

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Lucas Kniess Debarba

**IMPACTO DO ESTRESSE INTRA-UTERINO SOBRE O
COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE, MASSA CORPORAL
E A ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE NO CÓRTEX
E HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS NA IDADE ADULTA**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Curso de Pós-Graduação em
Neurociências da Universidade Federal
de Santa Catarina como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre
em Neurociências.

Orientador:

Prof. Dr. Odival César Gasparotto,

Co-Orientadora: Prof. Dr. Sonia
Gonçalves

Florianópolis

2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kniess Debarba, Lucas
IMPACTO DO ESTRESSE INTRA-UTERINO SOBRE O COMPORTAMENTO
TIPO ANSIEDADE, MASSA CORPORAL E A ATIVIDADE DA GLUTATIONA
REDUTASE NO CÓRTEX E HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS NA IDADE
ADULTA [dissertação] / Lucas Kniess Debarba ; orientador,
Odival Cezar Gasparotto ; co-orientadora, Sonia Gonçalves. -
Florianópolis, SC, 2012.
91 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências.

Inclui referências


1. Neurociências. 2. Estresse intra-uterino. 3.
Lipopolissacarídeo. I. Cezar Gasparotto, Odival. II.
Gonçalves, Sonia. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV.
Título.

LUCAS KNISS DEBARBA


**“IMPACTO DO ESTRESSE INTRA-UTERINO SOBRE O
COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE E A
ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE NO
CÓRTEX E HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS NA
IDADE ADULTA”**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina


Florianópolis, 31 de agosto de 2012.



Prof. Ana Lúcia Severo Rodrigues
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:


Prof. Odival Cezar Gasparotto
Orientador – UFSC


Prof. Dib Ammar
Membro da Banca Externo


Prof. Fernanda B.L. Christian
Membro – UFSC


Prof. Mariana G. Terenzi
Membro - UFSC

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Eugênio e Lucia, que muito amo, por
serem exemplos de vida e família, por
todo auxílio e incentivo na
concretização dos meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade sublime de progredir em ciência e sabedoria, conhecendo um pouco mais das suas leis universais.

Agradeço ao meu pai Eugênio C. Debarba e a minha mãe Lucia Kniess Debarba por sempre me apoiarem com todo estímulo e carinho do mundo, pelo exemplo primordial de família, e pelas bases amorosas a qual me educaram.

Agradeço aos meus avós maternos pelo exemplo de pessoas aos quais foram e que contribuíram igualmente na minha educação, pela presença de minha avó Luzia Heidemann Kniess e ao meu avô Jerônimo Kniess (*in memorian*).

Felicito-me pela minha família ao qual esta sempre em meu coração, minha irmã Alice K. Debarba Ludvig e ao meu sobrinho que tanto amo Gabriel Debarba Ludvig.

Dentre as pessoas que muito contribuíram neste processo de aprendizagem, agradeço ao meu orientador Prof. Odival Cezar Gasparotto e a Profa. Sônia Gonçalves, pela valiosa oportunidade que me concederam, e pelas incontáveis lições e auxílios prestados.

Ao Péricles técnico do laboratório, pela enorme dedicação e por ser exemplo de funcionário público.

As minhas companheiras de trabalho Renata, Paula Barcellos, Paula Macedo pela forma com que se dedicaram e pelo carinho.

As minhas amizades que sempre me ouviram, aconselharam, fortaleceram-me nos momentos difíceis e trouxeram-me alegrias nos momentos de distração. São essas pessoas especiais que brilham nosso olhar ao vê-las, e fazem- nos perceber que verdadeiramente existem pessoas de Bem.

Alice Maria Ávila, Ana Cláudia Januário, Ana Paula Lopes, Camila Konell, Charles Ferreira, Cristiane Lavado, Denize Ramos, Dinho Terres, Eduardo Figueiredo Costa, Larissa Kochenborger, Marieli de Lima, Natália Saretta Sulzbach, Renata Martins e Thays Saretta Sulzbach.

RESUMO

A exposição ao lipopolissacarídeo (LPS), no período gestacional pode comprometer e/ou alterar o desenvolvimento fetal e predispor a prole a prejuízos em sua fisiologia na vida adulta. Esses prejuízos podem estar relacionados à manifestação de patologias neuropsiquiátricas, alterações no comportamento e aumento do estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do estressor imunogênico, aplicado durante o período gestacional, sobre o comportamento tipo-ansiedade e a atividade da Glutathione Redutase (GR) no córtex e hipocampo da prole adulta. As fêmeas gestantes foram expostas ao LPS (10µg/kg/i. p.) no 8º dia de gestação. No 45º dia de idade, as proles geradas foram submetidas a diferentes tratamentos: 1. expostas ao LPS (5µg/kg/i. p.), 2. tratadas com PBS, 3. tratadas com midazolam (1mg/kg), 4. não manipuladas. Posterior ao período de 4 horas da exposição ao LPS ou 30 minutos após o tratamento com midazolam, as proles foram avaliadas no Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Amostras de córtex e hipocampo foram coletadas 4 horas após a exposição ao LCE para análise da GR. Com o objetivo de avaliar o impacto da adoção cruzada (cuidados maternos) na prole adulta de camundongos submetidos ao modelo de exposição ao LPS na fase intra-uterina, proles de fêmeas expostas ao LPS durante o período gestacional foram adotadas por fêmeas não manipuladas e vice-versa. Os resultados mostraram que a exposição ao LPS durante a gestação provocou: 1. aumento do ganho de peso corporal nas proles após o desmame, de forma mais pronunciada nas proles fêmeas a partir do 33º dia de idade, 2. as proles apresentaram aumento dos parâmetros indicativos de ansiedade, 3. redução dos níveis de glutathione redutase nas proles machos no hipocampo, 4. O protocolo de adoção foi capaz de gerar aumento de ansiedade nos animais e 5. No protocolo de adoção cruzada um fenômeno de tolerância foi observado quando as proles foram expostas ao LPS na idade adulta. Desta maneira, verificamos que o LPS no período gestacional repercute em alterações metabólicas, comportamentais na prole adulta e na atividade antioxidante.

Palavras-chave: lipopolissacarídeo, período gestacional, ansiedade, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Exposure to the Lipopolysaccharide (LPS), during pregnancy can compromise and / or alter fetal development, and predispose the offspring to losses in their physiology in adulthood. These losses can be related to the manifestation of neuropsychiatric disorders, changes in behavior, and increased oxidative stress. The objective of this study aims at evaluating the impact of immunogenic stressor applied during pregnancy, on the anxiety-like behavior and activity of glutathione reductase (GR) in the cortex and hippocampus of adult offspring. The pregnant females were exposed to LPS (10 μ g/kg/ip) on the eight day of gestation. At 45 days of age, the offspring were subjected to different treatments: 1. exposure to LPS (5 μ g/kg/i. p.), 2. treated with phosphate *buffered saline* (PBS), 3. treated with midazolam (1mg/kg), 4. not manipulated. Four hours after the exposure to LPS or thirty minutes after treatment with midazolam, the offspring were evaluated in the elevated plus maze. Cortex and hippocampus samples were collected for analysis of GR. In order to assess the impact of cross-fostering (maternal) in the adult offspring of mice subjected to the type of exposure to LPS in utero, offspring of females exposed to LPS during pregnancy were adopted by unmanipulated females and vice versa. The results of this study demonstrate that exposure to LPS during pregnancy leads to: 1. an increase in body weight gain in the offsprings post weaning, more pronounced in the female offspring from 33 day-old, 2. an increase on indicative parameters of anxiety-like behavior in the offsprings, 3. decreased levels of glutathione reductase in the hippocampus of male offsprings, 4. the protocol adopted was able to generate increased anxiety-like behavior in animals and 5. a phenomenon of tolerance was observed when the offspring were exposed to LPS in adulthood in the cross-fostering protocol. Thus, we found that very low dose of LPS during pregnancy reflected in metabolic and behavioral changes in the adult offspring and decreased antioxidant activity.

Keywords: lipopolysaccharide, pregnancy, anxiety, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tempo de desenvolvimento fetal durante a gestação do rato, macaco e humano.....	26
Figura 2: O papel do estresse intra-uterino na unidade mãe-placenta-feto em humanos.	28
Figura 3: Possíveis mecanismos de mediação de efeitos da infecção intra-uterina na função encefálica	31
Figura 4: Ação da glutatona no sistema antioxidante.	36
Figura 5: Média e erro padrão do ganho de peso corporal aferido no período pós-natal nas proles fêmeas e machos de camundongos gerados por fêmeas injetadas com LPS e por fêmeas não manipuladas.....	51
Figura 6: Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado (LEC) de proles geradas por fêmeas expostas ao LPS durante o período gestacional	54
Figura 7: Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado (LEC) de proles geradas por fêmeas expostas ao LPS durante o período gestacional	55
Figura 8: Comportamento no LEC de proles geradas por fêmeas expostas ao LPS durante o período gestacional e tratadas com midazolam na idade adulta.....	57
Figura 9: Comportamento no LEC de proles geradas por fêmeas expostas ao LPS durante o período gestacional e tratadas com midazolam na idade adulta.....	58
Figura 10: A atividade de glutatona redutase de proles geradas por fêmeas expostas e não exposta ao LPS durante o período gestacional, no hipocampo de proles machos e no hipocampo de proles fêmeas; no córtex frontal dos machos e no córtex frontal de proles fêmeas.	62

Figura 12: Comportamento no LEC de proles adotadas e tratadas com midazolam..... 64

Figura 13: O comportamento no LEC de proles submetidas à adoção cruzada 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Representação do protocolo experimental do tratamento das proles.....	45
Tabela 2: Representação do protocolo experimental de adoção.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%TAR	- Porcentagem de tempo em avaliação de risco
%TBA	- Porcentagem de tempo nos braços abertos
%TBF	- Porcentagem de tempo nos braços fechados
AC	- Adoção cruzada
ACTH	- Hôrmônio Adrenocoticotrófico
AMPA	- Receptor ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
BDNF	-Fator neurotrófico derivado do cérebro
Cl-	- Canal transmembrana de cloreto.
CPF	- Córtex Pré-Frontal
CRH	- Hormônio Liberador de Corticotrofina
EMAR	- Episódio Médio em Avaliação de Risco
ERO	- Espécie Reativa de Oxigênio
GCs	- Glicocorticóides
GFAP	- Proteína glial fibrilar ácida
GPx	- Glutathione Peroxidase
GR	- Glutathione Redutase
GSH	- Glutathione Reduzida
GSSG	- Glutathione Oxidada
H₂O₂	- Peróxido de Hidrogênio
HPA	- Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
INF	- Interferon
IL	- Interleucina

IP	- Intraperitoneal
LEC	- Labirinto em Cruz Elevado
LPS	- Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
NA	- Noradrenalina
NBA	- Número de entradas nos braços abertos
NBF	- Número de entradas nos braços fechados
NC	- Número de entradas no centro
NDPH	-Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NK	- Células Natural Killer
NMDA	- Receptor N-metil D-Aspartato
NRFs	- Fatores Respiratórios Nucleares
NRISCO	- Número de avaliações de risco
PBS	- Solução Salina Tamponada com Fosfato
Poly I:C	- Ácido poli- inosínico: policitidílico
PPAR	- Receptor Proliferador Ativador de Peroxissoma
PVN	- Núcleo Paraventricular do Hipotalâmico
RGs	- Receptores Glicocorticóides
RMs	- Receptores Mineralocorticóides
SNA	- Sistema Nervoso Autônomo
SNC	- Sistema Nervoso Central
SNP	- Sistema Nervoso Parassimpático
SNS	- Sistema Nervoso Simpático
TFAM	- Fator de Transcrição Mitocondrial
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
TPM	-Tensão Pré Menstrual
TRE	- Receptor Relacionado ao Estrogênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Mecanismos biológicos do estresse	23
1.2 Desenvolvimento fetal	24
1.3 Mecanismos transplacentários do estresse intra-uterino	27
1.4 Mecanismos transplacentários do estresse pré-natal por LPS.....	29
1.5 Efeito pós-natal do estresse intra-uterino induzido pelo LPS	32
1.6 O estresse oxidativo e o estresse pré-natal.....	34
1.7 Peso corporal e os modelos de estresse no período intra-uterino....	36
1.8 Mecanismos de ação do midazolam, e o efeito ansiolítico sob condições de estresse	38
2 OBJETIVOS.....	41
2.1 Objetivo geral.....	41
2.2 Objetivos específicos	41
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 Animais	43
3.2 Acasalamento dos animais	43
3.3.1 <i>Exposição de fêmeas prenhas ao estressor imunogênico – LPS.</i> ..	44
3.3.2 <i>Tratamento das proles</i>	44
3.3.3 <i>Exposição das proles ao labirinto em cruz elevado (LEC).</i>	45
3.4 Adoção cruzada (cross-fostering)	45
3.4.1 <i>Tratamento de fêmeas prenhas biológicas ou adotivas e proles.</i> ..	46
3.4.2 <i>Exposição das proles submetidas à adoção cruzada no Labirinto em Cruz Elevado (LEC).</i>	47
3.5 Teste no Labirinto em Cruz Elevado	47
3.6 Atividade da glutatona redutase.....	48
3.7 Análise Estatística	49
4 RESULTADOS	51
4.1 Avaliação do peso corporal nas proles geradas por fêmeas expostas ao LPS.....	51
4.2 Análise do comportamento do tipo ansiedade.....	52
4.2.1 <i>Porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA)</i>	52
4.2.2 <i>Porcentagem de tempo em avaliação de risco (%TAR).</i>	52
4.2.3 <i>Análise do número de avaliação risco (Nrisco).</i>	53
4.2.4 <i>Episódio médio de avaliação de risco (EMAR)</i>	53

4.2.5 <i>Ambulação</i>	53
4.3 Midazolam e exposição ao LPS no período gestacional	56
4.4 A atividade da GR e exposição ao LPS no período gestacional.....	59
4.5 Adoção e exposição ao LPS no período gestacional	61
4.6 Adoção e exposição ao Midazolam na idade adulta.....	62
4.7 Adoção cruzada (Cross Fostering)	64
5. DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mecanismos biológicos do estresse

A manutenção da vida ocorre através de mecanismos complexos de equilíbrio dinâmico entre o meio interno e externo, chamados de homeostasia. Os mecanismos fisiológicos podem ser desafiados constantemente por alterações intrínsecas e extrínsecas chamadas de estresse (ver revisão em Charmandari et al., 2005). Em resposta ao estresse, o organismo promove uma série de processos adaptativos através da ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise Adrenal (HPA) (ver revisão em Herman et al., 2003), além de regiões tronco-encefálicas e do núcleo autonômico pré-ganglionar simpático (ver revisão em Chrousos, 2007).

A ativação do eixo HPA ocorre inicialmente através da secreção do Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH) e do hormônio Arginina Vasopressina (AVP), sintetizados nos neurônios do Núcleo Paraventricular do hipotálamo (PVN). A secreção do CRH ocorre através do sistema porta hipofisário na eminência mediana e estimula a secreção do Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH). (ver revisão Chrousos, 2007) O ACTH hipofisário presente na circulação agirá no córtex da adrenal, sendo esse seu principal alvo. A região fasciculada do córtex da adrenal e reticular, após a ligação do ACTH, promoverá a liberação dos Glicocorticóides (GCs), além de participar da secreção de aldosterona na zona glomerulosa (ver revisão em Herman et al., 2003; ver revisão em Chrousos, 2007; ver revisão em Charmandari et al., 2005).

O controle do eixo HPA ocorre principalmente pelo hipocampo que, por sua vez, desempenha importante papel de inibição na alça de retro alimentação do eixo HPA (ver revisão em Duman e Monteggia, 2006; ver revisão em Cottrell and Seckell 2009; Hemmerle et al., 2008). O Córtex Pré-Frontal (CPF), juntamente com o hipocampo, também possui papel inibitório sobre o eixo HPA e consequentemente no controle comportamental (Dias-Ferreira et al., 2009). No entanto, a amígdala estabelece conexões excitatórias sobre o eixo HPA, importantes nos comportamentos relacionados ao medo e ansiedade (ver revisão em Ulrich-Lai e Herman, 2009; ver revisão em Hemmerle et al., 2008).

As regiões tronco-encefálicas possuem também grande participação na resposta ao estresse. O *Locus Coeruleus*, localizado na região da ponte, é uma das principais regiões que promovem a secreção de noradrenalina no SNC (ver revisão em Chrousos, 2007). O sistema nervoso autônomo é ativado rapidamente na resposta de alerta e a ativação simpática na medula da adrenal promove a liberação de adrenalina e de noradrenalina na circulação sanguínea (ver revisão em Chrousos, 2007).

As principais alterações no organismo promovidas pelas catecolaminas são: 1. manutenção do suprimento sanguíneo e, conseqüentemente, a oxigenação e nutrição para o encéfalo, músculo cardíaco e esquelético; 2. aumento da produção de energia através do recrutamento de substratos como glicose, ácidos graxos e aminoácidos, de regiões de armazenamento de combustível do corpo (isto é, fígado, tecido adiposo e músculo esquelético) e gliconeogênese hepática e 3. disponibilizar Adenosina Trifosfato (ATP) para os tecidos vitais em detrimento dos outros, ou seja, gônadas e trato gastrointestinal (ver revisão em Charmandari et al. 2005).

Os receptores de glicocorticóides estão localizados em várias regiões límbicas, como o CPF, hipocampo, estriado, núcleo accumbens e mesencéfalo ventral e estão envolvidos em patologias neurológicas. O hipocampo desempenha um papel importante nos processos mnemônicos e está envolvido nos estados alterados de humor. Por possuir grande quantidade de receptores para glicocorticoides, o estresse pode causar atrofia dendrítica e conseqüentemente prejuízos envolvidos com a sua função. A amígdala, contrariamente, possui aumento da complexidade dendrítica, e está associada ao aumento do comportamento de ansiedade medo e depressão (ver revisão em Hemmerle et al., 2008).

1.2 Desenvolvimento fetal

Em humanos o processo de neurulação inicia no período inicial da gestação. A notocorda que define o eixo primitivo do embrião induzirá o tecido ectodérmico para a formação da placa neural. Esse processo ocorre aproximadamente na segunda semana da gestação humana (ver revisão em Rice e Barone, 2000).

No período final da terceira semana, a movimentação e fusão das dobras neurais darão início na formação do tubo neural (ver revisão em

Rice e Barone, 2000). A formação completa do tubo neural ocorre aproximadamente no 11º dia e no 26-28º dia de gestação, respectivamente em ratos e em humanos (Figura 1) (ver revisão em Rice e Barone, 2000; ver revisão em Charil et al., 2010). Posteriormente, a neurogênese e migração de neuroblastos no prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo marcam a formação inicial de áreas específicas do SNC (ver revisão em Rice e Barone, 2000; ver revisão em Charil et al., 2010). Essa formação inicia no período inicial da segunda semana de gestação em roedores (7º dia em camundongos e 9,5º dia em ratos) e no primeiro mês de gestação em humanos (ver revisão em Rice e Barone, 2000).

As regiões romboencefálicas, como a ponte e o bulbo possuem importantes núcleos motores e sensoriais e sua maturação coincide com o desenvolvimento embrionário crânio-facial, tanto em humanos como em ratos. O período de maturação dessas áreas ocorre no 10-16º dia e na 3-7,5º semana de desenvolvimento, em ratos e roedores, respectivamente. O cerebelo surge a partir dos lábios dorsais da região posterior do encéfalo, sendo a última região romboencefálica a se formar, em ambos roedores e humanos (ver revisão em Rice e Barone, 2000) e seu desenvolvimento e maturação continua após o nascimento (ver revisão em De Graaf-Peters e Hadders-Algra, 2006).

A região tegmentar mesencefálica inclui o colículo superior e inferior, que prolifera e diferencia-se durante o período embrionário, tanto em ratos quanto em humanos. O tecto do mesencéfalo continua o seu desenvolvimento no período pós-natal com aumento da sinaptogênese e das principais estruturas aferentes e eferentes (ver revisão em Rice e Barone, 2000).

Os núcleos do hipotálamo e do tálamo desenvolvem-se no final do período embrionário e início do período fetal, tanto em ratos quanto em humanos. O córtex, o neocórtex (ver revisão em Rice e Barone, 2000), a região hipocampal e o bulbo olfatório apresentam maior neurogênese na primeira metade da gestação em humanos e seu desenvolvimento continua após o nascimento (ver revisão em De Graaf-Peters e Hadders-Algra, 2006; ver revisão em Rice e Barone, 2000) com proliferações da glia e pequenos neurônios, tanto em humanos como em ratos (ver revisão em Rice e Barone, 2000).

A migração de neuroblastos indiferenciados ocorre aproximadamente na segunda semana de gestação (em roedores) e no primeiro mês (em humanos), diferencia-se em neurônios ou células gliais, dependendo da interação com sinais intra e extracelulares. Tanto a diferenciação e a sinaptogênese continuam no período pós-natal (ver

revisão em De Graaf-Peters e Hadders-Algra, 2006; ver revisão em Rice e Barone, 2000; ver revisão em Charil et al., 2010).

Após a diferenciação celular, observa-se o início do processo de mielinização. Em ratos, o processo de mielinização inicia-se na segunda semana pós-natal e em seres humanos durante o último trimestre de gestação, continuando até a adolescência, em ambos, roedores e humanos (ver revisão em De Graaf-Peters e Hadders-Algra, 2006; Rice e Barone, 2000; ver revisão em Charil et al., 2010). Em ratos, a maturação sináptica continua após o parto, nas primeiras três semanas. Em macacos e em seres humanos, essa maturação se estende até o período da adolescência (ver revisão em De Graaf-Peters e Hadders-Algra, 2006; ver revisão em Rice e Barone, 2000; ver revisão em Charil et al., 2010).

É importante ressaltar que se a proliferação celular for afetada, a migração e a diferenciação celular também sofrem alterações (Rice e Barone, 2000; ver revisão em Charil et al., 2010). As endotoxinas prejudicam o desenvolvimento encefálico que, por sua vez, promove alterações na plasticidade neural, interferências no grau de mielinização dos neurônios e na citoarquitetura do córtex pré-frontal e hipocampo. Se tal prejuízo ocorrer no momento da diferenciação celular ou na fase inicial da gestação, momento esse da proliferação celular ou da migração, todas essas ocorrências resultarão em potenciais alterações morfológicas localizadas na mesma região encefálica (ver revisão em Charil et al., 2010).

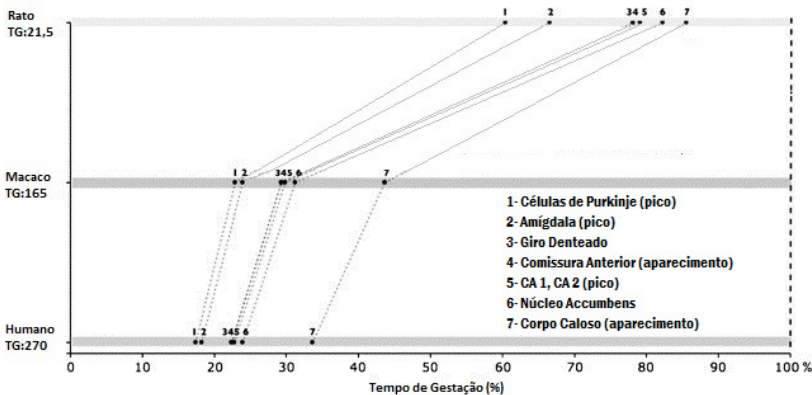


Figura 1: Tempo de desenvolvimento fetal durante a gestação do rato (21,5 dias), macaco (165 dias) e humano (270 dias). (Modificado de Charil et al. 2010).

1.3 Mecanismos transplacentários do estresse intra-uterino

A exposição materna ao estresse pode alterar as respostas do indivíduo (feto) no período de desenvolvimento intra-uterino. O estresse pré-natal é capaz de estimular o eixo HPA materno e esse produzir um aumento do CRH placentário para a corrente sanguínea. O CRH placentário atinge o encéfalo fetal (**Figura 2**) pela ativação de receptores CRH, prejudicando as áreas hipocampais, parahipocampal e límbicas por possuírem grande quantidade de receptores para CRH (ver revisão em Charil et al. 2010).

Um aumento progressivo nos níveis de CRH do plasma fetal é observado em decorrência do estresse intra-uterino. Diferentemente da produção do CRH hipotalâmico, que é suprimido pela liberação do cortisol, o CRH placentário aumenta com a liberação dos GCs (ver revisão em Charil et al. 2010). A hiperatividade do eixo HPA fetal é mediada pela expressão reduzida de receptores de glicocorticóides no hipocampo, resultando no baixo controle de retroalimentação negativa da atividade do eixo HPA (ver revisão em Cottrell e Seckel, 2009). O hipocampo é a estrutura central contendo um maior número de receptores para glicocorticóides e mineralocorticóides, motivo pelo qual é mais sensível a ação dos GCs, o que está relacionado a disfunções psiquiátricas como a depressão (ver revisão em Reul et al., 2000).

Devido à disponibilidade temporal e espacial de receptores para glicocorticóides e mineralocorticóides durante o desenvolvimento gestacional em áreas do encéfalo, o indivíduo pode responder consequentemente de forma diferente às manipulações com glicocorticóides sintéticos aplicados durante determinado período gestacional (Owen e Matthews, 2003). Segundo Koenig et al., 2005, o período final da gestação é de vulnerabilidade máxima para os transtornos neuropsiquiátricos, como a esquizofrenia, e é nesse período em ratos que ocorre a expressão dos receptores para glicocorticóides. Em cobaias, durante o período final da gestação, observa-se um aumento dos receptores de glicocorticóides e redução dos receptores para mineralocorticóides no hipocampo e redução dos receptores para glicocorticóides no PVN. Esses receptores, por sua vez, atuam na regulação do eixo HPA. Adicionalmente, observa-se um aumento do ACTH e do cortisol plasmático (Owen e Matthews, 2003).

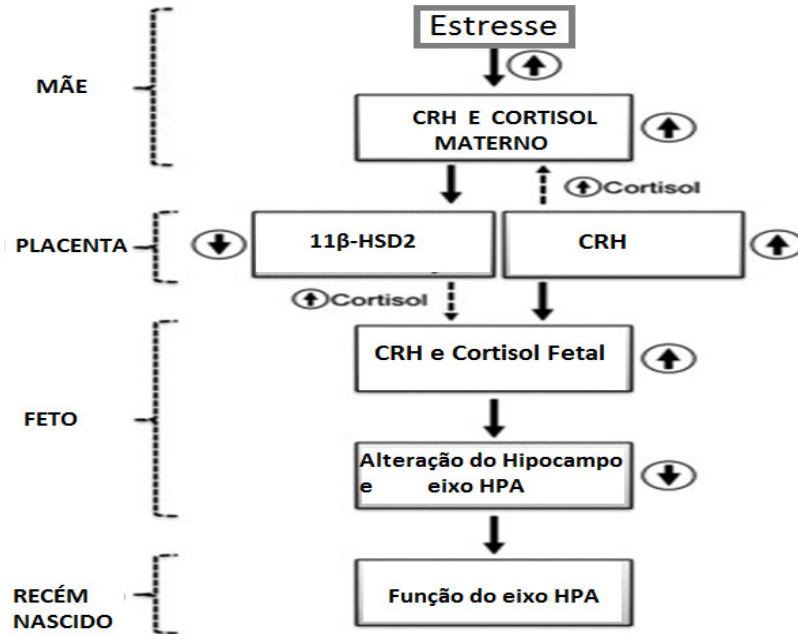


Figura 2: O papel do estresse intra-uterino na unidade mãe-placenta-feto em humanos. O estresse intra-uterino ativa o eixo HPA materno, aumentando os níveis de CRH e de cortisol na circulação materna. O cortisol, por sua vez, aumenta a produção e liberação de CRH placentário na circulação sanguínea. Em contraste com a produção hipotalâmica do CRH que é inibida pelo cortisol, a produção do CRH placentário está aumentada, induzindo um aumento do cortisol no plasma fetal. O CRH placentário atinge o encéfalo do feto, podendo influenciar o hipocampo fetal, ativando os receptores de CRH. O estresse intra-uterino também reduz a expressão e a atividade da 11 β -HSD2 na placenta. HPA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; CRH: hormônio liberador de corticotropina; 11 β -HSD2: desidrogenase tipo 11 β -hidroxiesteróide 2. (Modificado de Charil et al. 2010).

As proles adultas de ratas tratadas com dexametasona durante o período final da gestação apresentaram redução no volume e no número de células no Núcleo Accumbens (NACC). Adicionalmente, as taxas de proliferação celular mostraram-se reduzidas na Área Tegmental Ventral (ATV), área que envia projeções dopaminérgicas para o NACC, bem como para o leito do NACC (Leão et al., 2007).

Os níveis fetais de GCs em roedores se correlacionam com os níveis maternos de glicocorticóides, sugerindo que os fetos de mães

estressadas durante a gestação também estão expostos a elevados níveis de GCs (Takahashi et al., 1998). Os GCs maternos podem afetar o desenvolvimento renal, reduzir o número de néfrons, aumentar a expressão dos receptores para glicocorticóides, promover hipersensibilidade a vasoconstritores e afetar a regulação da pressão arterial na prole (ver revisão em Cottrell e Seckel, 2009). O aumento de receptores para glicocorticóide no fígado está relacionado ao aumento da expressão e atividade das enzimas gliconeogênicas, como a enzima fosfoenolpiruvato carboxicinase, resultando em resistência à insulina e intolerância à glicose na idade adulta (Nyirenda et al., 1998; ver revisão em Cottrell e Seckel, 2009).

A desidrogenase 11β -hidroxiesteróide placentária tipos 1 e 2 (11β -HSD 1/2) é um importante mecanismo de proteção materno-placentária que normalmente previne a transmissão de glicocorticóides em excesso para o feto; porém, sob condições de estresse crônico (estresse materno ou administração exógena de corticosterona), esses mecanismos podem se mostrar deficientes deixando o feto vulnerável a ação dos GCs. Assim, a placenta controla a exposição fetal aos hormônios tanto maternos como placentários, como por exemplo, o cortisol. A inibição da enzima 11β -HSD2 pelo estresse intra-uterino pode ser responsável pelo baixo peso ao nascer, parto prematuro e pré-eclâmpsia. Assim, o CRH placentário e a 11β -HSD2 desempenham papéis importantes na modulação dos efeitos do estresse intra-uterino e, possibilita considerar a placenta como órgão primário na programação fetal (ver revisão em Charil et al., 2010).

O estresse intra-uterino, através da ação das catecolaminas pode aumentar a resistência vascular da placenta e provocar prejuízo do fluxo sanguíneo e aumento da resistência vascular. Vários estudos encontraram associações entre inflamação da placenta e desordens do desenvolvimento neurológico e danos encefálicos (ver revisão em Charil et al., 2010).

1.4 Mecanismos transplacentários do estresse pré-natal por LPS

A administração sistêmica de LPS, um componente da parede celular de bactérias gram-negativas, leva à ativação da resposta imune inata que consiste principalmente na indução de citocinas, inflamação, febre, ativação da cascata do complemento, ativação do eixo HPA e a exibição de um comportamento doentio. A

ligação do LPS ao receptor do tipo toll (TLR-4) em macrófagos e outras células do sistema imunológico desencadeia uma transdução de sinais em cascata (**Figura 3**), levando à ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NFκB) e posterior transcrição dos genes que codificam citocinas pró/anti-inflamatórias, quimiocinas e proteínas do sistema complemento. O LPS promove a síntese e liberação de uma família de citocinas pró-inflamatórias; as mais proeminentes são as interleucinas, IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), sendo o TNF- α um dos principais mediadores dos efeitos deletérios (ver revisão em Boksa, 2010).

O LPS injetado em ratos durante a gestação provoca a liberação do TNF- α , IL-1 β e IL-6 após 2-8 horas no líquido amniótico e na placenta. De modo semelhante, observa-se após 4 horas um aumento na concentração de IL-1 β no plasma fetal. Em camundongos observa-se após uma hora e meia o aumento de TNF- α no fluido amniótico, fígado e encéfalo dos fetos. Adicionalmente, após 3 horas ocorre à liberação de IL-6 no encéfalo dos fetos (ver revisão em Boksa, 2010).

Os filhotes expostos ao LPS, gerados por mães que receberam LPS no período pré-natal, apresentam uma redução dos níveis de TNF- α e IL-1 β , da contagem de monócitos, eosinófilos e neutrófilos durante o período neonatal, devido ao comprometimento da ativação do TLR4. Os níveis de corticosterona circulantes também se apresentam reduzidos e essa redução pode estar relacionada com os baixos níveis de IL-1 β , pois a mesma é capaz de ativar o eixo HPA (Hodyl et al., 2008). Outra possível explicação está no período de exposição neonatal ao LPS (5º dia pós-natal) que é um período caracterizado pela transição imune de células T helper 2 (Th2) para células T helper 1 (Th1), período esse de colonização bacteriana normal que ocorre com a exposição ao ambiente extra-uterino. Por uma falha no sistema imune neonatal, semelhante a “hipótese da higiene”, a estimulação insuficiente por bactérias no período neonatal resultaria em uma falha para a maturação de Th1 e um conseqüente aumento na predominância de Th2 (Hodyl et al., 2008).

A IL-1 e o TNF- α são produzidos localmente no endotélio e agem sobre fibroblastos e células endoteliais induzindo sua própria síntese, bem como o de IL-6 e outras citocinas. Na seqüência, as IL-6 circulantes interagem com alvos no encéfalo induzindo a síntese da ciclooxigenase-2 (COX-2) que por sua vez promove a síntese de prostaglandinas (PG) no hipotálamo (ver em revisão Boksa, 2010).

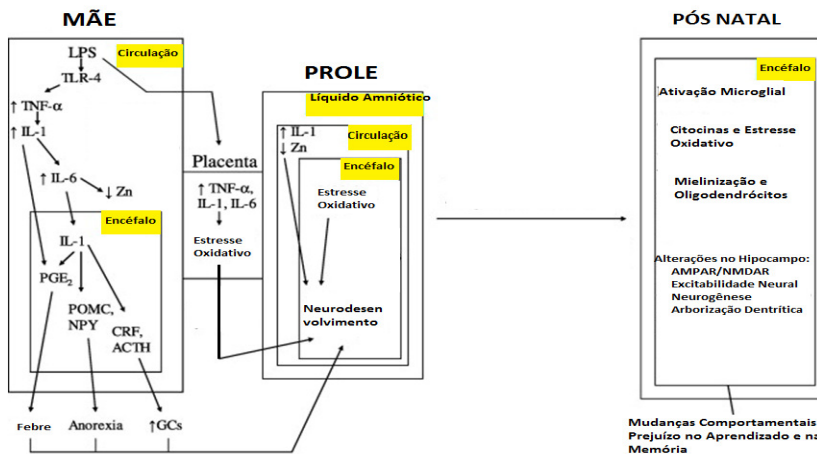


Figura 3: Possíveis mecanismos de mediação de efeitos da infecção intra-uterina na função encefálica. O diagrama ilustra os mecanismos envolvidos na mediação dos efeitos agudos e de longo prazo decorrentes da administração sistêmica de endotoxinas de bactérias, lipopolissacarídeos (LPS). A ligação do LPS no receptor TLR-4 induz a liberação das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6) e citocinas anti-inflamatórias, quimiocinas, prostaglandinas, leucotrienos e a ativação da cascata do complemento na circulação materna. A IL-6 interage com alvos no encéfalo que são capazes de induzir a síntese de ciclo-oxigenase-2, influenciar o eixo hipotalâmico (indução de um estado febril) e os neuropeptídeos (promover a anorexia e o aumento da secreção de glicocorticóides). O aumento da produção de citocinas também leva à diminuição de zinco no plasma fetal e materno, através da indução de metalotioneínas hepáticas. O LPS aumenta as citocinas placentárias e o estresse oxidativo, fatores que contribuem para a disfunção placentária. Os fatores acima mencionados contribuem para o prejuízo no desenvolvimento do encéfalo fetal, esses incluem o aumento de IL-6 no plasma materno, os níveis de glicocorticóides, febre materna, desnutrição, disfunção placentária, baixas concentrações de zinco materno / fetal, estresse oxidativo e exposição direta dos neurônios fetais a níveis aumentados de citocinas. Abreviaturas: AMPAR: receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propionato; CRF: fator de liberação de corticotropina; GCs: glicocorticóides; IL: interleucinas; LPS: lipopolissacarídeo; NMDAR: receptor N -metil- d - aspartato; NPY: neuropeptídeo Y; PGE: prostaglandina E; POMC: neurônios pró-opiomelanocortina; TLR: receptor do tipo toll; TNF: fator de necrose tumoral; Zn: zinco (Modificado de Boksa, 2010).

1.5 Efeito pós-natal do estresse intra-uterino induzido pelo LPS

Em humanos, sabe-se que as infecções provocadas por bactérias gram-negativas são reconhecidamente as causas de aborto e parto prematuro, devido à intensa resposta inflamatória (Romero et al., 1988). Em roedores, a administração de LPS intra-uterino tem sido associada a prejuízos no desenvolvimento, incluindo, óbito fetal e parto prematuro (Buhimschi et al., 2003).

As mudanças mais proeminentes observadas em longo prazo no encéfalo da prole, decorrentes de uma resposta inflamatória incluem: a ativação da microglia, aumento do estresse oxidativo, das citocinas, aumento dos níveis de Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP), lesões da substância branca e hipomielinização, alterações estruturais e eletrofisiológicas no hipocampo e alteração na transmissão de monoaminas (ver revisão em Boksa, 2010).

Em humanos, a infecção materna bacteriana possui também relação com a paralisia cerebral infantil. As citocinas possuem um papel importante na alteração morfológica encefálica, sendo diretamente relacionadas à morte neuronal, desorganização neuronal, sinaptogênese anormal, arborizações dendríticas deficientes e anormalidades nos sistemas neurotransmissores. Mesmo entre os prematuros que mais tarde desenvolveram paralisia cerebral, cerca de 50% não apresentam anormalidade craniana neonatal no exame de ultra-som. Uma possível explicação seria de que algumas anormalidades estruturais estão presentes, porém, o ultra-som não consegue detectá-las. Outra possibilidade é de que as limitações cognitivas não possuem uma correlação estrutural, mas sim, uma função anormal do cérebro (ver revisão em Dammann et al., 2002).

Os neurônios serotoninérgicos no sistema mesolímbico possuem grande participação no controle de comportamentos emocionais relacionados ao estresse, como ansiedade e depressão (ver revisão em Lowry et al., 2008). Adicionalmente, observa-se papel semelhante nos neurônios dopaminérgicos, e seu envolvimento em comportamentos de medo (ver revisão em Pezze e Feldon, 2004). As citocinas TNF- α e IL-1 β atuam na regulação da sobrevivência embrionária de neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos (Jaraskog et al., 1997). No 10º dia de gestação, a injeção de LPS (33 μ g/kg) provoca na prole redução de neurônios DA na substância negra e dos neurônios 5-HT no núcleo dorsal da rafe (Wang et al., 2009). Importante considerar que nesse período embrionário ocorre a gênese dos primeiros neurônios 5-HT

(11°-12° dia) (Lauder, 1990), e dos neurônios DA (12° dia) (Specht et al., 1981).

As fêmeas expostas ao LPS (100 mg / kg) no 9° dia da gestação, as proles adultas do sexo masculino apresentaram o comportamento social reduzido. A escolha do tempo para a injeção do estressor teve por base a formação da placa neural. Já os filhotes de fêmeas expostas ao LPS no 9° dia gestacional não mostraram o comportamento tipo ansiedade muito evidente. A explicação para essa observação pode estar relacionada com a fase inicial de desenvolvimento, quando, a exposição ao LPS seria capaz de provocar um impacto maior na organização cerebral associada ao comportamento social do que sobre o comportamento tipo ansiedade (Kirsten et al., 2010). Destaca-se que a exposição de fêmeas ao LPS em um período gestacional superior, ou seja, no 17° dia, resultou em aumento expressivo do comportamento tipo ansiedade na prole (Hava et al., 2006).

Esses dados são indicativos de que a exposição ao LPS em um estágio posterior de desenvolvimento embrionário é mais eficaz na indução de um fenótipo de ansiedade nas proles (Lin et al., 2011). A exposição ao LPS durante o período final da gestação aumenta o comportamento típico de ansiedade e depressão, que é proporcional à idade da prole do sexo masculino (Enayati et al., 2011).

A administração de IL-6 na gestação pode prejudicar o aprendizado espacial e provocar alterações no hipocampo da prole, incluindo a perda neuronal, astrogliose, aumento da subunidade do receptor GABAA α 5, subunidade do receptor NR1, aumento da expressão do mRNA para a GFAP e da proteína caspase-3 (Samuelsson et al. 2006; ver revisão em Boksa et al., 2010). O hipocampo também é alterado pelo LPS, que por sua vez reduz a atividade dos receptores de N-metil D-Aspartato (NMDA) e provocou prejuízos na plasticidade sináptica da região CA1 do hipocampo (Lanté et al., 2007; ver revisão em Boksa, 2010).

A administração de IL-1 na gestação tem relação com a ativação da microglia na substância branca do prosencéfalo e com os déficits motores da prole, associados com o quadro clínico de esquizofrenia (ver revisão em Boksa, 2010).

A infecção materna por LPS (Borrel et al., 2002), ou por Poly IC (do inglês *polyinosinic-polycytidylic acid*, ácido poli-inosínico-policitídilico), mostraram-se capazes de provocar indicadores comportamentais de esquizofrenia, observado na diminuição da Inibição do Pré Pulso (PPI) (Shi et al., 2003). Adicionalmente, a infecção materna por LPS alterou na prole adulta os marcadores

dopaminérgicos, com aumento da liberação dopaminérgica estriatal e anormalidades anatômicas em estruturas límbicas (Borrel et al., 2002).

Os animais com expressão aumentada de IL-10, pela exposição pré-natal ao Poli IC, apresentaram redução nos comportamentos indicadores de esquizofrenia, sugerindo que as citocinas anti-inflamatórias desempenham um papel protetor. No entanto, o aumento da expressão de IL-10 na ausência do tratamento pré-natal prejudicou o comportamento exploratório e a inibição latente, sugerindo que um balanço crítico de citocinas pró e anti-inflamatórias se faz necessário para um neurodesenvolvimento normal (Meyer et al., 2008; ver revisão em Boksa, 2010).

1.6 O estresse oxidativo e o estresse pré-natal

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são produtos de um metabolismo normal celular e desempenham um papel vital na estimulação de vias de sinalização em resposta a mudanças no meio intra e extracelular decorrente das condições ambientais (Jabs, 1999). A maioria das EROs são geradas nas células pela cadeia respiratória mitocondrial (Poyton et al., 2009).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e seus metabólitos reativos, as espécies reativas de oxigênio, e sua eliminação se dá por meio de mecanismos antioxidantes (Durackova, 2010).

Durante o estresse ocorre a ativação do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1 α) pelos receptores β -adrenérgicos e os receptores de citocinas na superfície celular, que ativam as vias de sinalização envolvendo a Proteína Quinase AMP ativada (PKA) e vias da Proteína Quinase Ativadas por Mitógeno (p38MAPK) (ver revisão em Manoli et al., 2007).

A PGC-1 α ativa a expressão dos Fatores Respiratórios Nucleares (NRFs) que por sua vez, regulam a transcrição do Fator de Transcrição Mitocondrial (Tfam), e interagem com o Receptor Relacionado ao Estrogênio (TRE), Receptor Proliferador Ativador de Peroxissoma (PPAR) e da tireóide e receptores de glicocorticóides e retinóides. Esses contribuem para a regulação da biogênese mitocondrial e vias de oxidação de ácidos graxos (ver revisão em Manoli et al., 2007).

Os mecanismos do estresse oxidativo ocorrem principalmente na mitocôndria, por ser o maior consumidor de oxigênio. Os glicocorticóides podem ativar os genes nucleares e mitocôndrias na

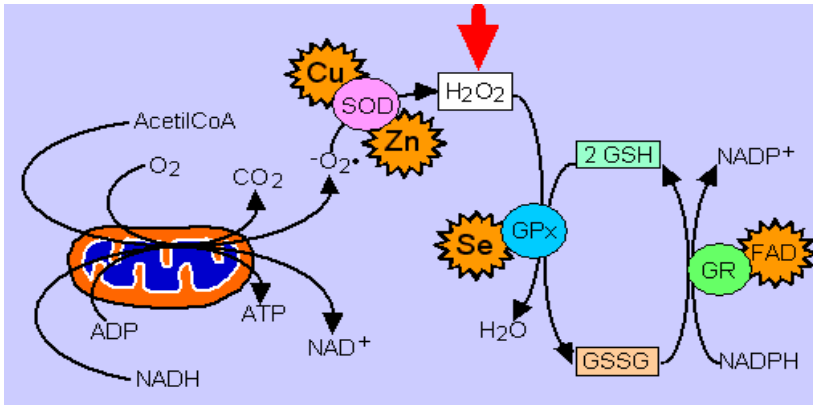
regulação da função e da biogênese mitocondrial, enquanto os receptores de glicocorticóides podem entrar na mitocôndria, regular DNA mitocondrial (DNAm_t) de transcrição, e aumentar a produção mitocondrial, com conseqüente aumento no bombardeamento de prótons na membrana mitocondrial e a geração de EROs (ver revisão em Manoli et al., 2007).

Durante a inflamação, células da imunidade inata, como os mastócitos e leucócitos deslocam-se para o local da lesão, com conseqüente aumento celular respiratório que resulta no aumento da liberação e de acúmulo de EROs no local do dano (ver revisão em Hussain et al., 2003).

A infecção durante a gestação induzida por injeção de LPS aumenta os marcadores indicativos de estresse oxidativo, além de provocar redução da atividade antioxidante como a redução dos níveis de glutathiona no encéfalo dos fetos (Paintlia et al., 2008; Lanté et al., 2008; ver revisão em Boksa, 2010). Em adição, o aumento dos marcadores indicativos do estresse oxidativo nos filhotes, e a redução da glutathiona também se apresentam reduzidos no encéfalo dos neonatos (Zhu et al., 2007; ver revisão em Boksa).

O LPS no período gestacional é capaz de provocar estresse oxidativo no hipocampo de fetos machos, evidenciado por uma ascensão rápida na carbonilação de proteínas e pela diminuição dos níveis de α -tocoferol e na proporção da glutathiona reduzida / glutathiona oxidada (GSH / GSSG), prejuízos das correntes de NMDA na região CA1 do hipocampo e conseqüente prejuízo da memória espacial, prejudicando tanto a plasticidade sináptica quanto a memória espacial nas proles adultas (Lanté et al., 2007).

Vários antioxidantes protegem as proles de camundongos contra o óbito e retardo no crescimento como conseqüência da exposição intrauterina ao LPS (Xu et al., 2005 e Chen et al., 2006). O estresse oxidativo no encéfalo do feto pode ser prevenido pelo tratamento das mães, com N - acetilcisteína, que é um anti-oxidante e inibidor do NF κ B, antes e posteriormente à administração de LPS (Lanté et al., 2008; ver revisão em Boksa). Os mecanismos celulares antioxidantes constituem um sistema complexo enzimático (por exemplo, superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase, catalase e antioxidantes não-enzimáticos (por exemplo, glutathiona (GSH), vitaminas C e D) (Sies et al., 1991).



(<http://www.unifesp.br/dneuro/nexp/riboflavina/d.htm>)

Figura 4: Ação da glutatona no sistema antioxidante. A atividade da cadeia transportadora de elétrons leva a formação do ânion superóxido ($-O_2^{\bullet}$) que sob a ação da enzima superóxido dismutase (SOD) origina o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é convertido em água pela ação da enzima glutatona peroxidase (GPx). Essa reação consome duas moléculas de glutatona que são oxidadas (GSSG). Em seguida, a GSH é regenerada através da enzima glutatona redutase (GR) que reduz GSSG a GSH (Modificado de Prevedello, 2009).

1.7 Peso corporal e os modelos de estresse no período intra-uterino

Crianças geradas por mães expostas a estressores psicossociais durante o período médio e final de gestação tendem a nascer prematuras e com menor tamanho (Lou et al., 1994; Wadhwa et al., 1993). A administração de dexametasona no período final da gestação provocou redução do peso ao nascer (Levitt et al., 1996).

O estresse por desnutrição materna provoca diferentes efeitos em relação à redução/aumento do peso corporal, dependendo do período em que é aplicado (ver revisão em Charil et al., 2010). A desnutrição em mulheres gestantes durante o 3º trimestre de gestação reduz o tamanho da placenta e o peso do recém-nascido; porém, quando a desnutrição ocorre durante o primeiro trimestre da gravidez, aumenta o peso placentário, sem qualquer impacto sobre o peso dos recém-nascidos (Lumey, 1998; ver revisão em Charil et al., 2010). A restrição alimentar em roedores a partir da metade da gestação diminui o tamanho da placenta e do peso fetal. A explicação para essa consequência é que a

desnutrição afeta de forma irreversível o peso da placenta no período máximo de demanda nutricional para o feto, provocando redução da demanda nutricional, o que contribui para o baixo peso corporal após o nascimento (Belkacemi et al., 2009; ver revisão em Charil et al., 2010)

Em humanos, gestantes que passaram por restrição nutritiva (Fome Holandesa-1944-1945) durante a gestação tiveram maior incidência de filhos adultos do sexo masculino com obesidade, doenças cardíacas e diabetes (Roseboom et al., 2000). Em roedores expostos a vários estressores (nado forçado, exposição ao frio, restrição, estresse social e alteração do ciclo claro/escuro), em momentos imprevisíveis durante a gestação, observou-se um aumento na massa corporal em descendentes do sexo masculino, que persistiu até a idade adulta do mesmo (Schulz et al., 2011). Estressores variados aplicados de forma imprevisível durante a gestação induziram nas proles um aumento no peso em ambos os sexos (Thamashiro et al., 2009). Há estudos que relatam um efeito contrário, ou seja, redução do peso corporal, em proles de mães submetidas ao estresse de nado forçado durante a gestação (Drago et al., 1999).

Segundo a hipótese de Barker et al., 1998, alterações metabólicas e endócrinas maternas podem promover uma “programação” permanente na prole, de modo a alterar mecanismos neuroendócrinos relacionados ao metabolismo e contribuir com a promoção de doenças coronárias, diabetes e hipertensão. Sabe-se que os hormônios podem atravessar a barreira placentária-fetal e participar nesse processo de programação, como a insulina (Menon et al., 1990), corticosterona (Takahashi et al., 1998; Lesage et al., 2001) e a leptina (Smith e Waddell et al., 2003).

O período pós-natal também é crucial para a formação do sistema regulador de apetite no hipotálamo. As projeções para o núcleo arqueado em roedores desenvolvem-se plenamente na 3ª semana pós-natal (Grove et al., 2005). Os receptores de glicocorticóide são altamente modificados no período pós-natal; por exemplo, indivíduos com maior cuidado materno tendem a ter aumento na expressão de GR no hipocampo e menor resposta do eixo HPA. Dados opostos são observados em proles que passaram por um menor cuidado materno (Weaver et al., 2004).

1.8 Mecanismos de ação do midazolam, e o efeito ansiolítico sob condições de estresse

O tratamento com benzodiazepínicos produz efeitos ansiolíticos nos animais avaliados no labirinto em cruz elevado (ver revisão em Rosa et al., 2000). A avaliação do comportamento tipo ansiedade no labirinto em cruz elevado se dá através das medidas de espaço e o tempo em evasão dos braços abertos (ver revisão em File, 1992), comportamento de avaliação de risco (ver revisão em Cruz et al., 1993) e atividade locomotora (ver revisão em File, 1992). Um aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos ou na porcentagem de tempo nos braços abertos indica redução da ansiedade (ver revisão em Menard e Treit, 1999). A redução da atividade locomotora é indica o comportamento do tipo ansiedade (ver revisão em File, 1992). O comportamento de avaliação de risco é caracterizado como postura estendida, mergulho de cabeça nas laterais abertas e, é uma estratégia etológica indicadora de comportamento tipo-ansiedade (ver revisão em Cruz et al., 1993).

Os benzodiazepínicos agem nos receptores GABA-A (ácido γ -aminobutírico). Essa ação dos benzodiazepínicos por sua vez, promove uma resposta inibitória neural, através do aumento da frequência da abertura dos canais de Cl^- (ver revisão em Allison e Pratt, 2008).

Os compostos benzodiazepínicos são capazes de atenuar a ansiedade. Esses agem principalmente no hipotálamo (Zahner et al., 2007) amígdala, *Locus coeruleos*, núcleo do trato solitário (Caldji et al., 2000) e a substância cinzenta periaquedutal (Mendes-Gomes e Nunes-de-Souza, 2005). A explicação para essa alteração comportamental se dá porque os neurônios gabaérgicos possuem forte influência inibitória sobre as vias de estresse. O núcleo dorsomedial hipotalâmico, o núcleo leito da estria terminal e a área pré-óptica medial possuem projeções gabaérgicas e conseqüentemente um papel inibitório sobre o PVN, responsável pela liberação do CRH. O núcleo dorsomedial hipotalâmico promove a inibição da neurotransmissão do PVN e a área pré-óptica medial inibe a secreção de corticosterona e a estimulação da amígdala (ver revisão em Hermann et al., 2008).

A sensibilidade da subunidade do receptor GABA-A pode ser modulada por fatores ambientais como o estresse (Biggio et al., 1990). Uma hipótese teórica nas alterações provocadas no sistema gabaérgico pelo estresse está baseada na idéia de que o potencial de reversão do Cl^- na membrana da célula ter sido modificado em certas regiões do

cérebro, especialmente em indivíduos que foram expostos a estímulos estressores (ver revisão em Bäckström et al., 2011). Nos vertebrados durante o desenvolvimento fetal e no período pós-natal inicial, a concentração intracelular de Cl^- é comparativamente elevada, e por esse motivo a ativação de receptores GABA-A causa excitação. Em contraste, a concentração intracelular de Cl^- nos neurônios de adultos é relativamente baixa e a ativação de receptores GABA-A proporciona uma inibição da atividade neuronal. O potencial de membrana no sistema gabaérgico pode se alterar no período embrionário e causar modificações duradouras neste sistema (Kahle et al., 2008; ver revisão em Bäckström et al., 2011).

Considerando a relevância dos dados expostos e a necessidade de elucidar as alterações fisiológicas e comportamentais provocadas na prole decorrentes da exposição a diferentes estímulos estressores, o presente trabalho se propôs a investigar os efeitos da exposição ao estressor imunogênico LPS no período intra-uterino e na idade adulta sobre o comportamento tipo-ansiedade e no mecanismo anti-oxidante da GR. De modo a ampliar esses conhecimentos, o protocolo experimental de adoção cruzada (cuidados com as proles - mães biológicas X mães adotivas/substitutas) foi inserido nesse estudo, com o objetivo de analisar o impacto dessa variável no modelo de exposição ao estresse intra-uterino.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto do estresse intra-uterino sobre o comportamento tipo ansiedade e a atividade da glutatona redutase no córtex e hipocampo de camundongos na idade adulta.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o impacto do estresse intrauterino, LPS aplicado no período gestacional, sobre o peso corporal, o comportamento do tipo ansiedade e a atividade da glutatona redutase no córtex e hipocampo da prole adulta.
- Avaliar o comportamento do tipo ansiedade em camundongos expostos ao LPS na fase adulta, provenientes de mães expostas ao LPS no período gestacional.
- Avaliar os efeitos do midazolam administrado em prole de camundongos na fase adulta, provenientes de mães expostas ao LPS no período gestacional.
- Avaliar o impacto da adoção cruzada na prole adulta de camundongos submetidos ao modelo de exposição ao LPS na fase intra-uterina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos do presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo 23080.029998/2009-23).

3.1 Animais

Trinta e seis casais de camundongos suíços fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) foram utilizados para a reprodução. Todos os animais foram mantidos em salas com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo de claro / escuro 12:12 (luzes acesas 6:00-18:00 h) em gaiolas de polipropileno (19 cm \times 30cm \times 13 cm) antes do demame. Após esse período, os animais foram isolados em gaiolas (13X30X19), contendo água e ração Nuvilab *ad libitum*, com a seguinte composição nutricional: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, vitamina A, vit. D3, vit. E, vit. K3, vit. B1, B2, B6 e B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina.

3.2 Acasalamento dos animais

O protocolo de acasalamento dos camundongos consistiu na introdução de machos férteis em gaiolas de reprodução onde se encontravam fêmeas residentes, mantendo-se um casal por gaiola. O primeiro dia de gestação foi determinado através da visualização do plug vaginal. No oitavo dia de gestação, as fêmeas foram divididas aleatoriamente em dois grupos distintos, de acordo com os protocolos experimentais abaixo.

3.3.1 Exposição de fêmeas prenhas ao estressor imunogênico – LPS.

Grupo L: As fêmeas prenhas receberam uma única dose de LPS (10 µg/kg de LPS (*Escherichia coli* sorotipo 055: B5 - Sigma Chemical Co. - St. Louis, MO) diluído em PBS (0,1 M) em 0,2 ml (XU et al., 2007). A injeção de LPS foi feita por via intraperitoneal, às 8:00 da manhã, início do período claro.

Grupo C: As fêmeas desse grupo foram mantidas sem manipulação durante o período gestacional (grupo controle).

As fêmeas de ambos os grupos foram mantidas isoladas em câmaras distintas, sem a possibilidade de contato auditivo e visual direto com outros animais, mas com as mesmas condições ambientais de temperatura, iluminação e ventilação.

3.3.2 Tratamento das proles

Os filhotes das fêmeas dos grupos L (injetadas com LPS) e C (não manipuladas) foram desmamados no 21º de vida, alojados individualmente em gaiolas de polipropileno (19 cm × 30cm × 13 cm) e o peso corporal mensurado a cada três dias, até os animais completarem 45 dias de vida. No 45º dia, às 8:00 horas da manhã (período claro), os filhotes das fêmeas dos grupos L e C foram aleatoriamente distribuídos em subgrupos, sendo cada um deles constituído de no mínimo 11 animais. Esses animais receberam tratamento diferenciado como explicado na **Tabela 1**, a seguir:

Tabela 1: Representação do protocolo experimental do tratamento das proles.

Grupos – Fêmeas prenhas/tratamento no 8º dia de gestação	Subgrupos - Proles tratadas no 45º dia de idade	Histórico da prole (primeira letra- tratamento mãe, segunda letra - tratamento prole)
L	L	L/L
L	P	L/P
L	M	L/M
L	S	L/S
C	L	C/L
C	P	C/P
C	M	C/M
C	S	C/S

Legenda: Grupos-tratamento das fêmeas prenhas: L=(LPS - 10 µg/kg/i.p./0,2mL), C=controle, sem manipulação. Subgrupos-tratamento da prole: L=(LPS - 5µg / kg/i.p./0,2mL), P=(PBS - 0,2 ml/animal), M=(Midazolam - 1,0 mg / kg/0,2ml), S=(Sem tratamento).

3.3.3 Exposição das proles ao labirinto em cruz elevado (LEC)

Os animais pertencentes aos subgrupos L e P foram testados no LEC, cerca de quatro horas após a injeção de LPS ou PBS. Os animais do subgrupo M foram testados 30 minutos após a injeção de midazolam. Os animais do subgrupo S, não manipulados, foram igualmente testados no LEC. Após a finalização desse teste, os animais foram sacrificados mediante anestesia por inalação de éter vaporizado. As amostras de hipocampo e do córtex frontal foram coletadas e armazenadas em freezer a -80 ° C para posterior medida da atividade da GR.

3.4 Adoção cruzada (*cross-fostering*)

Os animais submetidos à adoção foram transferidos para as fêmeas progenitoras (“mães adotivas”) do mesmo grupo experimental. O termo adoção também será utilizado em alguns momentos, de forma

genérica como referência a transferência de ninhadas entre “mães biológicas e adotivas”, a despeito de ser adoção cruzada ou não.

O método de adoção cruzada consiste em remover os filhotes de suas “mães biológicas” ao nascimento e colocá-los para serem criados por “mães substitutas” que receberam outro tratamento durante a gestação (os filhotes de uma “mãe” são adotados por outra, e vice-versa).

Todos os protocolos de adoção, cruzada ou não, foram realizadas no intervalo de no máximo 24 horas após o nascimento.

3.4.1 Tratamento de fêmeas prenhas biológicas ou adotivas e proles.

As progenitoras “mães biológicas ou adotivas”, foram submetidas ao mesmo protocolo experimental citado no item 3.3, ou seja, receberam a injeção de LPS (10 µg/kg) - Grupo L) ou não foram submetidas à manipulação - (Grupo C).

As proles foram submetidas aos mesmos tratamentos, citados no item 3.3.1, ou seja, administrados com LPS (5µg/kg/intraperitoneal), PBS (0,2 mL/animal) ou midazolam (1,0 mg/kg/0,2mL).

Com o objetivo de avaliar o efeito dos diferentes tratamentos realizados nas “mães” sobre as proles tratadas ou não, várias combinações experimentais de adoção cruzada foram realizadas e estão descritas na **Tabela 2**. As combinações abaixo são representativas dos tratamentos realizados.

Tabela 2: Representação do protocolo experimental de adoção.

Tratamento da fêmea biológica	Tratamento da fêmea adotiva	Tratamento da prole no 45º dia de idade	Histórico da prole (primeira letra - mãe biológica, segunda letra - mãe adotiva e terceira letra - tratamento da prole)
L	C	L	LC/L
L	C	P	LC/P
L	C	M	LC/M
C	L	L	CL/L
C	L	P	CL/P
C	L	M	CL/M
C	C	L	CC/L
C	C	P	CC/P
C	C	M	CC/M

Legenda: Grupos-tratamento das fêmeas prenhas biológicas e adotivas: L=(LPS - 10 µg/kg/i.p./0,2mL), C=controle, sem manipulação. Tratamento da prole: L= (LPS - 5µg / kg/i.p./0,2mL), P=(PBS - 0,2 ml/animal), M=(Midazolam - 1,0 mg/kg/0,2ml), S=(Sem tratamento).

3.4.2 Exposição das proles submetidas à adoção cruzada no Labirinto em Cruz Elevado (LEC).

Todos os animais expostos ao protocolo de adoção foram testados no LCE. As proles que receberam a injeção de LPS ou PBS foram expostas ao LEC, após transcorridas quatro horas desse procedimento. Por sua vez, as proles tratadas com midazolam foram expostas ao LEC, 30 minutos depois da referida aplicação.

3.5 Teste no Labirinto em Cruz Elevado

O teste do LEC foi realizado em um labirinto adaptado para camundongos em sessão única de 5 minutos para cada animal. O aparelho, feito de PVC, possui quatro braços cruzados de 35 cm de

comprimento e 5 cm de largura, com dois deles, opostos, fechados por paredes laterais de 15 cm de altura. Os braços abertos contêm bordas com 2 mm de altura ao longo de todo o seu perímetro para evitar a queda dos animais. O labirinto ficou elevado a 40 cm de altura do piso. A sala onde os testes foram realizados possuía uma câmera digital com sistema infravermelho de foto feixe, localizada 150 cm acima do labirinto e que permitiu a gravação do comportamento do camundongo no escuro. A gravação foi feita em VHS e analisadas off-line com o software freeware Etholog, disponível no endereço <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/2727/ethohome.html> site. Os níveis do comportamento do tipo-ansiedade foram determinados, considerando:

1. a percentagem de tempo gasto nos braços abertos (% TBA);
2. a porcentagem de tempo gasto na avaliação de risco (%TAR);
3. a duração média dos episódios de avaliação de risco (EMAR), calculada pela divisão da somatória do tempo em avaliação de risco, pelo número de avaliações de risco no teste no LCE,
4. a ambulância que é o somatório de entradas no braço aberto e do braço fechado e
5. o número de avaliações de risco (NRisco).

O achatamento das costas e alongamento do corpo do animal em uma postura de “espiar se esticando” sobre o braço aberto, bem como mergulhar de cabeça para o lado do labirinto e voltar nos braços fechados, foram adotados como medida de avaliação de risco.

3.6 Atividade da glutathione redutase

O hipocampo e o córtex frontal de cada animal foi homogeneizado em 300 μ L de tampão HEPES (20 mM, pH 7,0), centrifugados a 20.000 força centrífuga relativa (FCR) a 4° C e o sobrenadante coletado para a dosagem da enzima GR. A atividade da GR foi determinada pelo método descrito por Carlberg e Mannervik, 1971. A leitura foi realizada em um comprimento de onda de 340 nm em um espectrofotômetro. O meio de reação foi composto de 10 mL de tampão fosfato (KPI) 0,25 M, 9,94 mL de água destilada e 53,3 mL de NADPH (100 mM). Para determinar o valor basal das amostras no espectrofotômetro, foi adicionado a cubeta 400 mL do meio de reação em 55 mL de água destilada e 20 mL de amostra. Uma vez determinado o valor basal base usando um comprimento de onda de 340 nm, foi adicionado 25 mL do substrato GSSG para permitir o consumo de

NADPH na reação por cinco minutos. O decaimento por minuto foi obtido subtraindo-se o consumo de NADPH inespecífica. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) multiplicado pela diluição. O valor foi expresso em unidades / mg de proteína. Uma unidade = 1 mmol / ml / min. Para a análise da atividade da GR, o conteúdo de proteína total no córtex e hipocampo foi quantificada pelo método de Bradford (1976). A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 595 nm usando albumina bovina.

3.7 Análise Estatística

Os resultados do LEC foram expressos em média e erro padrão da média e submetidos à análise de variância de 3-vias (ANOVA): 1- exposição ou não da fêmea gestante ao LPS, 2- Exposição ou não da prole na idade adulta ao LPS, PBSou midazolam 3- sexo (macho e fêmea).

Os níveis da atividade de enzimas antioxidantes GR foram expressos como média e erro padrão da média e foram submetidas a uma análise de variância de 4-vias, com os mesmos fatores considerados na análise do comportamento e acrescentando o local de mediada da atividade da enzima (córtex frontal e hipocampo).

Os efeitos da adoção (transferência de prole de mãe C para mãe adotiva C) foi submetida à análise de variância de 3 vias: 1- adoção (prole adotada e não adotada), 2 – tratamento antes do teste no LEC (P, L,M) e 3- sexo (macho, fêmea).

Os dados da adoção cruzada (mãe biológica e adotiva com tratamentos diferentes) foram submetidas a uma análise variância de 4- vias, com as seguintes variáveis: 1- tratamento mãe progenitora (C ou L), 2- tratamento mãe adotiva (C ou L), 3- tratamento da prole antes do teste no LEC (P, L, M), 4-sexo (macho e fêmea).

O peso corporal foi submetido a uma análise de variância 2- vias para amostras repetidas.

O teste Post-hoc utilizado foi o teste de Tukey. O valor p independentemente do resultado obtido, foi limitado em sua apresentação para $p < 0,01 (**)$ e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05 (*)$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do peso corporal nas proles geradas por fêmeas expostas ao LPS

A exposição de fêmeas prenhas ao estressor imunogênico provocou aumento no ganho de peso corporal das proles, quando comparado com as proles de mães controle (**Figura 5**), ($F(7, 609) = 8,0457$, $p < 0,01$). Essa diferença foi significativa a partir do 33º ao 45º dia de vida nas proles fêmeas ($p < 0,001$).

A análise do resultado de ganho de peso corporal das proles, independentemente da manipulação realizada nas fêmeas prenhas mostrou que camundongos machos apresentam um ganho de peso corporal maior do que as fêmeas ($F(1, 87) = 5,9302$, $p < 0,05$).

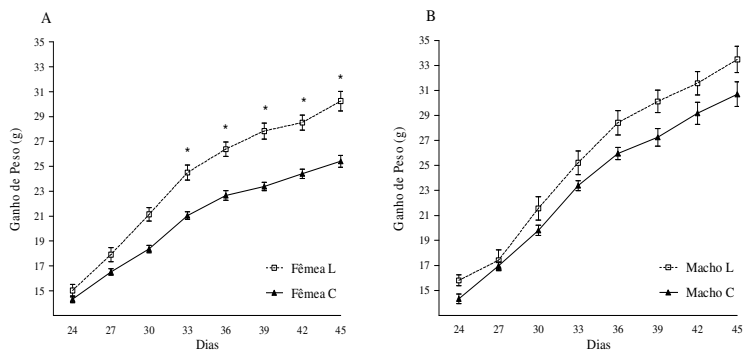


Figura 5: Média e erro padrão do ganho de peso corporal aferido no período pós-natal nas proles fêmeas (A) e machos (B) de camundongos gerados por fêmeas injetadas com LPS /Grupo L e por fêmeas não manipuladas/Grupo C. Obs.: Os asteriscos sobre as barras indicam o nível de significância estatística na comparação de proles que receberam tratamento pré-natal diferente (* = $p < 0,05$).

4.2 Análise do comportamento do tipo ansiedade

O comportamento do tipo ansiedade foi analisado pela Porcentagem de Tempo nos Braços Abertos (%TBA), pela Porcentagem de Tempo em Avaliação de Risco (%TAR), pelo número de avaliações de risco (NRISCO), Episódio Médio em Avaliação de Risco (EMAR) e a ambulação.

4.2.1 Porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA)

O comportamento do tipo ansiedade, avaliado pela %TBA, foi afetado pelos fatores: 1. exposição ao LPS no período gestacional, 2. sexo e 3. exposição ao LPS na idade adulta ($F(1, 109) = 36,410$, $p < 0,01$), contudo, sem apresentar interação.

Uma redução significativa na %TBA foi constatada nas proles geradas por fêmeas expostas ao LPS, quando esse dado foi comparado com o observado em proles geradas por fêmeas não manipuladas (Grupo C) (Figura 6A).

4.2.2 Porcentagem de tempo em avaliação de risco (%TAR)

A exposição ao LPS no período gestacional promoveu alterações na porcentagem de tempo em avaliação de risco ($F(1, 109) = 16,503$, $p < 0,01$), (Figura 6B e 6C).

Observou-se uma redução significativa da %TAR nas proles geradas por fêmeas expostas ao LPS em relação ao grupo CT ($p < 0,01$). O fator, exposição ao estressor imunogênico no período gestacional, apresentou interação estatística significativa com o fator sexo ($F(1, 109) = 4,7336$, $p < 0,05$), de forma que, as proles fêmeas geradas por fêmeas não manipuladas (controle) apresentaram maior %TAR, quando comparadas com as proles machos ($p < 0,05$).

A análise dos fatores sexo e exposição ao estressor imunogênico no período gestacional mostraram um efeito significativo sobre a %TAR ($F(1, 51) = 13,641$, $p < 0,01$), de modo a provocar uma diminuição nas fêmeas ($p < 0,01$). Esses dados foram obtidos ao efetuar-se a comparação com as proles fêmeas geradas por fêmeas não manipuladas. Na análise comparativa post-hoc, as fêmeas expostas ao LPS no período gestacional, independentemente da exposição ao LPS na idade adulta

(L/S, L/P e L/L), apresentaram menor %TAR ($p < 0,05$) comparados as proles geradas por fêmeas controles (C/S, C/P e C/L).

4.2.3 Análise do número de avaliação risco (Nrisco)

A análise do número em avaliação de risco (Nrisco) não sofreu a influência da exposição ao LPS no período gestacional, assim como da exposição da prole ao LPS na idade adulta (**Figura 7D e 6E**). O único fator que provocou efeito no Nrisco foi o sexo: as proles fêmeas realizaram a avaliação de risco com maior frequência quando comparadas com as proles machos ($F(1, 109) = 4,2987, p < 0,05$).

4.2.4 Episódio médio de avaliação de risco (EMAR)

O episódio médio de avaliação de risco (EMAR) nas proles geradas por fêmeas expostas ao LPS foi menor quando comparado com o EMAR das proles geradas por fêmeas não manipuladas ($F(1, 109) = 21,164, p < 0,01$). O EMAR não sofreu influência do fator sexo e da exposição ao LPS na idade adulta, assim como também não foi observada interação entre o fator sexo e exposição ao LPS na idade adulta (**Figura 7F**).

4.2.5 Ambulação

As proles expostas ao LPS no período gestacional mostraram um padrão de ambulação diferente das proles geradas por mães não manipuladas ($F(1,109) = 5,83, p = 0,01734$). O fator, exposição ao estímulo estressor no período gestacional, interagiu com a exposição ou não ao LPS na vida adulta ($F(2,109) = 5,147, p = 0,073$). Embora os valores de ambulação sejam muito semelhantes, o efeito da exposição ao LPS no período de desenvolvimento fetal se faz presente ao expor a prole adulta a um estressor. A análise post-hoc não mostrou significância estatística na comparação dois a dois entre os grupos (**Figura 7 G**).

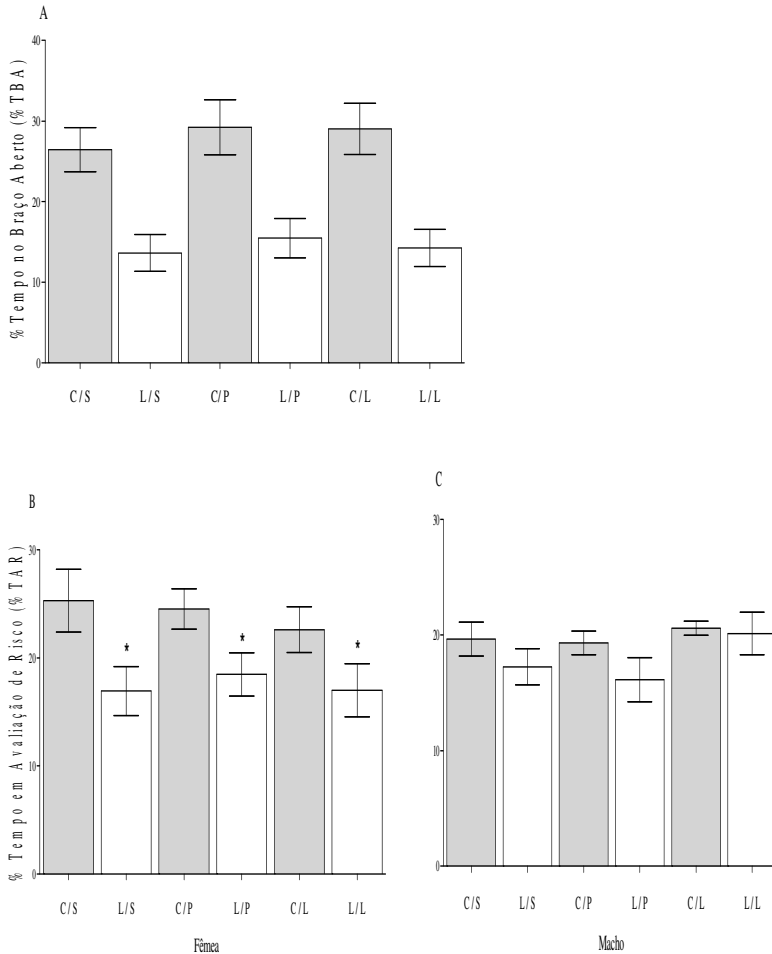


Figura 6: Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado (LEC) de proles geradas por fêmeas expostas ao LPS durante o período gestacional, dados expressos em média e erro padrão da média: A- Porcentagem de tempo nos braços abertos (% TBA) sem distinção de sexo; B - Porcentagem de tempo em avaliação de risco (% TAR) em fêmeas; C - %TAR em machos. Siglas: Exposição da fêmea gestante: L- LPS; C- controle/sem manipulação. Exposição da prole adulta: S- sem manipulação; P = PBS; L = LPS. Obs.: Os asteriscos sobre as barras indicam o nível de significância estatística na comparação de proles que receberam tratamento pré-natal diferente e tratamento semelhante na vida adulta (* = $p < 0,05$).

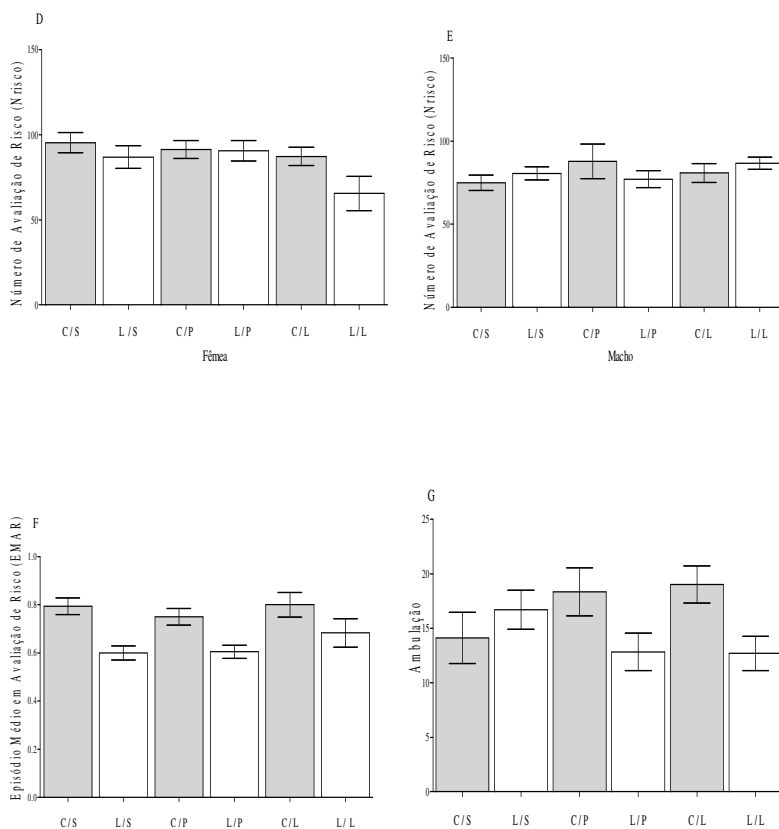


Figura 7: Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado (LEC) de proles geradas por fêmeas expostas ao LPS durante o período gestacional, dados expressos em média e erro padrão da média: D – Número de avaliações de risco (Nrisko) em machos; E- Nrisko em fêmeas; F- Episódio médio de avaliações de risco (EMAR = Trisco / Nrisko) sem distinção de sexo. G-Ambulação, sem distinção de sexo. Siglas: Exposição da fêmea gestante: L- LPS; C-controle/sem manipulação. Exposição da prole adulta: S- sem manipulação; P = PBS; L = LPS. Obs.: Os asteriscos sobre as barras indicam o nível de significância estatística na comparação de proles que receberam tratamento pré-natal diferente e tratamento semelhante na vida adulta (* = $p < 0,05$).

4.3 Midazolam e exposição ao LPS no período gestacional

Segundo os dados apresentados na **Figura 8A**, a %TBA observada nas proles geradas por fêmeas expostas ao LPS foi significativamente menor do que a verificada nas proles geradas por fêmeas não manipuladas ($F(1, 109)=36,410, p<0,01$).

Uma interação significativa foi observada entre o fator exposição de proles ao estressor imunogênico no período gestacional e o fator tratamento da prole adulta com ansiolítico ($F(1,77) = 5,6543, p <0,05$). Verificou-se um aumento significativo na %TBA nas proles geradas por fêmeas expostas ao LPS e tratadas com midazolam na idade adulta, sobretudo quando esse dado foi comparado aos obtidos com as proles geradas por fêmeas expostas ao LPS, mas que receberam PBS na idade adulta ($p < 0,05$).

Adicionalmente, observou-se uma redução da %TBA nas proles geradas por fêmeas expostas ao LPS e tratadas com midazolam na idade adulta. Essa redução foi significativa quando esse dado foi comparado ao obtido nas proles geradas por fêmeas não expostas ao LPS e tratadas com midazolam na idade adulta ($p < 0,01$).

As análises da %TBA mostraram que as proles geradas por fêmeas expostas ao LPS e injetadas com PBS na idade adulta, exibiram uma redução da %TBA, quando comparadas às proles geradas por fêmeas não expostas ao LPS e injetadas com PBS na vida adulta ($p < 0,05$).

Observou-se nos dados da %TAR, uma interação entre o fator exposição ao estressor imunogênico no período gestacional e o fator tratamento da prole com ansiolítico na idade adulta ($F(1, 73) = 7,3073, p < 0,01$), (**Figura 8B**). Independentemente da exposição da progenitora ao LPS no período gestacional, as proles tratadas com midazolam na idade adulta exibiram uma redução na %TAR, quando comparadas às proles tratadas com PBS na idade adulta ($p < 0,05$).

O número de avaliações de risco (Nrisco) foi menor nas proles tratadas com midazolam na idade adulta, independentemente do protocolo experimental ao qual as fêmeas prenhas foram submetidas, ou seja, exposição ou não ao LPS ($F(1, 73) = 16,421, p < 0,01$), (**Figura 9C**).

O tratamento das proles com midazolam foi capaz de gerar um efeito sobre o EMAR ($F(1, 73) = 44,764, p < 0,01$). As proles, independentemente de terem sido geradas por fêmeas expostas ao LPS ou não, quando tratadas com midazolam na idade adulta, apresentaram

um diminuição significativa no EMAR. Essa evidência foi constatada quando se comparou esses dados com aqueles obtidos de proles injetadas com PBS na vida adulta ($p < 0,01$), (Figura 7D). Nenhuma interação foi observada entre o fator exposição ao estressor imunogênico com o fator tratamento da prole com ansiolítico.

O tratamento das proles com midazolam exerceu um efeito significativo na ambulação ($F(2, 107) = 32,971$, $p = 0,01$), independente do sexo ou a exposição ao estressor imunogênico no período gestacional (Figura 9E).

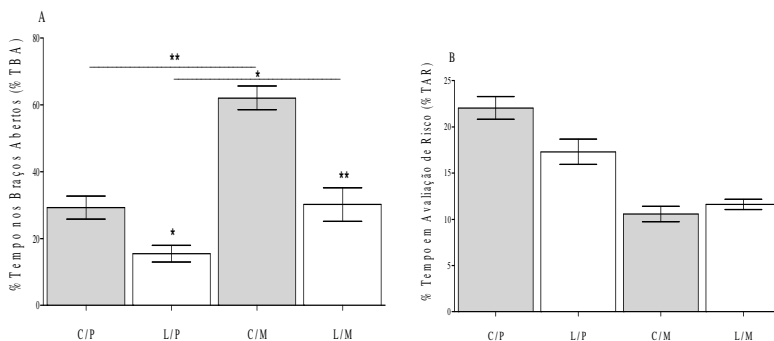


Figura 8: Comportamento no LEC de proles geradas por fêmeas expostas ao LPS durante o período gestacional e tratadas com midazolam na idade adulta, dados expressos pela média e erro padrão da média. Os dados não possuem distinção de sexo. A- % TBA; B - % TAR; C – Nrisco; D- EMAR em machos. E-Ambulação, sem distinção entre sexos. Siglas: Exposição da fêmea gestante: L- LPS; C-controle/sem manipulação. Exposição na idade adulta: M = Midazolam; P = PBS. Obs.: O asterisco sobre as colunas indica o nível de significância estatística na comparação de proles com tratamento no período pré-natal diferente e tratamento no período pós-natal semelhante. Os asteriscos sobre as barras indicam comparação nas proles tratadas pós-natal (* = $p < 0,05$ e ** = $p < 0,01$).

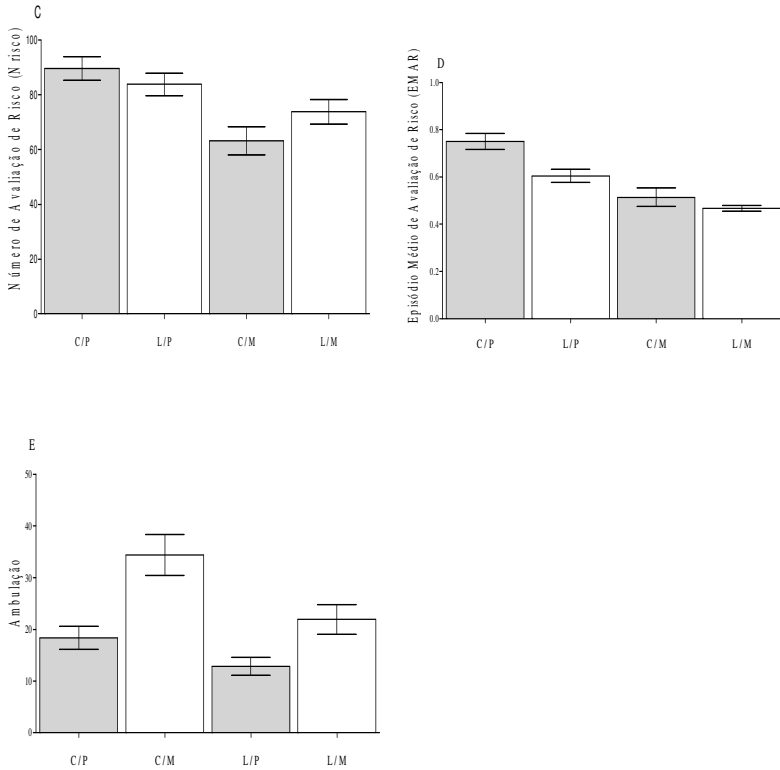


Figura 9: Comportamento no LEC de proles geradas por fêmeas expostas ao LPS durante o período gestacional e tratadas com midazolam na idade adulta, dados expressos pela média e erro padrão da média. Os dados não possuem distinção de sexo. A- % TBA; B - % TAR; C – Nrisco; D- EMAR em machos. E-Ambulação, sem distinção entre sexos. Siglas: Exposição da fêmea gestante: L- LPS; C-controle/sem manipulação. Exposição na idade adulta: M = Midazolam; P = PBS. Obs.: O asterisco sobre as colunas indica o nível de significância estatística na comparação de proles com tratamento no período pré-natal diferente e tratamento no período pós-natal semelhante. Os asteriscos sobre as barras indicam comparação nas proles tratadas pós-natal (* = $p < 0,05$ e ** = $p < 0,01$).

4.4 A atividade da GR e exposição ao LPS no período gestacional

A ANOVA de 4 vias mostrou alterações significativas na atividade da GR no hipocampo (**Figura 10A e B**), mas não no córtex frontal (**Figura 8C e D**), ($F(1,128)= 68,395$, $P= 0,001$), frente à exposição ao LPS no período de desenvolvimento fetal. Apesar disso, a atividade da GR foi maior no córtex do que no hipocampo ($F(1,128) = 68,395$, $p < 0,01$).

Uma interação significativa entre os fatores: 1. exposição ao estímulo imunogênico no período gestacional, 2. sexo e 3. exposição ao LPS na idade adulta foi observada sobre a atividade da GR no hipocampo ($F(1, 64) = 16,284$, $p < 0,01$).

As proles machos apresentaram uma atividade da GR significativamente maior em relação às proles fêmeas ($F(1, 64) = 17,559$, $p < 0,01$). As proles machos expostas ao LPS na idade adulta, geradas por fêmeas também expostas ao LPS, apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,01$) da atividade da GR quando comparadas as proles que receberam PBS na idade adulta e que foram geradas por fêmeas expostas ao LPS. Esse mesmo efeito foi observado quando se comparou a atividade da GR nas proles geradas por fêmeas não expostas ao LPS, independentemente da exposição ao LPS na idade adulta ($p < 0,01$).

As proles fêmeas expostas ao LPS na idade adulta e no período gestacional tiveram um aumento nos níveis de atividade da GR no hipocampo em relação às fêmeas expostas ao PBS na idade adulta, geradas por fêmeas expostas ao LPS ($p < 0,01$). Esse aumento na atividade da GR não ocorreu nas proles fêmeas de mães não expostas ao LPS no período gestacional.

A exposição ao LPS no período gestacional e na idade adulta das proles não foi capaz de induzir alteração na atividade da GR no córtex (**Figura 10C e D**). A análise do fator gênero não revelou dados estatisticamente significantes sobre a atividade da GR no córtex, porém, essa atividade foi maior (machos e fêmeas), quando comparada com atividade no hipocampo ($F(1,128)=68,395$, $p < 0,01$)

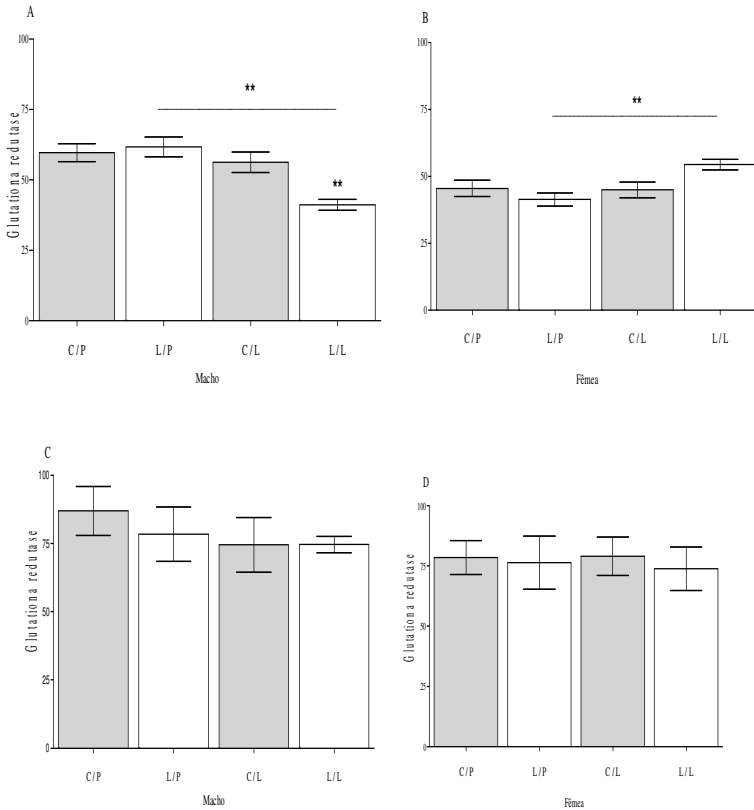


Figura 10: A atividade de glutathiona redutase de proles geradas por fêmeas expostas e não exposta ao LPS durante o período gestacional, no hipocampo de proles machos (A) e no hipocampo de proles fêmeas (B); no córtex frontal dos machos (C) e no córtex frontal de proles fêmeas (D). Siglas: Exposição da fêmea gestante: L- LPS; C-controle/sem manipulação. Exposição da prole adulta: S- sem manipulação; P = PBS; L = LPS. Obs.: Os asteriscos sobre as barras indicam o nível de significância estatística na comparação de proles que receberam tratamento pré-natal diferente e tratamento semelhante na vida adulta (** = $p < 0,01$).

4.5 Adoção e exposição ao LPS no período gestacional

A análise do efeito do protocolo de adoção no comportamento tipo ansiedade foi realizada, comparando-se proles C, geradas e criadas pelas próprias progenitoras não manipuladas (fêmeas não expostas ao LPS), com proles geradas por progenitoras não manipuladas, mas que foram adotadas por outras fêmeas não manipuladas CC. Uma diminuição significativa da %TBA foi observada nas proles CC, ou seja, que passaram pelo processo de adoção ($F(1, 75) = 13,930$, $p < 0,01$), (**Figura 11A**). O fator sexo, assim como a exposição ou não ao LPS na idade adulta não afetaram a %TBA no modelo de adoção utilizado.

O modelo de adoção foi capaz de induzir uma diminuição da %TAR ($F(1, 75) = 9,0467$, $p < 0,01$). Observou-se uma interação do modelo de adoção com o fator sexo ($F(1, 75) = 9,6183$, $p < 0,01$), sendo esse efeito constatado apenas em proles fêmeas (**Figura 11B**), como confirmado na análise de pos-hoc ($p < 0,01$).

A adoção induziu um aumento do Nrisco ($F(1, 75) = 18,067$, $p < 0,01$). Em contraposição, a exposição das proles ao LPS na idade adulta foi responsável por uma redução do Nrisco em um nível marginalmente significativo em comparação com as proles expostas ao PBS ($F(1, 75) = 3,7510$, $p = 0,056$) na idade adulta (**Figura 11C**). Nenhuma interação do fator sexo e a exposição ou não ao LPS da prole na idade adulta foi observada.

O modelo de adoção induziu uma redução do EMAR ($F(1, 75) = 42,034$, $p < 0,01$), independentemente da exposição ou não ao LPS na idade adulta (**Figura 11D**).

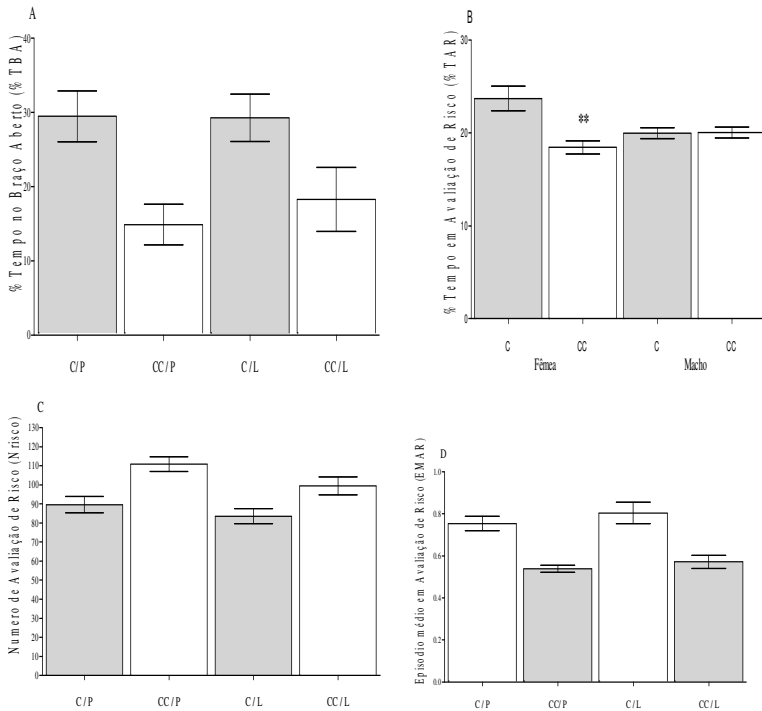


Figura 11: O comportamento no LEC de proles adotadas, dados expressos em média e erro padrão, sem distinção de sexo: A- %TBA; B - %TAR sem distinção de sexo, e sem distinção entre as exposições agudas; C -Nrisco; D - EMAR sem distinção de sexo. Siglas: C = proles geradas por fêmeas não manipuladas e criadas por suas progenitoras (sem adoção). CC = prole geradas por fêmeas não manipuladas e criadas por fêmea não manipulada (com adoção). Exposição na idade adulta: L = LPS; P = PBS. Obs.: Os asteriscos sobre as barras indicam o nível de significância na comparação entre grupos (** = $p < 0,01$).

4.6 Adoção e exposição ao Midazolam na idade adulta

O efeito do midazolam nos animais submetidos à adoção foi analisado pela comparação com seus controles, ou seja, as proles tratadas com PBS na idade adulta. O tratamento das proles com ansiolítico induziu um aumento significativo na %TBA ($F(1, 77) =$

85,433, $p < 0,01$), independentemente de terem sido adotadas. Esse resultado foi obtido através da comparação de proles expostas ao PBS na idade adulta (**Figura 12A**).

Uma redução significativa na %TAR ($F(1, 77) = 21,264$, $p < 0,01$) foi verificada em proles tratadas com ansiolítico na idade adulta, independentemente de terem sido adotadas. Todavia, a análise de post-hoc mostrou que a redução na %TAR foi mais evidente nas proles não adotadas, quando comparadas às proles adotadas ($p < 0,05$), (**Figura 12B**).

Uma interação entre a adoção e o tratamento com ansiolítico foi observado nas análises do Nrisco (**Figura 12C**), ($F(1, 77) = 9,4631$, $p < 0,01$), com um aumento do Nrisco nas proles adotadas ($p < 0,01$).

O tratamento da prole com midazolam na idade adulta não reduziu o Nrisco nas proles adotadas, diferentemente do observado nas proles não adotadas ($p < 0,05$).

As proles não adotadas tratadas com midazolam na idade adulta tiveram uma redução significativa ($p < 0,05$) do Nrisco quando comparadas com proles não adotadas, expostas ao PBS na idade adulta. O mesmo efeito foi observado quando se comparou esses dados com os de proles adotadas e tratadas com midazolam na idade adulta.

Uma interação significativa foi observada entre o modelo de adoção e o tratamento com ansiolítico na análise do EMAR ($F(1, 77) = 6,5002$, $p < 0,05$) (**Figura 12D**), com uma redução significativa ($p < 0,05$) do EMAR em proles tratadas com midazolam independentemente de terem sido adotadas. Esses dados foram observados quando comparados aos obtidos com proles expostas ao PBS. As proles adotadas expostas ao PBS na idade adulta tiveram uma redução significativa ($p < 0,05$) do EMAR, quando se comparou as proles não adotadas, expostas ao PBS na idade adulta.

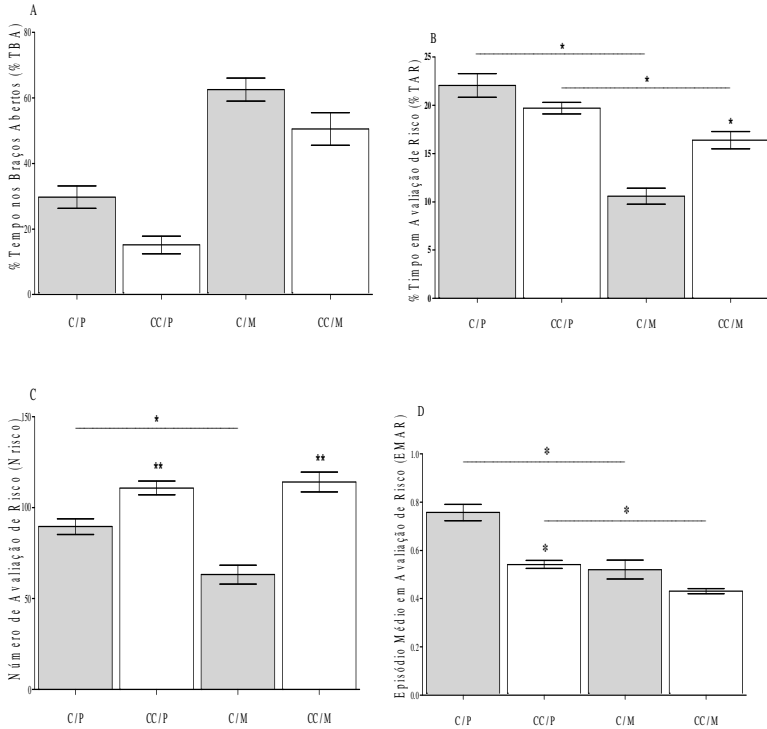


Figura 12: Comportamento no LEC de proles adotadas e tratadas com midazolam, dados expressos em média e erro padrão, dados sem distinção de sexo: A - % TBA; B - % TAR; C - Nrisco; D - EMAR. Siglas: C = proles geradas por fêmeas não manipuladas e criadas por suas progenitoras (sem adoção). CC = prole geradas por fêmeas não manipuladas e criadas por fêmea não manipulada (com adoção). Exposição na idade adulta: M = Midazolam; P = PBS. Obs.: Os asteriscos sobre as barras indicam o nível de significância na comparação entre grupos (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$).

4.7 Adoção cruzada (Cross Fostering)

Para analisar as conseqüências do protocolo de adoção cruzada sobre a %TBA, %TAR, Nrisco e EMAR, os dados dos seguintes grupos foram analisados: 1. proles CC geradas por fêmeas não manipuladas e adotadas por fêmeas não manipuladas, 2. proles CL geradas por fêmeas não manipuladas e adotadas por fêmeas expostas ao LPS durante a

gestação, 3. proles LC geradas por fêmeas expostas ao LPS durante a gestação e adotadas por fêmeas não manipuladas.

A %TBA das proles submetidas à adoção cruzada não diferenciou daquela observada nas proles adotadas (**Figura 13A**). O tratamento com PBS ou LPS na vida adulta alcançou um efeito marginalmente significativo ($F(1,132) = 3,7398$, $p = 0,056$). Essa significância estatística marginal foi proporcionada principalmente pela elevação da %TBA nas proles expostas aos efeitos do LPS durante a gestação e injetadas com LPS antes do teste no LCE na vida adulta.

A %TAR foi influenciada pelos protocolos de adoção ($F(2,132) = 7,277$, $p = 0,001$), (**Figura 13B**), com as proles adotadas exibindo uma %TAR maior do que as proles submetidas à adoção cruzada CL ($p < 0,005$) e LC ($p < 0,01$). O fator adoção cruzada interagiu com o fator tratamento na vida adulta e com fator sexo ($F(2,132) = 5,277$, $p < 0,001$). Entre as proles de animais machos tratadas com PBS na vida adulta, as que foram geradas por mães tratadas com LPS durante a gestação e criadas por mães não tratadas, apresentaram uma %TAR menor do que aquelas proles geradas por mães não tratadas com LPS durante a gestação, independentemente de terem sido criadas por mães tratadas ou não com LPS durante a gestação ($p < 0,01$ para as duas comparações).

O Nrisco, da mesma forma que o %TAR, sofreu redução com o protocolo de adoção cruzada, quando comparado com o protocolo de adoção CC ($F(2,132) = 4,4206$, $p < 0,05$), sendo essa redução significativa na comparação da prole CC com a prole LC ($p < 0,01$). O protocolo de adoção interagiu com o tratamento antes do teste no LCE ($F(2,132) = 5,8358$, $p < 0,001$), (**Figura 13C**).

O EMAR não sofreu influência da adoção cruzada quando comparado à adoção, assim como pelo sexo ou tratamento na vida adulta (**Figura 13D**).

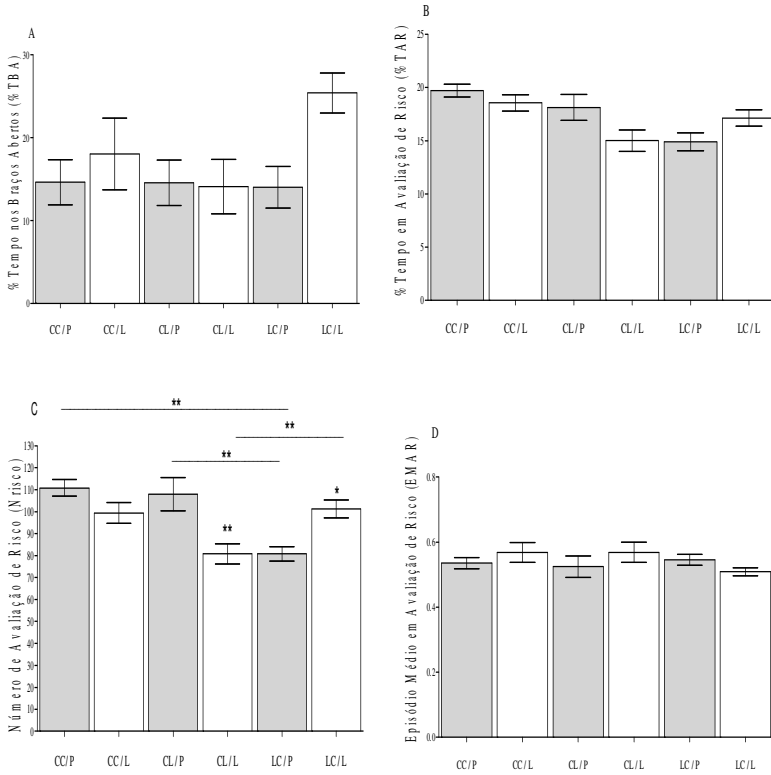


Figura 13: O comportamento no LEC de proles submetidas à adoção cruzada. Dados expressos em média e erro padrão, sem distinção de sexo. A - %TBA; B - %TAR; C - Nrisco; D - EMAR. Siglas: CC-proles de progenitoras não manipuladas, adotadas por fêmeas não manipuladas; CL-proles geradas por fêmeas não manipuladas, adotadas por fêmeas expostas ao LPS durante a gestação; LC-proles geradas por fêmeas expostas ao LPS durante a gestação e adotadas por fêmeas não manipuladas. Exposição na idade adulta: L = LPS; P = PBS. Obs.: Os asteriscos sobre as barras indicam o nível de significância na comparação entre grupos (*= $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$).

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar na prole de camundongos submetidos a um estímulo imunológico durante a gestação, indicadores de efeitos a longo prazo que comprometam a homeostasia e o comportamento. Nossos resultados mostraram que proles adultas geradas por fêmeas expostas a uma dose baixa de LPS (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{i.p.}$) no oitavo dia de gestação apresentam um aumento da massa corporal durante o período de desenvolvimento pós-desmame, um aumento no comportamento do tipo ansiedade, pela redução da %TBA, e alterações na atividade da GR no hipocampo frente a novas exposições ao LPS.

O aumento no ganho de massa corporal que observamos está de acordo com outros estudos em que proles de roedores expostos ao LPS no período gestacional se tornaram obesas, com características de síndrome metabólica e consequente resistência à insulina (Nilsson et al., 2001), e aumento plasmático de leptina (Nilsson et al., 2001; Wei et al., 2007). Proles expostas a estressores variáveis não imunogênicos durante a terceira semana gestacional também apresentam o peso corporal mais elevado do que as proles geradas por fêmeas não-estressadas (Thamashiro et al., 2009).

A exposição ao estresse induz alterações expressivas nos níveis de glicocorticóides e de leptina, interferem nos circuitos hipotalâmicos de controle da ingestão alimentar, porém em sentidos opostos (Jean-Renaud e Rohner-JeanRenaud 2000). Enquanto a leptina exerce um efeito anoréxico (Van dijk et al., 1999), os glicocorticóides quando administrados no cérebro reduzem a sua ação e, observa-se consequentemente aumento da obesidade nos animais (Jean-Renaud e Rohner-JeanRenaud 2000). A comprovação desse efeito é observada em animais adrenalectomizados, nos quais a leptina apresenta um efeito anoréxico mais proeminente, e na reversão desse efeito com o tratamento com dexametazona (Drazen et al., 2003). Em ratas gestantes expostas a estressores variados no final do período gestacional provoca na prole adulta diminuição da retroalimentação negativa sobre o eixo HPA (Koenig et al., 2005). Adicionalmente, os glicocorticóides possuem relação com a obesidade (ver revisão em Bjorntorp e Rosmond, 2000), assim como resistência à insulina e aumento da leptina sérica, um indicador de resistência de seus receptores (Sugden et al., 2001).

O aumento do ganho de massa corporal observado neste estudo foi observado apenas após o desmame, e pode ser uma consequência do estresse induzido pelo isolamento social e privação materna. O período de desmame, na terceira semana pós-natal, coincide com o período em que se completa o amadurecimento das conexões do núcleo arqueado, importante na regulação da ingestão alimentar (Grove et al., 2005).

A ação dos hormônios sexuais é um importante fator a ser considerado no controle da ingestão de alimentos, visto que ratas ovariectomizadas apresentam-se com o peso corporal elevado. Em machos castrados observa-se efeito oposto, ou seja, redução do peso corporal quando castrados (Wallen et al., 2001). Ratos machos gerados por fêmeas expostas ao estresse de “instabilidade social” no período gestacional apresentam redução dos níveis de testosterona antes e após o desafio reprodutivo (Kemme et al., 2006). Quando administrada em machos adultos castrados, o tratamento com testosterona propionato em dose baixa (0,2 mg/kg) aumenta a ingestão de alimento e o ganho de peso corporal (Nunez e Grundman, 1982; Siegel et al., 1981). Todavia, quando tratados com alta dose (2,0 mg/kg), não apresenta aumento do ganho corporal efetivo e, apresenta-se principalmente com redução da massa adiposa e aumento da massa protéica (Siegel et al., 1981).

A sensibilidade à leptina no sistema nervoso central de ratos machos ou fêmeas pode ser elevada com a administração de 17 β -estradiol (Clegg et al., 2006). Enquanto a administração de leptina em doses baixas tem um efeito estimulador sobre a secreção de gonadotropina, um efeito inibitório ocorre com a leptina em concentrações elevadas (ver revisão em Moschos et al., 2002). A leptina (2 a 500 ng / mL) em cultura de células de Leydig, inibe a produção de testosterona estimulada por Gonadotropina Coriônica Humana (hCG) (Caprio et al., 1999).

As alterações fisiológicas decorrentes da exposição a estressores no período de desenvolvimento fetal justificam o aumento da massa corporal da prole. A falta de significância estatística no ganho de massa dos machos está relacionada ao desenvolvimento até o 45º dia. Considerando a diferença crescente entre a massa das proles de mães expostas ao LPS ou ao PBS, é possível que em animais mais velhos a diferença de massa corporal adquira significância estatística também nas proles machos.

A glutatona é uma enzima importante no processo de proteção antioxidante, e é recuperada para sua forma reduzida, através do papel antioxidante proporcionado pela enzima glutatona redutase (Sies et al., 1991).

A exposição de ratas gestantes ao LPS induz nos fetos e neonatos um aumento dos marcadores indicativos de estresse oxidativo, além de provocar redução da atividade antioxidante, como a diminuição dos níveis de glutathiona encefálicos (Paintlia et al., 2008; Lanté et al., 2007; Lanté et al., 2008). O aumento do estresse oxidativo e diminuição dos mecanismos de defesa antioxidantes são apontados no hipocampo de ratos injetados com LPS (Lanté et al., 2007) e camundongos injetados com hemácias de carneiro (Gonçalves et al., 2008).

Em nossos experimentos observamos que a atividade da GR no córtex frontal da prole adulta não se altera significativamente com a exposição das fêmeas genitoras ao LPS, e nem mesmo com a exposição da prole adulta ao LPS. A atividade da GR no hipocampo também se mostrou semelhante entre as proles provenientes de genitoras expostas ou não ao LPS no período pré-natal; todavia, na prole de mães expostas ao LPS, o tratamento com LPS na vida adulta induziu alterações, com uma redução da atividade da GR nos machos e um aumento da atividade da GR nas fêmeas.

Embora nossos resultados não apontem para uma redução na atividade da GR em situação basal (sem exposição ao LPS na idade adulta), a literatura mostra diminuição na proporção de glutathiona reduzida/glutathiona oxidada (GSH / GSSG) no hipocampo de ratos machos gerados por fêmeas expostas ao LPS (500 µg/kg) no 19º dia gestacional (Lanté et al., 2007). Esta redução na relação da GSH / GSSG poderia estar associada a um comprometimento da atividade da GR induzida pela exposição ao LPS no período gestacional, e a ausência de alterações na atividade dessa enzima GR em nosso experimento pode se dever ao fato de termos utilizado uma concentração muito baixa de LPS (10 µg/kg).

Nas proles de genitoras expostas ao LPS no período gestacional a exposição ao LPS na vida adulta induziu aumento da atividade da GR nas proles fêmeas e uma redução da atividade da GR nas proles machos. Considerando os efeitos do estresse pré-natal nos níveis de hormônios esteroides gonadais e seus importantes efeitos antioxidantes, sugerimos que estes tenham relação com os dados obtidos em nossos experimentos. A testosterona apresenta um efeito neuroprotetor e possui importante papel antioxidante contra dano celular e lesão tecidual induzida pelo estresse oxidativo (Túnez et al., 2007) e o esgotamento dos andrógenos endógenos em ratos castrados aumenta a gravidade da lesão no hipocampo, possuindo importante função na viabilidade celular (Ramsden et al., 2003). E as proles de machos expostas ao estressor de instabilidade social e contenção física no período gestacional

apresentam níveis inferiores de testosterona antes e após o desafio reprodutivo na idade adulta (Kemme et al., 2006). Sabe-se que o eixo HPA possui papel inibitório sobre o eixo hipotálamo hipófise gonadal (ver revisão Chand e Lovejoy, 2011), e a exposição de neonatos de ratos Wistar machos ao LPS induz à redução da testosterona e a redução de LH nas fêmeas, na fase adulta (Walker et al., 2011). A redução de testosterona relatada na literatura dá sustentação para a redução da atividade da GR observada na prole de machos em nossos experimentos. Em proles fêmeas, o estresse induzido por exposição das mães em altas temperaturas durante a gestação resulta em um aumento na concentração sérica de testosterona na fase adulta e adia o aparecimento do primeiro ciclo estral (Vom Saal et al., 1990). Caso a injeção de LPS na prole fêmea adulta atue como um estressor, provocando o mesmo efeito elevador da testosterona observado nas fêmeas pela exposição ao calor, a elevação dos níveis de atividade da GR pode ser justificada pela elevação deste esteroide. Todavia, a comprovação do envolvimento deste mecanismo demanda estudos complementares.

O protocolo de exposição de camundongos ao LPS no período gestacional resultou em redução da %TBA, indicativo de um aumento do comportamento do tipo ansiedade (ver revisão em File, 1992; ver revisão em Lister, 1987), na prole adulta.

A exposição dos fetos a citocinas pró-inflamatórias está associada com o aumento da ansiedade e da depressão na idade adulta (Enayati et al., 2011). O TNF- α e a IL-1 β atuam na regulação da sobrevivência embrionária de neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos (Jarskog et al., 1997). A associação dos neurônios dopaminérgicos (ver revisão em Pezze e Feldon, 2004), e serotoninérgicos no sistema mesolímbico tem grande participação no controle de comportamentos emocionais relacionados ao estresse, como medo e ansiedade (ver revisão em Lowry et al., 2008). Proles de ratas expostas ao LPS no 10º dia do período gestacional, período próximo a gênese dos primeiros neurônios DA no 12º dia (Specht et al., 1981) e 5-HT no 11º-12º dia do período gestacional (Lauder, 1990), apresentam uma redução de receptores 5-HT1A no hipocampo, associada com um aumento do comportamento do tipo ansiedade e redução dos neurônios 5-HT no córtex pré-frontal-medial e no hipocampo. Adicionalmente, observa-se redução de DA no núcleo accumbens (Lin et al., 2011). O uso de protocolo semelhante induziu nas proles adultas de ratos uma perda significativa de neurônios dopaminérgicos na substância negra e de neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe (Wang et al., 2009). A prole adulta de ratos Wistar do sexo masculino, gerada por fêmeas expostas ao LPS (100 μ g/kg/ i.p.)

no 9º dia da gestação, apresentam um efeito mais expressivo no comportamento social, que é reduzido, com alterações pouco evidentes no comportamento do tipo ansiedade (Kirsten et al., 2010), enquanto a prole de progenitoras expostas ao LPS no 17º dia apresentam um aumento expressivo de comportamento do tipo ansiedade (Hava et al., 2006).

O papel da deficiência de dopamina (DA) no comportamento tipo ansiedade é pouco evidente, embora, ratos expostos ao LPS intra-uterino apresentam redução da DA no encéfalo (Zhu et al., 2007; Ling et al., 2009), sem sinais de prejuízo motor até o 16º mês de idade (Ling et al., 2009). Todavia, ocorre uma redução na atividade total e na velocidade do movimento em proles fêmeas no campo aberto grande, não sendo observados em campo aberto pequeno ou no LCE (Lin et al., 2011).

A exposição de ratas ao LPS no 10º dia gestacional induz alterações de ansiedade na prole que não são acompanhadas redução nos receptores de glicocorticoides no hipocampo dorsal (Lin et al., 2011). A exposição ao LPS entre o 15º, 16º e 17º dias de gestação aumenta do comportamento do tipo ansiedade e depressivo, acompanhado de uma hiperatividade do eixo HPA e, portanto, aumento na produção de corticosterona, que se exacerba com a idade nos descendentes machos (Enayati et al., 2011). A explicação para este resultado pode estar associado ao período de neurogênese do hipocampo e do núcleo accumbens em roedores. Considerando que, o núcleo accumbens desempenha importante papel na modulação da ansiedade e da depressão (Bewernick et al., 2010), assim como o hipocampo (Solati et al., 2010).

A leptina tem um papel regulador do eixo HPA, a nível central e periférico (Malendowicz et al., 2007) ela inibe a produção de CRH hipotalâmico, e conseqüentemente, a atividade do eixo HPA (Heiman et al., 1997; Oates et al 2000). Ocorre uma desinibição do eixo HPA com um aumento nas concentrações de corticosterona e de leptina, por indução de uma resistência à leptina no córtex da adrenal, que por sua vez está relacionado com o aumento da ansiedade (Fraga-Marques et al., 2009).

A prole de mães tratadas com LPS teve uma redução da ambulação com as injeções i.p. antes dos testes no LCE, enquanto na prole de mães tratadas com PBS as manipulações precedendo os testes no LCE induziram um aumento na ambulação. Estes efeitos opostos, embora não expressivos, contribuíram para a significância estatística no efeito geral do tratamento materno na ambulação.

A injeção de midazolam, um benzodiazepínico agonista de receptor GABA-A (ver revisão em Allison e Pratt, 2008), induz um o efeito ansiolítico em ratos e camundongos avaliados no LCE, aumentando a %TBA (Mendes-Gomes e Nunes-de-Souza, 2005). O potencial de reversão do comportamento do tipo ansiedade nas proles tratadas com midazolam, observado na prole de mães não expostas ao LPS e da prole de mães expostas ao LPS na gestação se assemelharam, dobrando a %TBA. Todavia, como as proles geradas por fêmeas expostas ao LPS durante o período gestacional apresentaram uma %TBA inferior àquela das proles geradas por fêmeas não-manipuladas, a %TBA final também ficou em um nível inferior após o tratamento com midazolam. Na ambulacão o efeito do midazolam foi semelhante ao efeito na %TBA, elevando o número de entradas nos braços do LCE para quase o dobro do observado sem o tratamento com midazolam.

O tratamento de ratos com 0.25 mg/Kg de LPS durante a gestação induz uma redução na expressão de genes reguladores do desenvolvimento cerebral, especialmente aqueles que regulam a migração neuronal de interneurônios GABAérgicos corticais, associado com uma redução no contato social e no comportamento exploratório da prole na vida adulta (Oskvig, 2012). A expressão da subunidade alfa 2 do receptor GABA A no hipocampo e na amígdala dos descendentes na vida adulta também se relaciona de forma invertida com a expressão de medo e ansiedade (Lehner et al., 2010).

Os nossos resultados mostram um efeito do tratamento das mães gestantes com LPS no comportamento do tipo ansiedade e na locomoção, e a reversão destes efeitos de forma proporcional aos descendentes de mães não expostas ao LPS, a partir dos níveis basais de cada grupo com o tratamento com midazolam, o que sugere a ocorrência e envolvimento de uma redução na expressão de receptores GABAérgicos, conforme apontado pela literatura anteriormente mencionada.

O objetivo da adoção cruzada foi verificar se as alterações observadas pela exposição ao LPS foram decorrentes de sua ação sobre a prole em desenvolvimento, ou foi decorrente de uma alteração na relação da mãe com o filhote (Hruba et al., 2009; Slamberova et al., 2005), induzida pelo efeito do LPS nas mães. Todavia, precedendo a avaliação dos efeitos da adoção cruzada, foi necessário verificar o efeito da adoção, ou seja, avaliar possíveis alterações nos níveis do comportamento do tipo ansiedade pela adoção das proles geradas por fêmea não-exposta ao LPS, por uma fêmea também não-exposta ao LPS.

O nosso protocolo de adoção (fostering) consistiu em remover os filhotes de suas progenitoras não manipuladas no primeiro dia após o nascimento e colocá-los para serem criados por outra fêmea, adotiva, também não manipulada durante a gestação. Este protocolo foi escolhido por haver indicação de ausência de efeitos prejudiciais aos filhotes de roedores submetidos à adoção no primeiro dia de vida (Darnaudéry et al., 2004; Barbazanges et al., 1996; Maccari et al., 1995), que exibem redução da secreção de corticosterona quando expostos ao estresse, redução da locomoção em um novo ambiente, redução da vocalização ultrassônica e melhora na capacidade de reconhecimento espacial. Por outro lado, adoções entre o 5º e o 12º dia pós-natal aumentam a secreção de corticosterona induzida pelo estresse, aumenta a resposta locomotora à novidade e reduz o reconhecimento espacial na idade adulta (Barbazanges et al., 1996). Camundongos que passam pela adoção no 7º dia após o nascimento apresentam redução serotoninérgica no córtex e no hipocampo (Lu et al., 2009).

Em nosso experimento, a adoção no primeiro dia induziu um aumento do comportamento do tipo ansiedade na prole adulta. Assim, apesar de todos os cuidados empregados na execução do protocolo de adoção, o protocolo parece ter gerado estresse nos filhotes ou nas mães adotivas, resultando em alterações comportamentais na prole adulta. A literatura mostra que indivíduos que recebem menos cuidado materno tendem a ter redução na expressão de receptor de glicocorticóide no hipocampo e maior resposta do eixo HPA, comparados com proles que tiveram maior cuidado materno (Weaver et al., 2004). Estas alterações, por sua vez, são relacionadas com aumento do comportamento do tipo ansiedade. O tratamento dos animais submetidos à adoção com midazolam resultou em um efeito ansiolítico mais expressivo do que nos animais provenientes e criados por mães expostas ao LPS, que pode ser observado não apenas no aumento da %TBA em relação aos mesmos grupos injetados com PBS (1,9 vezes para a prole de mães expostas ao LPS e 3,34 vezes nas proles adotadas), como também nos valores médios das %TBA (cerca de 35% na prole de mães expostas ao LPS e cerca de 57% na prole adotada), levando em conta que os descendentes de mães não expostas ao LPS e não adotados alcançaram a média de 70% de TBA e o tratamento com midazolam dobra a %TBA quando comparado com o tratamento com PBS. Desta forma, apesar dos animais adotados exibirem níveis de comportamento do tipo ansiedade semelhantes aos dos descendentes de mães expostas ao LPS na gestação, suas sensibilidades ao tratamento com benzodiazepínicos são diferentes.

A da adoção cruzada não gera níveis de comportamento do tipo ansiedade diferentes daqueles induzidos pela adoção, exceto pelos animais provenientes de mães biológicas expostas ao LPS durante a gestação, criados por mães adotivas não expostas ao LPS e tratados com LPS antes do teste no LCE, que nos remete a um possível processo de tolerância ao LPS, conforme relatos da literatura (Nomura et al., 2000; Medvedev et al., 2000). Sugestão de uma tolerância ao LPS também é dado pelas alterações na atividade da GR nos animais provenientes de mães expostas ao LPS e tratados com LPS antes do teste no LCE; todavia, no comportamento do tipo ansiedade da prole não submetida à adoção não há sugestão de tolerância ao LPS. Ainda, neste experimento a prole não foi reexposta ao LPS, mas aos efeitos do LPS, visto que quando aplicado no período de gestação, não há indicação de passagem do LPS do corpo materno para o do feto. Assim, fica mais apropriado considerarmos uma tolerância aos efeitos das citocinas e dos glicocorticoides, em uma situação de estresse induzida no período de desenvolvimento fetal.

Nossos dados reforçam as indicações de que a programação intra-uterina é relevante no equilíbrio fisiológico e comportamental do indivíduo, e que durante a gravidez, a exposição a um processo inflamatório, mesmo que subclínico pode levar a prejuízos na resistência ao estresse.

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram que a exposição ao estressor imunológico LPS no 8º dia de gestação promoveu as seguintes alterações nas proles adultas, 1- aumento na massa corporal, mais expressivo nas fêmeas do que nos machos; 2- redução da atividade da glutatona redutase nas proles machos, expostas ao LPS na idade adulta; 3- aumento do comportamento tipo ansiedade, também confirmado pelo efeito ansiolítico do midazolam; 4- efeito ansiolítico do midazolam reduzido; 5- aumento do comportamento tipo ansiedade provocado pelo protocolo de adoção e conseqüente comprometimento dos dados de adoção cruzada; 6- tolerância aos efeitos ansiogênicos provocados pelo LPS, apenas em animais provenientes do protocolo de adoção cruzada, expostos ao LPS na vida adulta e ao LPS no período gestacional.

7. REFERÊNCIAS

ALLISON, C. E J. A. PRATT. Neuroadaptive processes in GABAergic and glutamatergic systems in benzodiazepine dependence. **Pharmacology & Therapeutics**, 2003; v.98, n.2, p.171-195.

ASHDOWN, H., DUMONT, Y., POOLE, M. S., NG, BOKSA P. AND LUHESHI, G.N. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. **Mol. Psychiatry**, 2006, pp. 47–55.

BÄCKSTRÖM, T., HAAGE, D., LÖFGREN, M., JOHANSSON, I. M., TRÖMBERG, J., NYBERG, S.S., ANDRÉEN,^a L., OSSEWAARDE,^b L., VAN WINGEN, G. A., TURKMEN^a, S. AND BENGTSSON. S. K. Paradoxical effects of gaba-a modulators may explain sex steroid induced negative mood symptoms in some persons. **Neuroscience**, 2011; 46–54.

BARBAZANGES, A. VALLÉE, M. MAYO, W. DAY, J. SIMON, H. LE MOAL, M. ET AL. Early and later adoptions have different long-term effects on male rat offspring. **J Neurosci**, 1996; pp. 7783–7790.

BARKER., D. J. P. In utero programming of chronic disease. MRC Environmental Epidemiology Unit, University of Southampton, Southampton General Hospital, Southampton, SO16 6YD, U.K **Clinical Science**, 1998. 95, 115–128.

BELKACEMI, L., CHEN, C.H., ROSS, M.G., DESAI, M. Increased placental apoptosis in maternal food restricted gestations: role of the Fas pathway. **Placenta** 30, 2009; 739–751.

BERTRAM, C., TROWERN, A. R., COPIN, N., JACKSON, A. A., AND WHORWOOD, C. B. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. **Endocrinology**, 2001; 142:2841–2853.

BEWERNICK, B.H. HURLEMANN, R. MATUSCH, A. KAYSER, GRUBERT, S. C. HADRYSIWICZ, B.AXMACHER, N. LEMKE, M. COOPER-MAHKORN, D. COHEN, M.X. BROCKMANN, H.LENARTZ, D. STURM, V. SCHLAEPFER, T.E. Nucleus accumbens deep brain stimulation decreases ratings of depression and anxiety in treatment-resistant depression. **Biol. Psychiatry** 2010; 110–116.

BIGGIO, G. CONCAS, A. CORDA, M.G. GIORGI, O. SANNA, E. and SERRA, M. GABAergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: effect of stress, anxiolytic and anxiogenic drugs. **Pharmacol Ther**, 1990; pp. 121–142.

BJORNTORP, P. AND ROSMOND, R. Obesity and Cortisol. **Nutrition**, 2000; 16:924–936.

BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2010, v., n.6, p.881-897.

BORRELL, J., VELA, J.M., ARÉVALO-MARTIN, A., MOLINA-HOLGADO E. AND GUAZA, C. Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats. Implications for the etiopathogenesis of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, 2002; pp. 204–215.

BUHIMSCHI, I.A., BUHIMSCHI, C.S., AND WEINER, C.P. Protective effect of N-acetylcysteine against fetal fetal death and preterm labor induced by maternal inflammation. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 2003; pp. 203–208.

CALDJIL, C., D. FRANCIS, SHARMA, S., PLOTSKY, P.M., AND MEANEY, M.J. The Effects of Early Rearing Environment on the Development of GABAA and Central Benzodiazepine Receptor Levels and Novelty-Induced Fearfulness in the Rat. **Neuropsychopharmacology**, 2000; v.22, n.3, p.219-229.

CAPRIO M, ISIDORI AM, CARTA AR, MORETTI C, DUFAU ML, FABBRI A. Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. **Endocrinology**, 1999; 140:4939–47.

CHAND D., LOVEJOY D.A. Stress and reproduction: Controversies and challenges. *General and Comparative Endocrinology*. 2011; 171:253-257.

CHARIL, A., LAPLANTE, D. P., VAILLANCOURT, C., KING, S., Prenatal stress and brain development. *Brain Research Reviews*. 2010; 65, 56-79.

CHARMANDARI, E. et al. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 2005; 67, 259–284.

CHEN, Y.H., XU, D.X., WANG, J.P. WANG, H. WEI, L.Z., SUN M.F. AND WEI, W. Melatonin protects against lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal death and growth retardation in mice, *J. Pineal Res.*, 2006; pp. 40–47.

CHROUSOS, G. P. Organization and Integration of the Endocrine System: The Arousal and Sleep Perspective. *Sleep Medicine Clinics*, 2007; .2, 2,25-145.

CLEGG, D.J., BROWN, L.M., WOODS, S.C., BENOIT, S.C. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes*, 2006; 55, 978–987.

COTTRELL, E.C, SIECKL, J.R., Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Front Behav Neurosci.*, 2009; 3: 19.

CRUZ, A.P., FREI, F., GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994; Sep;49(1):171-6.

DAHLGREN, J., NILSSON, C., JENNISCHE, E., HO, H.P., ERIKSSON, E., NIKLASSON, A., BJORNTORP, P., ALBERTSSON WIKLAND, K., HOLMANG, A. Prenatal cytokine exposure results in obesity and gender-specific programming. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2001; E326–E334.

DAMMANN, O.; KUBAN, K.C.; LEVITON, A. Perinatal infection, fetal inflammatory response, white matter damage, and cognitive limitations in children born preterm. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.*, 2002; v.8, p.46–50.

DARNAUDÉRY, M. KOEHL, M. BARBAZANGES, A. CABIB, S. LE MOAL, M. MACCARI, S. Early and later adoptions differently modify mother–pup interactions. **Behav Neurosci.**, 2004; pp. 590–596.

DE GRAAF-PETERS, V.B., HADDERS-ALGRA, M. Ontogeny of the human central nervous system: what is happening when? **Early Hum.**, 2006; Dev. 82, 257–266.

DIAS-FERREIRA, E., SOUSA, J.C., MELO, I., MORGADO, P., MESQUITA, A.R., CERQUEIRA, J.J., COSTA, R.M., SOUSA, N. Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decision-making. **Science**, 2009; 325, 621–625.

DRAGO F., DI LEO F., GIARDINA L. Prenatal stress induces body weight deficit and behavioural alterations in rats: the effect of diazepam. **European Neuropsychopharmacology**, 1999; 239–245.

DRAZEN, D.L., WORTMAN, M.D., SCHWARTZ, M.W., CLEGG, D.J., VAN, D.G., WOODS, S.C., Seeley, R.J. Adrenalectomy alters the sensitivity of the central nervous system melanocortin system. **Diabetes**, 2003; 52, 2928–2934.

DUMAN, R.S., MONTEGGIA, L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biol. Psychiatry**, 2006; 59, 1116–1127.

DURACKOVA, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiol. Res.** 59: 459–469; 2010.

ENAYATI, M., SOLATI, J., HOSSEINI, M.-H., SHAHI, H.-R., SAKI, G., SALARI, A. Maternal infection during late pregnancy increases anxiety- and depression-like behaviors with increasing age in male offspring. **Brain Research Bulletin**. In Press, Corrected Proof, 2011.

FILE, S.E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliott, J.M., Heal, D.J., Marsden, C.A. (Eds.), *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. **J. Wiley, Chichester**, pp. 1992; 25–44.

FRAGA-MARQUES, M. C., MOURA, E. G., CLAUDIO-NETO, S., TREVENZOLI, I. H., TOSTE, F. P., PASSOS, M. C. F., LISBOA, P. C. C., MANHÃES, A. C. Neonatal hyperleptinaemia programmes anxiety-

like and novelty seeking behaviours but not memory/learning in adult rats. **Hormones and Behavior**, 2009; 272-279.

GONÇALVES, L., DAFRE, A.L., CAROBREZ, S.G., GASPAROTTO, O.C. A temporal analysis of the relationships between social stress, humoral immune response and glutathione-related antioxidant defenses. **Behav. Brain Res.**, 2008. 192, 226–231.

GROVE, K.L., GRAYSON, B.E., GLAVAS, M.M., XIAO, X.Q. AND SMITH, M.S. Development of metabolic systems. **Physiol Behav.**, 2005; pp. 646–660.

HAVA, G., VERED, L., YAEL, M., MORDECHAI, H., MAHOUD, H. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. **Dev. Psychobiol**, 2006; 48, 162–168.

HEIMAN, M.L., AHIMA, R.S., CRAFT, L.S., SCHONER, B., STEPHENS, T.W., FLIER, J.S. Leptin inhibition of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in response to stress. **Endocrinology**, 1997; 138 (9), 3859–3863.

HEISLER, L.K., CHU, H.M., BRENNAN, T.J., Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 1998; 95, 15049–15054.

HEMMERLE A.M., HERMAN J.P., SEROOGY K.B. Stress, depression and Parkinson's disease. **Exp Neurol**. 2012; 233(1):79-86.

HERMAN J.P., FIGUEIREDO H., MUELLER N.K., ULRICH-LAI, Y., OSTRANDER, M.M., CHOI, D.C., CULLINAN, W.E. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 2003; 24:151-180.

HERMAN, J.P. & CULLINAN, W.E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, 1997; 78-84.

HERMAN, J.P. Regulation of adrenocorticosteroid receptor mRNA expression in the central nervous system. **Cell. Mol. Neurobiol.**, 1993; 13, 349–372.

HODYL, N.A., KRIVANEK, K.M., CLIFTON, V.L., HODGSON, D.M. .Innate immune dysfunction in the neonatal rat following prenatal endotoxin exposure. **Journal of Neuroimmunology**, 2008; Issues 1-2, 15 November v.204 p.126-130.

HRUBA L., SCHUTOVA B., SLAMBEROVA R., POMETLOVA M., ROKYTA R. Effect of methamphetamine exposure and cross-fostering on sensorimotor development of male and female rat pups. **Dev Psychobiol.**, 2009; 51(1):73–83.

HUSSAIN, S. P.; HOFSETH, L. J.; HARRIS, C. C. Radical causes of cancer. **Nat. Rev. Cancer**, 2003; 3:276–285.

JABS, T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. **Biochem. Pharmacol.** 57:231–245; 1999.

JARSKOG, L.F., XIAO, H., WILKIE, M.B., LAUDER, J.M., GILMORE, J.H. Cytokine regulation of embryonic rat dopamine and serotonin neuronal survival in vitro. **Int. J. Dev. Neurosci**, 1997; 15, 711–716.

JEAN-RENAUD, B., ROHNER-JEANRENAUD, F. CNS-periphery relationships and body weight homeostasis: influence of the glucocorticoid status. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.** 24 (Suppl 2), 2000; S74–S76.

KAHLE, K.T. STALEY, K.J., NAHED, B.V., GAMBA, G. HEBERT, S.C., LIFTON R.P. AND MOUNT, D.B. Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. **Nat Clin Pract Neurol**, 2008; pp. 494–503.

KEMME, K., SYLVIA K., NORBERT S. Prenatal maternal programming determines testosterone response during social challenge. **Hormones and behavioral.** 2006.

KIRSTEN, T.B. TARICANO, M. MAIORKA, P.C. PALERMO-NETO, J. BERNARDI. M.M. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. **Neuroimmunomodulation**, 2010; pp. 240–251.

KOCHAKIAN C, WEBSTER J. Effect of testosterone on the appetite, body weight and composition of the normal rat. **Endocrinology**, 1958; 63:737.

KOENIG, J.I., ELMER, G.I., SHEPARD, P.D., LEE, P.R., MAYO, C., JOY, B., HERCHER, E. AND BRADY, D.L. Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. **Behav Brain Res.**, 2005; pp. 251–261.

LANTÉ, F., MEUNIER, J., GUIRAMAND, J., MAURICE, T., CAVALIER, M., DE JESUS FERREIRA, M.C., AIMAR, R., COHEN-SOLAL, C., VIGNES M. AND BARBANEL, G. Neurodevelopmental damage after prenatal infection: role of oxidative stress in the fetal brain. **Free Radic. Biol. Med.**, 2007; pp. 1231–1245.

LANTÉ, F., MEUNIER, J., GUIRAMAND, J., DE JESUS FERREIRA, M.C., CAMBONIE, G. AIMAR, R., COHEN-SOLAL, C., MAURICE, T., VIGNES M., AND BARBANEL, G. Late N-acetylcysteine treatment prevents the deficits induced in the offspring of dams exposed to an immune stress during gestation. **Hippocampus**, 2008; pp. 602–609.

LASALA N., ZHOU H. Effects of maternal exposure to LPS on the inflammatory response in the offspring. **J Neuroimmunol.** 2007; 189(1-2):95-101.

LAUDER, J.M. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1990; 600, 279–313.

LEÃO, P., SOUSA, J.C., OLIVEIRA, M., SILVA, R., ALMEIDA, O.F. SOUSA., N. Programming effects of antenatal dexamethasone in the developing mesolimbic pathways. **Synapse**, 61 (2007), pp. 40–49.

LEHNER, M. G., WISLOWSKA-STANEK, A., SKÓRZEWSKA, A., MACIEJAK, P., SZYNDLER, J., TURZYNISKA, D., SOBOLEWSKA, A., PLAZNIK, A. Differences in the density of GABA-A receptor alpha-2 subunits and gephyrin in brain structures of rats selected for low and high anxiety in basal and fear-stimulated

conditions, in a model of contextual fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, 2010; 94, 499-508.

LESAGE, J., BLONDEAU, B., GRINO, M., BREANT, B. AND DUPOUY, J.P. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. **Endocrinology**, 2001; pp. 1692–1702.

LEVITT, N.S., LINDSAY, R.S., HOLMES M.C., AND SECKL, J.R. Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. **Neuroendocrinology**, 1996; pp. 412–418.

LIN, Y.-L., LIN, S.-Y., WANG, S. Prenatal lipopolysaccharide exposure increases anxiety-like behaviors and enhances stress-induced corticosterone responses in adult rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2011; 26, 459-468.

LING, Z., ZHU, Y., TONG, C.W., SNYDER, J.A., LIPTON, J.W., CARVEY, P.M., Prenatal lipopolysaccharide does not accelerate progressive dopamine neuron loss in the rat as a result of normal aging. **Exp. Neurol.**, 2009; 216, 312–320.

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

LOU, H.C., HANSEN, D., NORDENTOFT, M., PRYDS, O., JENSEN, F., NIM, J., HEMMINGSEN, R. Prenatal stressors of human life affect fetal brain development. **Dev Med Child Neurol.**, 1994; v.36, p.826-832.

LOWRY, C.A., HALE, M.W., EVANS, A.K., HEERKENS, J., STAUB, D.R., GASSER, P.J., SHEKHAR, A. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008; 1148, 86–94.

LU, L., MAMIYA, T., LU, P., NIWA, M., MOURI, A., ZOU, L.-B., NAGAI, T., HIRAMATSU, M., NABESHIMA, T. The long-lasting effects of cross-fostering on the emotional behavior in ICR mice. **Behavioural Brain Research**. 2009; 198, 172-178.

LUMEY, L.H., Compensatory placental growth after restricted maternal nutrition in early pregnancy. **Placenta**, 1998; 105–111.

MACCARI, S., PIAZZA, P. V., KABBAJ, M., BARBAZANGES, A., SIMON, H., & LE MOAL, M. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. **Journal of Neuroscience** 1995; 15, 110–116.

MALENDOWICZ, L.K., RUCINSKI, M., BELLONI, A.S., ZIOLKOWSKA, A., NUSSDORFER, G.G. Leptin and the regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. **Int. Rev. Cytol.**, 2007; 263, 63–102.

MANOLI, I., ALESCI, S., BLACKMAN, M. R., SU Y. A., RENNERT O. M. and Chrousos., G. P. Mitochondria as key components of the stress response. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism**, 2007; Vol.18 No.5.

MEDVEDEV, A.E., KOPYDLOWSKI, K.M. AND VOGEL, S.N. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression, **J. Immunol.**, 2000; pp. 5564–5574.

MENARD, J., TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 1999; 23, 591–613.

MENDES-GOMES, J., NUNES-DE-SOUZA, R.L. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. **Brain Res.**, 2005; 1047, 97–104.

MENON, R.K.; COHEN, R.M. SPERLING, M.A.; CUTFIELD, W.S. MIMOUNI F. AND KHOURY, J.C. Transplacental passage of insulin in pregnant women with insulin-dependent diabetes mellitus. Its role in fetal macrosomia. **N Engl J Med**, 323 5 (1990), pp. 309–315.

MEYER, U., MURRAY, P.J., URWYLER, A., YEE, B.K., SCHEDLOWSKI, M., FELDON, J. Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated antiinflammatory signaling. **Mol. Psychiatry**, 2008; 13, 208–221.

MEYER, U., YEE, B.K., FELDON, J. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: The earlier the worse? **Neuroscientist**. 2007; v.13, p.241–256.

MOSCHOS, S., CHAN, J. L., MANTZOROS, C. S. Leptin and reproduction: a review. **Fertility and Sterility**, 2002; 77, 433-444.

NILSSON, C., LARSSON, B.M., JENNISCHE, E., ERIKSSON, E., BJORNTORP, P., YORK, D.A., HOMANG, A. Maternal endotoxemia results in obesity and insulin resistance in adult male offspring. **Endocrinology**, 200 1; 2622–2630.

NOMURA, F. AKASHI, S. SAKAO, Y. SATO, S. KAWAI, T. MATSUMOTO, M. NAKANISHI, K. KIMOTO, M. MIYAKE, K., TAKEDA K. AND AKIRA, S. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression, **J. Immunol.**, 2000; pp. 3476–3479.

NUNEZ, A.A. AND GRUNDMAN, M. Testosterone affects foodintake and body weight of weanling male rats. **Pharmacol.Biochemi.and Behav.** 1982; v.16, p.933–936.

NYIRENDA, M.J., LINDSAY, R.S., KENYON, C.J., BURCHELL A. AND SECKL, J.R. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepaticphosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. **J Clin Invest.**, 1998; pp. 2174–2181.

OATES, M., WOODSIDE, B., WALKER, C.D. Chronic leptin administration in developing rats reduces stress responsiveness partly through changes in maternal behavior. **Horm. Behav.**, 2000; 37 (4), 366–376.

OSKVIG, D. B., ELKAHLOUN, A. G., ET AL. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2012; v., n.4, p.623-634.

OWEN, D., MATTHEWS, S.G. Glucocorticoids and sex-dependent development of brain glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. **Endocrinology**, 2003; pp. 2775–2784.

PAINTLIA, A.S., CONTRERAS, M.A., SINGH, I. AND SINGH, A.K. Lipopolysaccharide-induced peroxisomal dysfunction exacerbates cerebral white matter injury: attenuation by N-acetyl cysteine. **Exp. Neurol.**, 2008; pp. 560–576.

PEZZE, M.A., FELDON, J., Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. **Prog. Neurobiol.**, 2004; 74, 301–320.

POYTON, R. O.; BALL, K. A.; CASTELLO, P. R. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. **Trends Endocrinol. Metab.**, 2009; 20:332–340.

PREVEDELO, A.D.B. *Influência do estresse de natureza psicossocial e biológica na indução de estresse oxidativo, danos celulares e alterações comportamentais*. Dissertação de Mestrado em Neurociências, UFSC; 2009.

RAMSDEN, M., SHIN, T.M., PIKE, J. Androgens modulate neuronal vulnerability to kainate lesion. **Neuroscience**. 2003; 122, 573–578.

REUL, J.M., GESING, A., DROSTE, S., STEC, I.S., WEBER, A., BACHMANN, C., BILANG-BLEUEL, A., HOLSBOER, F., LINTHORST, A.C. The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function. **Eur J Pharmacol**, 2000; pp 235-249.

RICE, D., BARONE JR., S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* 2000; pp. 511–533.

ROMERO, R., ROSLANSKY, P., OYARZUN, E., WAN, M., EMAMIAN, M., NOVITSKY, T.J., GOULD M.J., AND HOBBS,

J.C. Labor and infection. II. Bacterial endotoxin in amniotic fluid and its relationship to the onset of preterm labor. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 1988; pp. 1044–1049.

ROSA, V.P., VANDRESSEN, N., CALIXTO, A.V., KOVALESKI, D.F., FARIA, M.S. Temporal analysis of the rat's behavior in the plus-maze: effect of midazolam. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 2000; 67, 177–182.

ROSEBOOM, T.J., JH VAN DER MEULEN, C. OSMOND, DJ BARKER, AC RAVELLI E JM SCHROEDER-TANKA, G A VAN MONTFRANS, R P J MICHELS, O P BLEKER. Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944-45. **Heart**, 2000; pp 595-598.

SAMUELSSON, A.M., JENNISCHE, E., HANSSON, H.A., HOLMÄNG, A., 2006. Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning. **Am. J. Physiol.**, 2006; 290, R1345–R1356.

SCHULZ, K. M., PEARSON, J. N., NEELEY, E. W., BERGER, R., LEONARD, S., ADAMS, C. E. Maternal stress during pregnancy causes sex-specific alterations in offspring memory performance, social interactions, indices of anxiety, and body mass. **Physiol Behav.** 2011 3;104(2):340-7.

SECKL, J.R., Glucocorticoids, feto-placental 11[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease. **Steroids**, 1997; 62, 89–94.

SHI, L. FATEMI, S.H. SIDWELL R.W. AND PATTERSON, P.H. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. **J. Neurosci**, 2003; pp. 297–302.

SIEGEL LI, NUNEZ AA, WADE GN. Effects of androgens on dietary self-selection and carcass composition in male rats. **J Comp Physiol Psychol.**, 1981; 95:529.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am. J. Med.** 91:31S–38S; 1991.

SLAMBEROVA R, CHAROUSOVA P, POMETLOVA M. Maternal behavior is impaired by methamphetamine administered during pre-mating, gestation and lactation. **Reprod Toxicol.**, 2005; 20(1):103–10.

SMITH, J.T., WADDELL, B.J. Leptin distribution and metabolism in the pregnant rat: transplacental leptin passage increases in late gestation but is reduced by excess glucocorticoids. **Endocrinology.** 2003; Jul;144(7):3024-30.

SOLATI, J. ZARRINDAST, M.R. SALARI, A.A. Dorsal hippocampal opioidergic system modulates anxiety-like behaviors in adult male Wistar rats, **Psychiatry Clin. Neurosci.**, 2010; 634–641.

SPECHT, L.A., PICKEL, V.M., JOH, T.H., REIS, D.J. Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. I. Early ontogeny. **J. Comp. Neurol.**, 1981; 199, 233–253.

SUGDEN, M. C., LANGDOWN, M. L., MUNNS, M. J., AND HOLNESS, M. J. Maternal glucocorticoid treatment modulates placental leptin and leptin receptor expression and materno-fetal leptin physiology during late pregnancy, and elicits hypertension associated with hyperleptinaemia in the earlygrowth- retarded adult offspring. **Eur. J. Endocrinol.**, 2001; 45:529–539.

TAKAHASHI L.K., TURNER J.G., AND KALIN, N.H. Prolonged stress-induced elevation in plasma corticosterone during pregnancy in the rat: implications for prenatal stress studies. **Psychoneuroendocrinology**, 1998; pp. 571–581.

TAMASHIRO, K. L.K., TERRILLION, C. E. HYUN, J., JAMES I. K., AND TIMOTHY H. M. Prenatal Stress or High-Fat Diet Increases Susceptibility to Diet-Induced Obesity in Rat Offspring. **Diabetes**, 2009; 58:1116-1125.

TOSTE, F.P., ALVES, S.B., DUTRA, S.C., BONOMO, I.T., LISBOA, P.C., MOURA, E.G., PASSOS, M.C. Temporal evaluation of the

thyroid function of rats programmed by leptin treatment on the neonatal period. **Horm. Metab. Res.**, 2006; 38 (12) 827–831.

TÚÑEZ, I., FEIJÓO, M., COLLADO, J. A., MEDINA, F. J., PENÁ, J., MUÑOZ, M. A. D. C., JIMENA, I., FRANCO, F., RUEDA, I., MUNTANÉ, J., MONTILLA, P. Effect of testosterone on oxidative stress and cell damage induced by 3-nitropropionic acid in striatum of ovariectomized rats. **Life Sciences**, 2007; 80, 1221-1227.

ULRICH-LAI, Y.M., HERMAN, J.P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat. Rev. Neurosci.** 2009; 10, 397–409.

URBAN JH, BAUER-DANTOIN AC, LEVINE JE. Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus: sexual dimorphism and modulation by testosterone. **Endocrinology**, 1993;132:139.

VAN DIJK, G., SEELEY, R.J., THIELE, T.E., FRIEDMAN, M.I., JI, H., WILKINSON, C.W., BURN, P., CAMPFIELD, L.A., TENENBAUM, R., BASKIN, D.G., WOODS, S.C., SCHWARTZ, M.W. Metabolic, gastrointestinal, and CNS neuropeptide effects of brain leptin administration in the rat. **Am. J. Physiol.** 1999; R1425–R1433.

VOM SAAL, F.S. QUADAGNO, D.M. EVEN, M.D. KEISLER, L.W. KEISLER, D.H. KHAN S. Paradoxical effects of maternal stress on fetal steroids and postnatal reproductive traits in female mice from different intrauterine positions. **Biol. Reprod.**, 1990; pp. 751–761.

WADHWA P.D., SANDMAN C.A., PORTO M., DUNKEL-SCHETTER C., AND GARITE T.J. The association between prenatal stress and infant birth weight and gestational age at birth: a prospective study. **Am J Obstet Gynecol.**, 1993; v.169, p.858-865.

WALKER, A. K., HILES, S. A., SOMINSKY, L., MCLAUGHLIN, E. A., HODGSON, D. M. Neonatal lipopolysaccharide exposure impairs sexual development and reproductive success in the Wistar rat. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2011; 674-684.

WALLEN, W.J., BELANGER, M.P., WITTNICH, C. Sex hormones and the selective estrogen receptor modulator tamoxifen modulate

weekly body weights and food intakes in adolescent and adult rats. **J. Nutr.**, 2001; 131, 2351–2357.

WANG, S., YAN, J.Y., LO, Y.K., CARVEY, P.M., LING, Z. Dopaminergic and serotonergic deficiencies in young adult rats prenatally exposed to the bacterial lipopolysaccharide. **Brain Res.**, 2009; 1265, 196–204.

WEAVER, I.C. CERVONI, N., CHAMPAGNE, F.A., D'ALESSIO, A.C., SHARMA S., AND SECKL, J.R. DYMOV, S., SZYF, M., AND MEANEY, M.J. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nat Neurosci.**, 2004; pp. 847–854.

WEI, Y.L., LI, X.H., ZHOU, J.Z. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in increases in blood pressure and body weight in rats. **Acta Pharmacol.**, Sin. 28, 2007; 651–656.

XU, D.X., CHEN, Y.H., WANG, H., ZHAO, L., WANG J.P. AND WEI, W. Effect of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal death and intra-uterine growth retardation in mice, **Toxicol. Sci.**, 2005; pp. 525–533.

XU, D.-X., WANG, H., *ET AL.* Effects of low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment on LPS-induced intra-uterine fetal death and preterm labor. **Toxicology**, 2007; v., n.3, p.167-175.

ZAHNER, M.R, LI, D-P, PAN, H-L. Benzodiazepine inhibits hypothalamic presympathetic neurons by potentiation of gabaergic synaptic input. **Neuropharmacology**, 2007; 52:467-475.

ZHU, Y., CARVEY P.M. AND LING, Z. Altered glutathione homeostasis in animals prenatally exposed to lipopolysaccharide. **Neurochem. Int.**, 2007; pp. 671–680.

