administração de alucinógenos, mas nessa espécie a resposta é uma mistura de balanços da cabeça e balanços do corpo inteiro, similar ao comportamento de cachorros saindo da água. Por isso, em ratos esses movimentos são conhecidos como *Wet Dog Shakes*, ou WDS (HALBERSTADT; GEYER, 2018).

A caracterização farmacológica dessa resposta veio com a demonstração de que o precursor da serotonina (5-hidroxi-triptofano) também elicita comportamentos de HTR. Diversas classes de drogas (incluindo antagonistas da serotonina, anti-histamínicos e opioides) atenuaram essa resposta, enquanto inibidores da enzima monoamina oxidase (MAO) potencializaram os movimentos HTR (CORNE *et al.*, 1963). Alguns anos depois, foi demonstrado que uma variedade de alucinógenos produzia movimentos HTR, incluindo o LSD, a psilocibina, a psilocina e a mescalina (CORNE; PICKERING, 1967). Subsequentemente,

vários compostos serotoninérgicos foram demonstrados produzir HTR em roedores, incluindo as drogas 2C, análogas das derivadas e recentes NBOMe (FANTEGROSSI *et al.*, 2005).

Hoje, sabe-se que as drogas análogas NBOMe são potentes agonistas dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub>, e, portanto, causam efeitos alucinógenos que, em roedores, elicitam as respostas de HTR e WDS (RICKLI *et al.*, 2015). Sendo assim, os resultados obtidos nesse trabalho corroboram a literatura, pois o psicodélico 25H-NBOMe foi capaz de eliciar movimentos HTR em ambas as doses administradas, tanto em machos quanto em fêmeas pré-púberes. Desse modo, os animais estavam sob o efeito agonista 5-HT<sub>2A</sub> quando submetidos ao teste de comportamento de brincar subsequente.

O achado mais importante deste trabalho foi que o tratamento com 25H-NBOMe (0,3 mg/kg, i.p.) em ratos machos submetidos à neuroinflamação neonatal induzida por LPS (1,0 mg/kg, i.p.) foi capaz de reverter os prejuízos na interação social durante o comportamento de brincar na peripuberdade. Essas alterações não foram influenciadas por mudanças no padrão de exploração ou capacidade locomotora pois não foram encontradas diferenças nos parâmetros do teste de campo aberto. Até o momento e nosso conhecimento, esse foi o primeiro trabalho a avaliar o efeito do psicodélico 25H-NBOMe sobre o comportamento social em um modelo de neuroinflamação neonatal induzida por LPS. Apesar de a maioria das drogas recreativas tanto lícitas quanto ilícitas serem utilizadas em ambientes sociais por motivos ainda não bem esclarecidos (SINGLE; WORTLEY, 1993; HALKITIS *et al.*, 2005; RODGERS *et al.*, 2006; ACOSTA *et al.*, 2008), efeitos de drogas psicodélicas sobre o comportamento social são dificilmente encontrados na literatura.

Em comparação, uma revisão recente elencou ensaios clínicos com substâncias psicodélicas e psicoativas, incluindo LSD, psilocibina e 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, também conhecida popularmente como ecstasy). Em alguns ensaios, o LSD demonstrou melhorar a empatia e sociabilidade em indivíduos saudáveis, apesar de ter prejudicado o reconhecimento do medo. Em sobreviventes da AIDS, a psilocibina obteve efeitos positivos em relação à ansiedade, qualidade de vida, abertura para novas experiências e conexão social. Quanto ao MDMA, a psicoterapia assistida com essa droga em adultos com TEA obteve resultados demonstrando que seu uso é seguro e elicitam melhoras terapêuticas duradouras nos sintomas de ansiedade social (INSERRA; GREGORIO; GOBBI, 2020). Sendo assim, ensaios pré-clínicos com novas substâncias psicodélicas e psicoativas serão base para futuros ensaios clínicos na busca de terapias para transtornos neuropsiquiátricos.

Em relação as análises proteicas, nesse trabalho não encontramos diferenças na expressão das proteínas GFAP, Iba1 e sinaptofisina no córtex pré-frontal dos animais

submetidos à neuroinflamação neonatal e tratados com 25H-NBOMe. Mesmo assim, uma hipótese seria que os níveis de citocinas pró-inflamatórias ainda podem estar fisiologicamente aumentados nos animais LPS, causando alterações neuroimunes na regulação de neurotransmissores que levaram à diminuição do comportamento social. Um estudo com infecção neonatal com *Escherichia coli* no PND4 levantou evidências de que o processo inflamatório/infeccioso neonatal pode ativar ou estimular a micróglia permanentemente em um estado reativo, mesmo sem diferença em relação ao veículo na expressão gênica de MHC II, um marcador de ativação microglial (BILBO; SCHWARZ, 2009).

Além disso, as substâncias psicodélicas são capazes de atuar ativando vias imunomodulatórias e anti-inflamatórias, pelo menos em parte, através da ativação do receptor 5-HT<sub>2A</sub> (FLANAGAN; NICHOLS, 2018). Apesar de a ativação do receptor 5-HT<sub>2A</sub> mediada pela serotonina ser canonicamente considerado um sinal pró-inflamatório (SHAJIB; KHAN, 2015), a ativação desse receptor induzida por psicodélicos resulta em sua maioria no recrutamento de vias anti-inflamatórias (NICHOLS, 2012; PELLETIER; SIEGEL, 2009; YU *et al.*, 2008). Os efeitos anti-inflamatórios dos psicodélicos podem ser parcialmente explicados pela seletividade funcional do receptor 5-HT<sub>2A</sub>.

A seletividade funcional é um conceito em que drogas diferentes induzem conformações diferentes do mesmo receptor para recrutar e ativar diferentes vias efetoras (KENAKIN, 2011; URBAN *et al.*, 2007). Nesse cenário, a serotonina estabiliza principalmente o receptor em uma conformação que recruta vias pró-inflamatórias, enquanto os psicodélicos estabilizam o receptor em uma conformação ligeiramente diferente que recruta vias de sinalização anti-inflamatórias. Isso também explicaria por que certos antagonistas em os receptores também demonstraram ter propriedades anti-inflamatórias, pois estariam impedindo que os efeitos da própria serotonina promovessem a inflamação (FLANAGAN; NICHOLS, 2018). Embora os mecanismos moleculares precisos ainda não tenham sido elucidados, existem evidências que a ativação do receptor 5-HT<sub>2A</sub> por psicodélicos leva a um recrutamento funcionalmente seletivo de vias efetoras anti-inflamatórias que levam à interrupção da ativação ou da sinalização a jusante de receptores de TNF- $\alpha$  e de alvos como NF-k $\beta$  (HOUSE *et al.*, 1994; NAU *et al.*, 2013; FLANAGAN; NICHOLS, 2018; FLANAGAN *et al.*, 2019a e 2019b).

Como mencionado anteriormente, o IFN- $\alpha$  e o TNF- $\alpha$  estimulam a atividade da enzimaIDO, comprometendo a síntese de serotonina e favorecendo a via das quinureninas, bem como a produção de metabólitos neurotóxicos como o ácido 3-hidroxiquinurenina (3-HK) e o ácido quinolínico (AQ) (figura 9). Em modelos animais, a injeção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em indivíduos saudáveis induz comportamentos semelhantes ao retraimento

social (NAJJAR *et al.*, 2013). Desse modo, hipotetizamos que o psicodélico 25H-NBOMe pode ter sido capaz de inibir essa sinalização pró-inflamatória através da ativação do receptor 5-HT<sub>2A</sub>, desviando o catabolismo do triptofano pela enzima IDO, favorecendo a síntese de serotonina, e restaurando o comportamento social prejudicado pela neuroinflamação induzida por LPS.

A sinaptofisina é uma proteína de membrana nas vesículas sinápticas e é usada como um marcador específico das vesículas/terminais sinápticos. Esta proteína desempenha um papel importante na liberação de neurotransmissores e no ciclo das vesículas sinápticas, sendo considerada um excelente marcador proteico da atividade pré-sináptica no córtex (WANG *et al.*, 2017). Demonstramos que o tratamento agudo com 25H-NBOMe não foi capaz de alterar a expressão de sinaptofisina no córtex pré-frontal (CPF) poucas horas após a aplicação. Entretanto, os receptores 5-HT<sub>2A</sub> no CPF são primariamente pós-sinápticos e prevalecem nos dendritos apicais de neurônios piramidais (JAKAB; GOLDMAN-RAKIC, 1998; MINER *et al.*, 2013; WILLINS; DEUTCH; ROTH, 1997). Esse padrão de localização sugere que os psicodélicos podem ser capazes de aumentar a excitabilidade dendrítica e induzir potenciais excitatórios pós-sinápticos, como já foi demonstrado para a serotonina (AGHAJANIAN; MAREK, 1997).

No entanto, o impacto dos psicodélicos *in vivo* talvez seja mais complexo pois os microcircuitos corticais contêm múltiplas subpopulações de neurônios piramidais e subtipos de neurônios GABAérgicos. Esses tipos celulares expressam diferentes quantidades de 5-HT<sub>2A</sub>, além de outros receptores de serotonina, o que reflete em respostas heterogêneas à neuromodulação da serotonina (MARTIN; NICHOLS, 2016; SANTANA *et al.*, 2004). De fato, um estudo mostrou que após a administração sistêmica de DOI (2,5-dimetoxi-4-iodofenil-2-aminopropano, um psicodélico agonista 5-HT<sub>2A/C</sub>), os neurônios corticais frontais *in vivo* apresentaram variações nas taxas de disparo em toda a população neuronal no córtex frontal medial de ratos (WOOD; KIM; MOGHADDAM, 2012). Um grupo de pesquisadores utilizou técnicas de imagem (ressonância magnética) para elucidar os efeitos da psilocibina e LSD na conectividade da rede cerebral. Eles descobriram que essas drogas alteram a conectividade entre as regiões do cérebro produzindo um estado hiper conectado transiente. À medida que os efeitos da droga desaparecem, o cérebro pode reiniciar em um padrão mais normal de conectividade que é menos associado a estados depressivos anteriores (CARHART- HARRIS *et al.*, 2012, 2016, 2017). Portanto, uma segunda hipótese seria que o 25H-NBOMe pode ter sido capaz de atuar diretamente em receptores 5-HT<sub>2A</sub> pós-sinápticos, modulando a resposta comportamental dos animais de diferentes formas.

Nesse trabalho, a menor dose desse psicodélico foi capaz de reverter os prejuízos no comportamento social causados pela neuroinflamação neonatal com LPS. Porém, em animais salina essa mesma dose causou prejuízos no comportamento social por si só, além da dose mais alta também ter sido prejudicial. Um trabalho com ratos, infectados com *Escherichia coli* (*E. coli*) ou tampão fosfato-salina (PBS) no PND4 e tratados com anfetamina ou salina (D-anfetamina, 15 mg/ml/kg, i.p.) na adolescência (PND40), avaliou a expressão de mRNA de GFAP e das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no córtex pré-frontal medial orbitofrontal desses animais (BLAND *et al.*, 2010). Eles demonstraram que a anfetamina aumentou a expressão de todos esses parâmetros em animais controle PBS (não infectados no período neonatal), mas não aumentou nenhum deles nos animais submetidos à infecção neonatal. Além disso, não houve diferença na expressão de GFAP entre os grupos controle PBS-Salina e *E. coli*-Salina, semelhantemente ao achado de nosso estudo. Da mesma forma, o 25H-NBOMe pode ter suprimido a ativação de vias pró-inflamatórias em animais LPS, ao mesmo tempo em que ativa vias pró-inflamatórias em animais salina, causando o prejuízo observado no comportamento social desses animais. Portanto, podem existir diferenças estruturais ou moleculares em animais submetidos à neuroinflamação neonatal, as quais podem ser moduladas pelo psicodélico 25H-NBOMe.

Em um resumo de nossos achados, vimos que o desafio neonatal com LPS em ratos é capaz de alterar a comunicação entre o filhote e a mãe durante o desafio imunológico e reduzir o peso corporal tanto em filhotes machos quanto em fêmeas, mas que pode ou não ser recuperado a depender de fatores como o tamanho da ninhada. Na peripuberdade, animais machos submetidos à neuroinflamação neonatal induzida por LPS (1,0 mg/kg) por 3 dias consecutivos demonstraram prejuízos no comportamento social de brincar. Pela primeira vez, foi demonstrado que o tratamento agudo com a substância psicodélica 25H-NBOMe em uma dose baixa (0,3 mg/kg) é capaz de reverter os prejuízos causados no comportamento social de animais LPS, porém causa prejuízos nesse comportamento em animais salina em ambas as doses. Apesar disso, animais fêmeas não foram afetadas de forma relevante pela inflamação neonatal induzida por LPS ou pelo tratamento agudo com 25H-NBOMe na peripuberdade, demonstrando resultados de diferenças sexuais.

## 8 CONCLUSÃO

Encarar processos inflamatórios ou infecciosos durante o período neonatal como indutores dos transtornos do neurodesenvolvimento é relevante pois pode ajudar a compreender o motivo da alta prevalência dessas desordens, uma vez que qualquer indivíduo está constantemente exposto a infecções desde o início da vida. Além disso, o estudo de novas drogas e substâncias psicoativas como potenciais agentes terapêuticos em transtornos do neurodesenvolvimento precisa ser continuamente avaliado a fim de gerar dados confiáveis para encontrar doses eficazes e seguras para embasar estudos clínicos visando o tratamento e manejo dos sintomas dessas desordens. Portanto, este trabalho gera uma base para o estudo da substância psicodélica 25H-NBOMe como potencial agente terapêutico em desordens do neurodesenvolvimento que afetam as relações sociais, indicando caminhos a serem investigados para a elucidação de seu mecanismo de ação.

## REFERÊNCIAS

- AAN HET ROT, M.; MATHEW, S. J.; CHARNEY, D.S. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. **CMAJ**, v. 180, n. 3, p. 305-313, Feb. 2009.
- ACOSTA, M. C. *et al.* Characterizing early cigarette use episodes in novice smokers. **Addict Behav.**, v. 33, n. 1, p. 106-121, 2008.
- ADAM, N. *et al.* Sepsis-induced brain dysfunction. **Expert Rev. Anti Ther.** v. 11, n. 2, p. 211-221, 2013.
- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.
- AGHAJANIAN, G. K.; MAREK, G. J. Serotonin induced excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 4-5, p. 589-599, 1997.
- AGHAJANIAN, G. K.; MAREK, G. J. Serotonin and hallucinogens. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 16-23, 1999.
- ALEXANDER, C.; RIETSCHER, E. T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **J. Endotoxin Res.**, v. 7, n. 3, p. 167-202, 2001. and **Behavior**, p. 151, 516-524.
- ALMEIDA-FILHO, N. *et al.* Co-occurrence patterns of anxiety, depression and alcohol use disorders. **Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.**, v. 257, n. 7, p. 423-431, 2007.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 5th ed. Washington: American Psychiatric Association, 2013. p. 50-59.
- ANDREASEN, M. F. *et al.* A fatal poisoning involving 25C-NBOMe. **Forensic Science International**, v. 251, p. 1-8, 2015.
- ARAÚJO, T. S. **Papel de moduladores da via das quinureninas na reversão de sintomas e alterações neuroquímicas tipo esquizofrenia induzidas pela administração repetida de cetamina em camundongos**. 2015. 73f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
- AVITSUR, R.; YIRMIYA, R. The immunobiology of sexual behavior: gender differences in the suppression of sexual activity during illness. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 64, n. 4, p. 787-796, 1999.
- BADIMON, A. *et al.* Negative feedback control of neuronal activity by microglia. **Nature**, v. 586, n. 7829, p. 417-423, 2020.
- BAKER, A. E.; BRAUTIGAM, V. M.; WATTERS, J. J. Estrogen modulates microglial inflammatory mediator production via interactions with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 5021-5032, 2004.

- BANKS, W. A. The blood–brain barrier in psychoneuroimmunology. **Neurol. Clin.**, v. 24, n. 3, p. 413–419, 2006.
- BARICHELLO, T. *et al.* The blood-brain barrier dysfunction in sepsis. **Tissue Barriers**, v. 9, n. 1, p. 1840912, Jan. 2021.
- BARTH, C. R. *et al.* LPS-induced neonatal stress in mice affects the response profile to an inflammatory stimulus in an age and sex-dependent manner. **Wiley Periodicals, Inc. Dev. Psychobiology**, v. 58, n. 5, p. 600–613, 2016.
- BATISTA, T. H.; GIUSTI-PAIVA, A.; VILELA, F. C. Maternal protein malnutrition induces autism-like symptoms in rat offspring. **Nutritional Neuroscience**, v. 22, p. 1–9, 2018.
- BEUTLER, B.; RIETSCHER, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 2, p. 169-176, 2003.
- BERECZKI, E. *et al.* Synaptic markers of cognitive decline in neurodegenerative diseases: a proteomic approach. **Brain**, v. 141, n. 2, p. 582–595, 2018.
- BERG, K. A. *et al.* Effector pathway dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. **Molecular Pharmacology**, v. 54, n. 1, p. 94-104, 1998.
- BILBO, S. D.; SCHWARZ, J. M. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 3, n. 14, 2009.
- BILBO, S. D. *et al.* Bacterial infection early in life protects against stressor-induced depressive-like symptoms in adult rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, p. 261–269, 2008.
- BJORKQVIST, M. *et al.* A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington’s disease. **J. Exp. Med.**, v. 205, p. 1869–1877, 2008.
- BLAND, S. T. *et al.* Neonatal Escherichia coli infection alters glial, cytokine, and neuronal gene expression in response to acute amphetamine in adolescent rats. **Neurosci. Lett.**, v. 474, p. 52-57, Apr. 2010.
- BLUTHE, R. M. *et al.* Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. **C. R. Acad. Sci.**, v. 317, n. 6, 499–503, 1994.
- BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 6, p. 881–897, 2010.
- BORELLA, V. C. M. **Modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia induzida pela administração neonatal de cetamina em ratos: avaliação da influência do sexo e efeito antipsicótico.** 2013. 75f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

- BORTA, A.; WOHR, M.; SCHWARTING, R. K. Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. **Behav. Brain Res.**, v. 166, n. 2, p. 271–80, 2006.
- BOWEN, K. K.; DEMPSEY, R. J.; VEMUGANTI, R. Adult interleukin-6 knockout mice show compromised neurogenesis. **Neuroreport.**, v. 22, p. 126–130, 2011.
- BRADEN, M. R. *et al.* Molecular interaction of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor residues phe 339(6.51) and phe 340(6.52) with super potent N-benzyl phenethylamine agonists. **Mol. Pharmacol.**, v. 70, n. 6, p. 1956-1964, 2006.
- BROWN, A. S. Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 61, n. 8, p. 774–780, 2004.
- BRUNTON, P. J. *et al.* 5 $\alpha$ -reduced neurosteroids sex-dependently reversed central prenatal programming of neuroendocrine stress responses in rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 2, p. 666–677, 2015.
- CANAL, C. E. Serotonergic psychedelics: experimental approaches for assessing mechanisms of action. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 252, p. 227- 260, 2018.
- CANAL, C. E.; MORGAN, D. Head-twitch response in rodents induced by the hallucinogen 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine: a comprehensive history, a re- evaluation of mechanisms, and its utility as a model. **Drug Testing and Analysis**, v. 4, p. 7-8, 2012.
- CARDOSO, F. L. Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects. **J. Neuroinflammation**. v. 29, p. 12-82, Apr. 2015.
- CARHART-HARRIS, R. L. *et al.* Neural correlates of the psychedelic state as determined by fMRI studies with psilocybin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 6, p. 2138–2143, 2012.
- CARHART-HARRIS, R. L. *et al.* Neural correlates of the LSD experience revealed by multimodal neuroimaging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 17, p. 4853–4858, 2016.
- CARHART-HARRIS, R. L. *et al.* Psilocybin for treatment-resistant depression: fMRI-measure brain mechanisms. **Scientific Reports**, v. 7, n. 13187, 2017.
- CHAUDHURY, S. *et al.* Activity-dependent synaptic plasticity modulates the critical phase of brain development. **Brain and Development**, v. 38, n. 4, 355–363, 2016.
- CHEN, J. *et al.* Prenatal exposure to inflammation increases anxiety-like behaviors in F1 and F2 generations: possible links to decreased FABP7 in hippocampus. **Front Behav Neurosci**, v. 16, n. 973069, Oct. 2022.
- CHEZ, M. G. Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. **Pediatr. Neurol.**, v. 36, n. 6, p. 361-365, 2007.

COMIM, C. M. *et al.* Experimental neonatal sepsis causes long-term cognitive impairment. **Mol. Neurobiol.**, v. 53, n. 9, p. 5928-5934, 2015.

CONNOR, T. J. *et al.* Induction of indolamine 2,3-dioxygenase and kynurenine 3-monooxygenase in rat brain following a systemic inflammatory challenge: a role for IFN $\gamma$ ? **Neuroscience Letters**, v. 441, p. 29–34, 2008.

CORNE, S. J.; PICKERING, R. W. A possible correlation between drug-induced hallucinations in man and a behavioral response in mice. **Psychopharmacologia**, v. 11, n. 1, p. 65-78, 1967.

CORNE, S. J.; PICKERING, R. W.; WARNER, B. T. A method for assessing the effects of drugs on the central actions of 5-hydroxytryptamine. **Brit. J. Pharmacol. Chemother**, v. 20, n. 1, p. 106-120, 1963.

CUSTÓDIO, C. S. **Desafio imune neonatal com lipopolissacarídeo desencadeia alterações comportamentais e imunológicas/neurotróficas duradouras relacionadas ao sexo e a idade em camundongos: relevância para o transtorno do espectro autista (TEA)**. 99f. 2017. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) - Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

CUSTÓDIO, C. S. *et al.* Neonatal immune challenge with lipopolysaccharide triggers long-lasting sex-and age-related behavioral and immune/neurotrophic alterations in mice: relevance to autism spectrum disorders. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 5, p. 3775-3788, 2018.

DAL-PIZZOL, F.; TOMASI, D.; RITTER, C. Septic encephalopathy: does inflammation drive the brain crazy? **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 36, n. 3. p. 251-258, 2014.

DANIELSKI, L. G. *et al.* Brain barrier breakdown as a cause and consequence of neuroinflammation in sepsis. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 2, p. 1045–1053, 2017.

DANTZER, R. *et al.* Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? **Auton. Neurosci.**, v. 85, n. 1-3, p. 60–65, 2000.

DANTZER, R. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nat. Rev. Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 46–56, 2008.

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

DOENNI, V. M. Deficient adolescent social behavior following early-life inflammation is ameliorated by augmentation of anandamide signaling. **Brain Behav. Immun.**, v. 58, p. 237-247, Nov. 2016.

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

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

EGAN, C. T., *et al.* Agonist activity of LSD and lisuride at cloned 5HT<sub>2A</sub> and 5HT<sub>2C</sub> receptors. **Psychopharmacology**, v. 136, n. 4, p. 409-414, 1998.

EHRET, G. Infant rodent ultrasounds – a gate to the understanding of sound communication. **Behav. Genet.** v. 35, n. 1, p. 19–29, 2005.

ENGELHARDT, B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. **J. Neural Transm.**, v. 113, n. 4, p. 477–485, 2006.

FANTEGROSSI, W. E. Hallucinogen-like actions of 2,5- dimethoxy-4-(n)-propylthiophenethylamine (2C-T-7) in mice and rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 181, n. 3, p. 496-503, 2005.

FARIA, J. F. **Fungos alucinógenos: uma revisão sobre o Psilocybe sp. e a substância Psilocibina.** 2017. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

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

FERRER, I.; SERRANO, T.; SORIANO, E. Naturally occurring cell death in the subicular complex and hippocampus in the rat during development. **Neuroscience Research**, v. 8, n. 1, p. 60–66, 1990.

FITZGERALD, P. Tryptophan catabolism in females with irritable bowel syndrome: relationship to interferon-gamma, severity of symptoms and psychiatric co-morbidity. **Neurogastroenterol Motil**, v. 20, n. 12, p. 1291–1297, 2008.

FLANAGAN, T. W.; AND NICHOLS, C. D. Psychedelics as anti-inflammatory agents. **Int. Rev. Psychiatry**, v. 30, n. 4, p. 363–375, 2018.

FLANAGAN, T. W. 5-HT<sub>2</sub> receptor activation alleviates airway inflammation and structural remodeling in a chronic mouse asthma model. **Life Sci.**, v. 236, p. 116790, 2019.

FLANAGAN, T. W. Activation of 5-HT<sub>2</sub> receptors reduces inflammation in vascular tissue and cholesterol levels in high-fat diet-fed apolipoprotein e knockout mice. **Sci Rep**, v. 9, p. 13444, 2019.

FLORES-MARTINEZ. M. Y., *et al.* Acute neuroinflammatory response in the substantia nigra pars compacta of rats after a local injection of lipopolysaccharide. **Journal of Immunology Research**, p. 1-19, 2018.

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

GALIC, A. M.; RIAZI, K.; PITTMAN, Q. J. Cytokines and brain excitability. **Front Neuroendocrinol**, v. 33, n. 1, p. 116-125, 2013.

GAN, Y. L., *et al.* FKBP51 mediates resilience to inflammation-induced anxiety through regulation of glutamic acid decarboxylase 65 expression in mouse hippocampus. **J. Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, p. 152, June 2022.

GAULDEN, J.; REITER, J. F. Neur-ons and neur-offs: regulators of neural induction in vertebrate embryos and embryonic stem cells. **Hum. Mol. Genet.**, v. 17, n. 1, p. 60–66, 2008.

GEORGOUNTZOU, A; PAPADOPOULOS, N. G. Postnatal innate immune development: from birth to adulthood. **Front Immunol.**, v. 8, n. 957, Aug. 2017.

GEPPERT, M. *et al.* Synaptotagmin I: a major Ca<sup>2+</sup> sensor for transmitter release at a central synapse. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 717–27, 1994.

GRIFFITHS, R. R. *et al.* Psilocybin produces substantial and sustained decreases in depression and anxiety in patients with life-threatening cancer: a randomized double-blind trial. **Journal of Psychopharmacology**, v. 30, n. 12, p. 1181–1197, 2016.

HAIDA, O. *et al.* Sex-dependent behavioral deficits and neuropathology in a maternal immune activation model of autism. **Translational Psychiatry**, v. 9, n. 1, p. 124, 2019.

HALBERSTADT, A. L.; GEYER, M. A. Effects of the hallucinogen 2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine (2C-I) and superpotent N-benzyl derivatives on the head twitch response. **Neuropharmacology**, v. 77, p. 200-207, 2014.

HALKITIS, P. N.; GREEN, K. A.; MOURGUES, P. Longitudinal investigation of methamphetamine use among gay and bisexual men in New York City: findings from ProjectBUMPS. **J. Urban Health**, v. 82, n. 1, p. 18–25, 2005.

HANNESTAD, J. *et al.* Endotoxin-induced systemic inflammation activates microglia: [<sup>11</sup>C]PBR28 positron emission tomography in nonhuman primates. **Neuroimage**, v. 63, n. 1, p. 232–239, 2012.

HARJU, K. *et al.* Neonatal inflammation produces selective behavioral deficits and alters N-methyl-d-aspartate receptor subunit mRNA in the adult rat brain. **Eur. J. Neurosci**, v. 27, n. 3, p. 644–653, 2008.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 12, n. 2, p. 123–137, 1988.

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

HEIM, R. **Synthesis and pharmacology of potent 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonists which have a Partial N-2-2-methoxybenzyl structure.** Berlin: Universität Berlin, 2004.

HENSTRIDGE, C. M.; PICKETT, E.; SPIRES-JONES, T. L. Synaptic pathology: a shared mechanism in neurological disease. **Ageing Res. Rev.**, v. 28, p. 72-84, 2016.

HILL, S. L. *et al.* Severe clinical toxicity associated with analytically confirmed recreational use of 25I-NBOMe: case series. **Clin. Toxicol.**, v. 51, p. 487-492, 2013.

HOFER, M. A.; SHAIR, H. N.; BRUNELLI, S. A. Ultrasonic Vocalizations in Rat and Mouse Pups. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 8, 2001.

HOPKINS, S. J. Central nervous system recognition of peripheral inflammation: a neural, hormonal collaboration. **Acta Biomed**, v. 78, n. 1, p. 231–247, 2007.

HOUSE, R. V.; THOMAS, P. T.; BHARGAVA, H. N. Immunological consequences of in vitro exposure to lysergic acid diethylamide (LSD). **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 16, n. 1, p. 23–40, 1994.

HOYER, D. *et al.* International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). **Pharmacol. Rev.**, v. 46, n. 2, p. 157–203, 1994.

IMAI, Y. *et al.* A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. **Biochem Biophys Res. Commun.**, v. 224, n. 3, p. 855-862, July 1996.

INSERRA, A.; GREGORIO, D.; GOBBI, G. Psychedelics in psychiatry: neuroplastic, immunomodulatory, and neurotransmitter mechanisms. **Pharmacological Reviews**, v. 73, n. 1, p. 202–277, 2020.

ITO, D. *et al.* Microglia-specific localization of a novel calcium binding protein, *Iba1*. **Molecular Brain Research**, v. 57, n. 1, p. 1–9, 1998.

IWASA, T. *et al.* Neonatal LPS injection alters the body weight regulation systems of rats under non-stress and immune stress conditions. **Int. J. Dev. Neurosci**, v. 28, n. 1, p. 119-124, Feb. 2010.

JAKAB, R. L.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. 5-Hydroxytryptamine 2A serotonin receptors in the primate cerebral cortex: possible site of action of hallucinogenic and antipsychotic drugs in pyramidal cell apical dendrites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 2, p. 735–740, 1998.

JENKINS, T. A. Neonatal lipopolysaccharide induces pathological changes in parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the rat. **Behav Brain Res**, v. 205, n. 2, p. 355-359, Dec. 2009.

KASPER, S. *et al.* Efficacy and safety of aripiprazole vs. haloperidol for long- term maintenance treatment following acute relapse of schizophrenia. **Int. J. Neuropsychopharmacol**, v. 6, n. 4, p. 325–337, 2003.

KELLER, D. L.; UMBREIT, W. W. Permanent alteration of behavior in mice by chemical and psychological means. **Science**, v. 124, n. 3225, p. 723-724, 1956.

KENTNER, A. C. *et al.* Sex dependent effects of neonatal inflammation on adult inflammatory markers and behavior. **Endocrinology**, v. 151, n. 6, p. 2689–2699, 2010.

KESSLER, R. C.; DAVIS, C. G.; KENDLER, K. S. Childhood adversity and adult psychiatric disorder in the US National Comorbidity Survey. **Psychol Med**, v. 27, n. 5, p. 1101–1119, 1997.

KIECOLT-GLASER, J. K.; DERRY, H. M.; FAGUNDES, C. P. Inflammation: depression fans the flames and feasts on the heat. **Am. J. Psychiatry**, v. 172, n. 11, p. 1075–1091, 2015.

KIRSTEN, T. B. *et al.* Zinc prevents sickness behavior induced by lipopolysaccharides after a stress challenge in rats. **PLoS One**, v. 10, n. 3, 2015.

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**, v. 130, p. 12–17, 2015.

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

KURRASCH-ORBAUGH, D. M. *et al.* Serotonin 5-hydroxytryptamine 2A receptor-coupled phospholipase C and phospholipase A2 signaling pathways have different receptor reserves. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 304, n. 1, p. 229–237, 2003.

LIAO, S. L.; CHEN, W. Y.; CHEN, C. J. Estrogen attenuates tumor necrosis factor- $\alpha$  expression to provide ischemic neuroprotection in female rats. **Neuroscience Letters**, v. 330, n. 2, p. 159–162, 2002.

LINNERBAUER, M.; WHEELER, M. A.; QUINTANA, F. J. Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. **Neuron**, v. 108, n. 4, p. 608–622, 2020.

LENG, F. E.; EDISON, P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? **Nature Reviews. Neurology**. v. 17, n. 3, p. 157–172, 2020.

LEÓN-RODRÍGUEZ, A. *et al.* Anxiety-like behavior and microglial activation in the amygdala after acute neuroinflammation induced by microbial neuraminidase. **Sci. Rep.**, v. 12, n. 1, July 2022.

LEUNG, A.; CHUE, P. Sex differences in schizophrenia, a review of the literature. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 101, n. 401, p. 3–38, 2000.

LLINAS, R. *et al.* Regulation by synapsin I and Ca(2#)-calmodulin-dependent protein kinase II of the transmitter release in squid giant synapse. **J. Physiol.**, v. 436, p. 257–282, 1991.

LOPES, K. O.; SPARKS, D. L.; STREIT, W. J. Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity. **Glia**, v. 56, n. 10, p. 1048–1060, 2008.

LOPEZ-GIMENEZ, J. F.; GONZALEZ-MAESO, J. Hallucinogens and serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor-mediated signaling pathways. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 36, p. 45-73, 2018.

LORTON, D. *et al.* Bidirectional communication between the brain and the immune system: implications for physiological sleep and disorders with disrupted sleep. **Neuroimmunomodulation**, v. 13, n. 5-6, p. 357-374, 2006.

MACRAE, M. *et al.* Tracing the trajectory of behavioral impairments and oxidative stress in an animal model of neonatal inflammation. **Neuroscience**, v. 298, p. 455–466, 2015.

MAES, M. *et al.* A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress Neuro-Psychopharmacol Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 676-692, 2011.

MAES, M. A review on the acute phase response in major depression. **Rev. Neurosci**, v. 4, n. 4, p. 407–416, 1993. Review.

MAES, M. Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. **Progress Neuro-Psychopharmacol Biological Psychiatry**, v. 19, n. 1, p. 11–38, 1995. Review.

MAES, M. Major depression and activation of the inflammatory response system. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 461, p. 25–46, 1999. Review.

MAES, M.; MELTZER, H. Y. The serotonin hypothesis of major depression. *In*: BLOOM, F.; KUPFER, D. (Ed.). **Psychopharmacology: the fourth generation of progress**. New York: Raven Press, 1995.

MAES, M.; SMITH, R.; SCHARPE, S. The monocyte-T-lymphocyte hypothesis of major depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, n. 2, p. 111–116, 1995.

MAHMOOD, D. *et al.* New paradigms of old psychedelics in schizophrenia. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 15, n. 5, p. 640, May 2022.

MA, Q. *et al.* Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4-and SDF-1-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 16, p. 9448–9453, 1998.

MANSOUR, A. H.; HASSAN, A. W.; GEORGY, S. G. Neuroinflammatory reactions in sickness behavior induced by bacterial infection: protective effect of minocycline. **J. Biochem Mol. Toxicol. (Giza, Egypt)**, v. 32, n. 2, 2017.

MARTIN, D. A.; NICHOLS, C. D. Psychedelics recruit multiple cellular types and produce complex transcriptional responses within the brain. **EBioMedicine**, v. 11, p. 262–277, 2016.

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

MELANCIA, F. *et al.* Testing the correlation between experimentally-induced hypothyroidism during pregnancy and autistic-like symptoms in the rat offspring. **Behav. Brain Res.**, n. 321, p. 113-122, 2017.

MELTZER, H. Y.; MCGURK, S. R. The effects of clozapine, risperidone, and olanzapine on cognitive function in schizophrenia. **Schizophr. Bull.**, v. 25, n. 2, p. 233–255, 1999.

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

MICHELS, M. *et al.* Neuroinflammation: microglial activation during sepsis. **Curr. Neurovasc. Res.**, v. 11, n. 3, p. 262–270, 2014.

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

MILANESCHI, Y. *et al.* Association of inflammation with depression and anxiety: Evidence for symptom-specificity and potential causality from UKBiobank and NESDA cohorts. **Mol. Psychiatry**, v. 26, n. 12, p. 7393–7402, 2021.

MILIANO, C. *et al.* Neurochemical and behavioral profiling in male and female rats of the psychedelic agent 25I-NBOMe. **Front Pharmacol.**, v. 10, p. 1406, Dec. 2019.

MINER, L. A. H. *et al.* Ultrastructural localization of serotonin 2a receptors in the middle layers of the rat prelimbic prefrontal cortex. **Neuroscience**, v. 116, n. 1, p. 107–117, 2003.

MINTUN MA, *et al.* Decreased hippocampal 5-HT<sub>2A</sub> receptor binding in major depressive disorder: in vivo measurement with [18F]altanserin positron emission tomography. **Biol. Psychiatry**, v. 55, n. 3, p. 217–224, 2004.

MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 1, p. 119-128, 2003.

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

MORAES, A. *et al.* Activated microglia-induced deficits in excitatory synapses through IL-1 $\beta$ : implications for cognitive impairment in sepsis. **Molecular Neurobiology**, v. 52, n. 1, p. 653-663, 2014.

MORAIS, C. L. **Terapia psicodélica: efeitos neurobiológicos das drogas recreativas.** 2019. 44f. Dissertação (Grau de Mestre em Medicina) – Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2019.

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

MORGAN, T. E. **Gene expression in the normal aging brain**. Cambridge: Academic Press, 2009, p. 591-595.

MULLER, N.; J. SCHWARZ, M. The role of immune system in schizophrenia. **Current Immunology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 213–220, 2010.

MURPHY, D. G. *et al.* Cortical serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor binding and social communication in adults with Asperger's syndrome: an in vivo SPECT study. **The American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 5, p. 934–936, 2006.

NAJJAR, S. *et al.* Neuroinflammation and psychiatric illness. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, p. 43, 2013.

NAKANISHI, M. *et al.* Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. **The European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 3, p. 649–658, 2007.

NAU, F. J. R. *et al.* Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor activation blocks TNF- $\alpha$  mediated inflammation in vivo. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. 75426, 2013.

NEUMEISTER, A. Tryptophan depletion, serotonin, and depression: where do we stand? **Psychopharmacol. Bull**, v. 37, n. 4, p. 99–115, 2003.

NICHOLS, D. E. Psychedelics. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 2, p. 264-355, 2006.

NICHOLS, D. E. Structure-activity relationships of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> agonists. **WIREs Membrane Transport and Signaling**, v. 1, p. 559–579, 2012.

NICHOLS, D. E. *et al.* N-Benzyl-5-methyl tryptamine as potent serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor family agonists and comparison with a series of phenethylamine analogues. **ACS Chem. Neurosci**, v. 6, n. 7, p. 1165-1175, 2015.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Neuroscience: resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-1318, 2005.

OSMOND, H. A review of the clinical effects of psychotomimetic agents. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 66, n. 3, p. 418–434, 1957.

PANG, Y.; CAI, Z.; RHODES, P. G. Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, v. 140, n. 2, p. 205–214, Feb. 2003.

PANG, Y. D. *et al.* Early postnatal lipopolysaccharide exposure leads to enhanced neurogenesis and impaired communicative functions in rats. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. 0164403, Oct. 2016.

PANKSEPP, J. The ontogeny of play in rats. **Developmental Psychobiology**, v. 14, n.4, p. 327–33, 1981.

PAOLICELLI, R. C. *et al.* Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. **Science**, v. 333, n. 6048, p. 1456-1458, 2011.

PAPAIOANNOU, A. *et al.* Sex differences in the effects of neonatal handling on the animal's response to stress and the vulnerability for depressive behaviour. **Behavioural Brain Research**, v. 129, n. 1-2, p. 131-139, 2002.

PARDO, C. A.; VARGAS, D. L.; ZIMMERMAN, A. W. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. **Int. Rev. Psychiatry**, v. 17, n. 6, p. 485-495, 2005.

PELLETIER, M.; SIEGEL, R. M. Wishing away inflammation? New links between serotonin and TNF signaling. **Molecular Interventions**, v. 9, n. 6, p. 299-301, 2009.

PÉREZ-DE LA CRUZ, V. *et al.* Kynurenine pathway and disease: an overview. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 6, n. 6, p. 398-410, 2007.

PIONTKEWITZ, Y.; ARAD, M.; WEINER, I. Risperidone administered during an asymptomatic period of adolescence prevents the emergence of brain structural pathology and behavioral abnormalities in an animal model of schizophrenia. **Schizophr Bull**, v. 37, n. 6, p. 1257-1269, 2011.

PIRES, J. M. *et al.* Lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in the neonatal period increases microglial density and oxidative stress in the cerebellum of adult rats. **Front Cell Neurosci**, v. 14, p. 142, June 2020.

PORNNOPPADOL, C. *et al.* No difference between platelet serotonin--5-HT(2A) receptors from children with and without ADHD. **J. Child Adolesc. Psychopharmacol.**, v. 9, n. 1, p. 27-33, 1999.

POTTIE, E.; DEDECKER, P.; STOVE, C. P. Identification of psychedelic new psychoactive substances (NPS) showing biased agonism at the 5-HT<sub>2A</sub>R through simultaneous use of  $\beta$ -arrestin 2 and miniGaq bioassays. **Biochemical Pharmacology**, v. 182, p. 114251, 2020.

RABELO, C. B. **Vocalizações ultrassônicas e comportamentos sociais de ratos em modelos animais do espectro autista**. 87f. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2021.

RANTAKALLIO, P. *et al.* Association between central nervous system infections during childhood and adult onset schizophrenia and other psychoses: a 28-year follow-up. **Int. J. Epidemiol**, v. 26, n. 4, p. 837-843, 1997.

REIS, L. **Efeito da curcumina sobre as alterações comportamentais e termorregulatórias durante o desafio imunológico com lipopolissacarídeo**. 87f. 2018. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2018.

REIS, L., *et al.* Curcumin attenuates LPS-induced sickness behavior and fever in rats by modulating Nrf2 activity. **Neurosci Lett**, v. 271, p. 781, 2022. p. 116-121, 2022.

REIST, N. E. *et al.* Morphologically docked synaptic vesicles are reduced in synaptotagmin mutants of *Drosophila*. **J. Neurosci**, v. 18, n. 19, p. 7662–7673, 1998.

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

RICKLI, A. *et al.* Receptor interaction profiles of novel N-2-methoxybenzyl (NBOMe) derivatives of 2,5-dimethoxy-substituted phenethylamines (2C drugs). **Neuropharmacology**, v. 99, p. 546–553, 2015.

RISBROUGH, V. B.; VAUGHN, M. N.; FRIEND, S. F. Role of inflammation in traumatic brain injury-associated risk for neuropsychiatric disorders: state of the evidence and where do we go from here. **Biol. Psychiatry**, v. 91, n. 5, p. 438–448, 2022.

RODGERS, J. *et al.* Differential experiences of the psychobiological sequelae of ecstasy use: quantitative and qualitative data from an internet study. **J. Psychopharmacol**, v. 20, n. 3, p. 437–446, 2006.

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

ROSAHL, T. W. *et al.* Essential functions of synapsin I and II in synaptic vesicle regulation. **Nature**, v. 375, n. 6531, p. 488–493, 1995.

ROSE, S. R.; POKLIS, J. L.; POKLIS, A. A case of 25I-NBOMe (25-I) intoxication: a new potent 5-HT<sub>2A</sub> agonist designer drug. **Clin. Toxicol (Phila)**, v. 51, n. 3, p. 174–177, 2013.

ROSS, S. *et al.* Rapid and sustained symptom reduction following psilocybin treatment for anxiety and depression in patients with life-threatening cancer: a randomized controlled trial. **Journal of Psychopharmacology**, v. 30, n. 12, p. 1165–1180, 2016.

ROTH, J. *et al.* Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. **Front. Biosci.**, v. 9, p. 290–300, 2004.

ROTH, T. L. *et al.* Lasting epigenetic influence of early life adversity on the BDNF gene. **Biol Psychiatry**, v. 65, n. 9, p. 760–769, 2009.

RUCKER, J. J. *et al.* Psychedelics in the treatment of unipolar mood disorders: a systematic review. **J. Psychopharmacol (Oxford, England)**, v. 30, n. 12, 2016.

SAHU, M. K. *et al.* A systematic review and meta-analysis of serum and plasma cortisol levels in depressed patients versus control. **Indian Journal of Psychiatry**, v. 64, n. 5, p. 440–448, 2022.

SALVESEN, Ø.; TATZELT, J.; TRANULIS, M. The prion protein in neuroimmune crosstalk. **Neurochemistry International**, v. 130, p. 104335, 2018.

- SANTANA, N. *et al.* Expression of serotonin 1A and serotonin 2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. **Cereb. Cortex**, v. 14, n. 10, p. 1100–1109, 2004.
- SANTOMAURO, D. F. *et al.* Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. **The Lancet**, v. 398, n. 10312, p. 1700-1712, Nov. 2021.
- SAPOLSKY, R. M. Stress hormones: good and bad. **Neurobiology of Disease**, v. 7, n. 5, p.540-542, 2000.
- SCHAFER, D. P. *et al.* Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. **Neuron**. v. 74, n. 4, p. 691–705, 2012.
- SCHEDLOWSKI, M.; ENGLER, H.; GRIGOLEIT, J. H. Endotoxin-induced experimental systemic inflammation in humans: a model to disentangle immune-to-brain communication. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 35, p. 1-8, 2014.
- SCHIEPERS, O. J.; WICHERS, M. C.; MAES, M. Cytokines and major depression. **Prog. Neuro-psychopharmacol Biol. Psychiatry**, v. 29, n. 2, p. 201–217, 2005.
- SCHWARZ E. *et al.* Sex-specific serum biomarker patterns in adults with Asperger's syndrome. **Mol Psychiatry. Nature Publishing Group**, v.16, n. 12, p. 1213–1220, Dec. 2011.
- SCHWARZ, J. M.; BILBO, S. D. Sex, glia, and development: interactions in health and disease. **Hormones and Behavior**, v. 62, n. 3, p. 243–253, 2012.
- SCHWARZ, J. M.; SHOLAR, P. W.; BILBO, S. D. Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 120, n. 6, p. 948–963, 2012.
- SEAGAR, M.; TAKAHASHI, M. Interactions between presynaptic calcium channels and proteins implicated in synaptic vesicle trafficking and exocytosis. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 30, n. 4, p. 347–56, 1998.
- SEMPLE, B. D. *et al.* Brain development in rodents and humans: identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Prog Neurobiol**, p. 106–107, Apr. 2013, p. 1–16.
- SERRATS, J. *et al.* Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling. **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 94–106, 2010.
- SHAJIB, M. S.; KHAN, W. I. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 213, n. 3, p. 561–574, 2015.
- SHATKIN, J. P. **Child and adolescent mental health: a practical, all-in-one guide.** New York: W. W. Norton & Company, 2015.

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

SILVA, C. S. *et al.* LPS-induced systemic neonatal inflammation: blockage of P2X7R by BBG decreases mortality on rat pups and oxidative stress in hippocampus of adult rats. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 13, p. 240, Nov. 2019.

SILVA, E. P. **Camundongo mutante bate-palmas como possível modelo para a síndrome de kabuki: maior susceptibilidade a infecções e prejuízos na vocalização?** 50f. 2018. Dissertação (Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental) - Departamento de Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, São Paulo, 2018.

SILVA, V. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Sickness behavior is delayed in hypothyroid mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 45, p. 109-117, 2015.

SINGLE, E.; WORTLEY, S. Drinking in various settings as it relates to demographic variables and level of consumption: findings from a national survey in Canada. **J. Stud. Alcohol**, v. 54, n. 4, p. 590–599, 1993.

SMOTHERMAN, W. P. *et al.* Maternal responses to infant vocalizations and olfactory cues in rats and mice. **Behav. Biol**, v. 12, n. 1, p. 55–66, 1974.

SOUZA, S. L.; CASTRO, R. M.; NOGUEIRA, M. I. Comportamento alimentar neonatal. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 3, n. 3, p. 241–246, 2003.

SRISUMA, S.; BRONSTEIN, A. C.; HOYTE, C. O. NBOMe and 2C substitute phenylethylamine exposures reported to the National Poison Data System. **Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa)**, v. 53, n. 7, p. 624-628, 2015.

STELLPFLUG, S. J. 2-(4-Iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl] ethanamine (25I- NBOMe): clinical case with unique confirmatory testing. **J. Med. Toxicol**, v. 10, n. 1, p. 45-50, 2014.

STELLWAGEN, D.; MALENKA, R. C. Synaptic scaling mediated by glial TNF- $\alpha$ . **Nature**, v. 440, n. 7087, p. 1054–1059, 2006.

SU, W.; DING, X. Methods of Endotoxin Detection. **Journal of Laboratory Automation**, v. 20, n. 4, p. 354-364, 2015.

SWEETEN, T. L.; POSEY, D. J.; MCDUGGLE, C. J. High blood monocyte counts and neopterin levels in children with autistic disorder. **Am J. Psychiatry.**, v. 160, n. 9, p. 1691-1693, 2003.

TISHKINA, A. *et al.* Neonatal proinflammatory challenge in male Wistar rats: effects on behavior, synaptic plasticity, and adrenocortical stress response. **Behavioural Brain Research**, v. 304, p. 1–10, 2016.

TOYAMA, R. P. **Avaliação comportamental e bioquímica de camundongos submetidos a um modelo experimental de inflamação associada à criole**. 68f. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Centro de Ciências da Saúde, UFSC, Florianópolis, 2012.

TREZZA, V.; VANDERSCHUREN, L. J. Bidirectional cannabinoid modulation of social behavior in adolescent rats. **Psychopharmacology**, v. 197, n. 2, p. 217-227, 2008.

TREZZA, V.; BAARENDSE, P. J.; VANDERSCHUREN, L. J. Prosocial effects of nicotine and ethanol in adolescent rats through partially dissociable neurobehavioral mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 12, p. 2560-2573, 2009.

URBAN, J. D. *et al.* Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology, **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, n. 1, p. 1-13, 2007.

VIEIRA, F. V. **Exposição pré-natal ao lipopolissacarídeo como modelo translacional de transtorno do espectro autista**. 97f. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas. 2018.

VOLLENWEIDER, F. X.; PRELLER, K. H. Psychedelic drugs: neurobiology and potential for treatment of psychiatric disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, n. 11, p. 611-624, 2020.

WALKER, A. K. *et al.* Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 10, p. 1515–1525, 2009.

WALKER, F. R.; MARCH, J.; HODGSON, D. M. Endotoxin exposure in early life alters the development of anxiety-like behaviour in the Fischer 344 rat. **Behavioural Brain Research**, v. 154, n. 1, p. 63–69, 2004.

WEISSTAUB, N. V. *et al.* Cortical 5-HT<sub>2A</sub> receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. **Science**, v. 313, n. 5786, p. 536–540, 2006.

WESTFALL, S. *et al.* Chronic stress-induced depression and anxiety priming modulated by gut-brain- axis immunity. **Front. Immunol**, v. 12, n. 670500, 2021.

WIDNER, B. *et al.* Neopterin production tryptophan degradation and mental depression: what is the link? **Brain. Behav. Immun.**, v. 16, n. 5, p. 590–595, 2002.

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. **Prog. Neuro- Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 57, p. 17-30, 2015.

WILCONSON, J. S. *et al.* Behavioral inhibition and impaired spatial learning and memory in hypothyroid mice lacking thyroid hormone receptor  $\alpha$ . **Behavioural Brain Research (Chicago, IL, EUA)**, v. 177, p. 109-116, 2007.

WILLINS, D. L.; DEUTCH, A. Y.; ROTH, B. L. Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex. **Synapse**, v. 27, n. 1, p. 79–82, 1997.

WINSLOW, J. T.; INSEL, T. R. Infant rat separation is a sensitive test for novel anxiolytics. **Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry**, v. 15, n. 6, p. 745-57, 1991.

WOHR, M. Effect of social odor context on the emission of isolation-induced ultrasonic vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model for autism. **Front Neurosci**, v. 9, p. 73, 2015.

WOOD, D. M. *et al.* Prevalence of use and acute toxicity associated with the use of NBOME drugs. **Clin. Toxicol**, v. 53, n. 2, p. 85-92, 2015.

WOOD, J.; KIM, Y.; MOGHADDAM, B. Disruption of prefrontal cortex large scale neuronal activity by different classes of psychotomimetic drugs. **J. Neurosci**, v. 32, n. 9, p. 3022–3031, 2012.

WU, H. F. *et al.* Targeting the inhibition of fatty acid amide hydrolase ameliorates the endocannabinoid-mediated synaptic dysfunction in a valproic acid-induced rat model of Autism. **Neuropharmacology**, v. 162, p. 107736, 2019.

WYSS-CORAY, T.; MUCKE, L. Inflammation in neurodegenerative disease—a double-edged sword. **Neuron**, v. 35, n. 3, p. 419-432, 2002.

XU, J.; MASHIMO, T.; SÜDHOF, T. C. Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca(2+) sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons. **Neuron**, v. 54, n. 4, p. 567–581, 2007.

YANG, J.; QI, F.; YAO, Z. Neonatal Bacillus Calmette-Guérin vaccination alleviates lipopolysaccharide-induced neurobehavioral impairments and neuroinflammation in adult mice. **Mol. Med. Rep.**, v. 14, n. 2, p. 1574-1586, Aug. 2016.

YANG, Y. *et al.* The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. **Cell Death Dis.**, v. 7, n. 5, p. 2234, 2016.

YANG, Z; WANG, K. K. W. Glial Fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. **Trends Neuroscience**, v. 38, n. 6, p. 364–374, 2015.

YIRMIYA, R.; GOSHEN, I. Immune modulation of learning, memory, neuroplasticity and neurogenesis. **Brain. Behav. Immun.**, v. 25, n. 2, p. 181–213, 2011.

YU, B. *et al.* Serotonin 5-hydroxytryptamine(2A) receptor activation suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced inflammation with extraordinary potency. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 327, n. 2, p. 316–323, 2008.

ZAQOUT, S.; KAINDL, A. M. Golgi-Cox staining step by step. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 10, p. 38, 2016.

ZHANG, J.; RIVEST, S. Is survival possible without arachidonate metabolites in the brain during systemic infection? **News Physiol. Sci.**, v. 18, p. 137-142, 2003.

ZHAN, Y. *et al.* Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. **Nat. Neurosci.**, v. 17, n. 3, p. 400-406, 2014.

ZHENG, Z. H. *et al.* Neuroinflammation induces anxiety- and depressive-like behavior by modulating neuronal plasticity in the basolateral amygdala. **Brain Behav. Immun.**, v. 92, p. 505–518, 2021.