



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS - PPGCM

Ana Cláudia Januário

Ativação imune materna como modelo de Transtorno de Espectro Autista (TEA):
alterações bioquímicas e comportamentais na prole adulta de ratos *Wistar*

Florianópolis

2020

Ana Cláudia Januário

Ativação imune materna como modelo de Transtorno de Espectro Autista (TEA):
alterações bioquímicas e comportamentais na prole adulta de ratos *Wistar*

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Orientadora: Profa. Maria Marlene de Souza Pires, Dra.

Coorientador: Prof. João Carlos Xikota, Dr.

Florianópolis

2020

Ana Cláudia Januário

Título: Ativação imune materna como modelo de Transtorno de Espectro Autista (TEA): alterações bioquímicas e comportamentais na prole adulta de ratos *Wistar*

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª. Ana Paula Dambros Taschetto, Dra.

Instituição:

Prof. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, Dr.

Instituição: UFSC

Prof. Edelson Flavio Morato Dr.

Instituição: UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em título obtido pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas (Novo).

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profª. Maria Marlene de Souza Pires Dra.
Orientadora.

Florianópolis, 2020.

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

JANUARIO, ANA CLAUDIA

ATIVÇÃO IMUNE MATERNA COMO MODELO DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA); : alterações bioquímicas e comportamentais na prole adulta de ratos Wistar / ANA CLAUDIA JANUARIO ; orientador, MARIA MARLENE DE SOUZA PIRES, Dra., coorientador, JOÃO CARLOS XIKOTA,Dr., 2020. 80 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas-Novo, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Ciências Médicas-Novo. 2. Transtorno do espectro autista. 3. Citocinas. 4. Inflamação. 5. Ativação Imune Materna.. I. DE SOUZA PIRES, Dra., MARIA MARLENE. II. XIKOTA,Dr., JOÃO CARLOS. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas-Novo. IV. Título.

*Dedico este trabalho ao meu grande amor,
que veio para me proporcionar as maiores
e melhores emoções de minha existência.
Maria Teresa, minha amada e desejada filha!
Você com certeza foi e “É” a escolha mais acertada,
a dúvida inexistente, o brilho do meu olhar,
a alegria no meu sorriso, e força para continuar,
a coragem para desafiar e a leveza para tocar em frente.
Obrigada por tornar a conclusão deste trabalho viável e menos dolorosa,
por compreender os momentos de minha ausência!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a vida como ela é, exatamente e simplesmente assim!!!!

Agradeço aos meus pais D. Terezinha e Sr. Venâncio (*in memoriam*) que me propiciaram a vida e me ensinaram a compartilhar e amar.

À Maria Teresa, minha filha linda, por compreender meus vários momentos de ausência nesses quatro anos, obrigada por existir!!!!

Aos meus irmãos por dividirem comigo a grande e divertida aventura de serem filhos dessas duas figuras que são nossos pais. Seu Venâncio não está mais entre nós, mas nos deixou um grande legado de amor e honestidade, e Dona Terezinha, mulher solidária forte de fibra e de grande sabedoria.

Agradeço imensamente e infinitamente à Eliane, Moacir, Gabriela e André que têm compartilhado os grandes e desafiadores momentos de minha vida. Durante este trabalho não foi diferente, sem o auxílio de vocês nos cuidados à Maria Teresa, não seria possível a conclusão deste. Muitíssimo obrigada!!

À Eliete e Eli, parceria de vida que ultrapassa os laços sanguíneos. Somos também irmãs de alma, cada uma de seu jeito, mas com amor infinito.

Aos meus sobrinhos e sobrinhas que tanto amo, amor esse que nos últimos anos vem se multiplicando através de sobrinho netos.

Ao João Vitor, “o melhor quase filho do mundo”. Obrigada pelo amor que você desperta em mim e por ser o “quase irmão mais legal do mundo” para Maria Teresa.

À minha orientadora Dra. Maria Marlene de Souza Pires, por ter aberto as portas, me dando a oportunidade de ingressar no doutorado e pelo incentivo e disponibilidade.

Ao meu coorientador professor Dr. Joao Carlos Xikota, pelo seu incentivo, apoio e disponibilidade em contribuir neste trabalho.

Ao Professor Dr. Roger Walz, pelo apoio e por permitir o desenvolvimento deste trabalho no Laboratório da Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Às professoras Dra. Alexandra Susana Latini, Dra. Roberta Martins de Paula e Dra. Joana Gaspar, pelo grande apoio e incentivo técnico-científico.

Aos Professores Edelson e Getúlio, pela maestria com que conduziram suas aulas.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, por dividirem os momentos de estudo e pesquisa.

Aos colegas Hiago, Josiel, Cristiane e Alexandre, do Laboratório da Pós-Graduação em Ciências Médicas, pelo apoio e incentivo.

Ao departamento de Ciências Fisiológicas da UFSC, por ter permitido meu afastamento para a realização do doutorado. Principalmente ao professor Dr. Vander Baptista (chefe de departamento) e ao colega Péricles, pelo incentivo e colaboração.

Aos colegas e amigos do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSC, pelo apoio e incentivo.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender”.

Marie Curie

RESUMO

O transtorno do espectro autista (TEA) é uma das doenças psiquiátricas mais incidentes, com impacto familiar, social e econômico. As características do autismo surgem na primeira infância, perdurando ao longo da vida. Há indícios robustos que alterações no neurodesenvolvimento embrionário e fetal estão ligadas ao surgimento do TEA, e a ativação da imunidade materna parece interferir no desenvolvimento do SNC. O surgimento crescente de TEA nas últimas duas décadas, somado à heterogeneidade das características envolvidas, instiga o interesse de pesquisadores. No presente trabalho, investigou-se as alterações bioquímicas e comportamentais na prole de ratas prenhes inflamadas por LPS, um modelo animal de TEA. Ratas prenhes foram submetidas a doses de 15 ou 150 µg/kg de LPS em dose única ou doses repetidas em 3 dias consecutivos, durante período gestacional correspondente ao da migração neuronal e formação cortical (GD 17 ou GD15-17). Citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF e IL-10) foram quantificadas no soro materno, no líquido amniótico e soro da prole adulta, onde foi observado aumento de expressão de IL-1 β no soro materno das ratas que receberam dose única de LPS (150 µg/kg) e aumento da expressão de IL-10 nas ratas que receberam doses repetidas de LPS (150 µg/kg). O aumento da expressão de IL-1 β no líquido amniótico da prole exposta à dose única nas concentrações de 15 e 150 µg/kg de LPS. O soro da prole adulta exposta a 3 doses repetidas de LPS (150 µg/kg) apresentou alta expressão de IL-1 β . Testes comportamentais foram desenvolvidos nos filhotes machos e fêmeas após 60 dias do nascimento, com o intuito de avaliar habilidades cognitivas, emocionais, a sociabilidade e o comportamento somatossensorial. Observamos que baixas concentrações de LPS foram capazes de induzir repostas imunes na mãe e na prole já adulta. Animais adultos, machos e fêmeas, submetidos à inflamação pré-natal, não reconheceram o novo objeto no teste de reconhecimento de objeto, indicando prejuízos nos aspectos cognitivos, além de apresentaram alterações significativas de sociabilidade no teste de interação social. Importante, destaca-se o desfecho negativo no comportamento sensorial, visto que o teste de dor de von Frey não foi aplicado em estudos anteriores com este modelo de ativação imune induzida por LPS. Esses resultados são de extrema magnitude, uma vez que os aspectos cognitivos, a sociabilidade e as funções somestésicas fazem parte dos sintomas clínicos do TEA e parecem estar interligadas.

Palavras-chave: Transtorno do espectro autista. Citocinas. Inflamação. Ativação Imune Materna.

ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is one of the most incident psychiatric illnesses, affecting family, social and economic aspects. The characteristics of autism emerge in early childhood, lasting throughout life. There is robust evidence pointing out the changes in embryonic and fetal neurodevelopment with ASD, besides the activation of maternal immunity impairing the CNS development. The increasing appearance of ASD in the last two decades, added to the heterogeneity of the characteristics involved, piques the interest of researchers. Here, we investigated the biochemical and behavioral changes in the offspring of pregnant LPS-inflamed rats, comprising an animal model of ASD. Pregnant rats were submitted to doses of 15 or 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of LPS in single or repeated doses on 3 consecutive days, during the gestational period corresponding to that of neuronal migration and cortical formation (GD 17 or GD15-17). Inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF and IL-10) were quantified in maternal serum, amniotic fluid and serum of adult offspring, where increased expression of IL-1 β was observed in the maternal serum of rats that received a single dose of LPS (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and increased expression of IL-10 in rats that received repeated doses of LPS (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$). There was an increased expression of IL- β in the amniotic fluid of the offspring exposed to a single dose of LPS (15 and 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) as well as in the serum of adult offspring exposed to 3 repeated doses of LPS (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Behavioral tests were carried out on male and female offspring after 60 days of birth, in order to assess cognitive, emotional skills, sociability and somatosensory behavior. We observed that low concentrations of LPS were able to induce immune responses in the mother and in the adult offspring. Adult animals, males and females submitted to prenatal inflammation did not recognize the new object in the object recognition test, indicating impairments in cognitive aspects, in addition to showing significant changes in sociability in the social interaction test. Importantly, the negative outcome in sensory behavior stands out, since the von Frey pain test has not been applied in previous studies with this model of LPS-induced immune activation. These results are of great importance since the cognitive aspects, sociability and somesthetic functions are part of the clinical symptoms of ASD and seem to be interconnected.

Keywords: Autism spectrum disorder. Cytokines. Inflammation. Maternal Immune Activation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração das etapas do desenvolvimento cerebral.....	18
Figura 2 - Esquema ilustrando a neurogênese do córtex em mamíferos.....	19
Figura 3 - Modelo de ativação imune materna estimulada com a administração de LPS, resultando em alterações epigenéticas.....	26
Figura 4 - Reconhecimento do LPS por diferentes sensores do sistema imune inato.....	28
Figura 5 - Resposta imune e liberação de citocinas durante a gravidez.....	29
Figura 6 - Ativação imune materna em diferentes fases do desenvolvimento do SNC e suas implicações.....	32
Figura 7 - Lavado vaginal de fêmeas sem a presença de espermatozoides (A) e lavado positivo contendo espermatozoides (B).....	37
Figura 8 - Indução inflamatória nas ratas prenhes e coleta de amostras biológicas para análise imunológica.....	39
Figura 9 - Linha do tempo dos procedimentos experimentais da segunda etapa do trabalho..	40
Figura 10 - Labirinto em cruz elevado.....	42
Figura 11 - Teste do campo aberto.....	43
Figura 12 - Teste de esquiva inibitória (<i>step down</i>).....	44
Figura 13 - Teste de interação social de 3 câmaras.....	45
Figura 14 - Teste de reconhecimento de objetos.....	46
Figura 15 - Teste de von Frey.....	47
Figura 16 - Efeitos da inflamação induzida por LPS sobre citocinas dosadas no líquido amniótico e soro materno de ratas prenhes e soro da prole quando adultos.....	51
Figura 17 - Efeitos do processo inflamatório induzido por dose única de LPS sobre a performance cognitiva de ratos e ratas nascidos de mães inflamadas durante o período gestacional.....	53
Figura 18 - Efeitos do processo inflamatório induzido por 3 doses consecutivas de LPS sobre a performance cognitiva de ratos e ratas nascidos de mães inflamadas durante o período gestacional.....	54
Figura 19 - Efeitos do processo inflamatório induzido por uma única ou 3 doses consecutivas de LPS sobre a performance cognitiva de ratos e ratas nascidos de mães inflamadas durante o período gestacional.....	55

Figura 20 - Efeitos do processo inflamatório induzido por uma única ou 3 doses consecutivas de LPS sobre comportamentos emocionais de ratos e ratas nascidos de mães inflamadas durante o período gestacional.....	56
Figura 21 - Efeitos do processo inflamatório induzido por uma única ou 3 doses consecutivas de LPS sobre a atividade locomotora de ratos e ratas nascidos de mães inflamadas durante o período gestacional.....	57
Figura 22 - Efeitos do processo inflamatório induzido por uma única ou 3 doses consecutivas de LPS sobre o comportamento social no teste das três câmaras em ratos e ratas nascidos de mães inflamadas durante o período gestacional.....	58
Figura 23 - Efeitos do processo inflamatório induzido por uma única ou 3 doses consecutivas de LPS sobre a dor de ratos e ratas nascidos de mães inflamadas durante o período gestacional.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos do processo inflamatório induzido por LPS sobre parâmetros fisiológicos e demográficos de ratas prenhes.....	49
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AIM	Ativação imune materna
BHE	Barreira hematoencefálica
BP	Barreira placentária
CA	Campo aberto
GD	Dia gestacional
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
i.p.	Intraperitoneal
LCE	Labirinto em cruz elevado
LPS	Lipopolissacarídeo
LBP	Proteína ligante de lipopolissacarídeo
MD-2	Diferenciação mieloide-2
NET	Rede extracelular de neutrófilos
NF-KB	Fator nuclear Kappa B
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
PND	Dia pós-nascimento
SNC	Sistema Nervoso Central
TEA	Transtorno espectro autista
TLR4	Receptor toll-like 4
TNF- α	Fator necrose tumoral α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 DESENVOLVIMENTO CEREBRAL.....	17
1.2 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA).....	22
1.3 ESTUDOS CLÍNICOS SOBRE TEA.....	24
1.4 ESTUDOS EXPERIMENTAIS SOBRE TEA.....	25
2 JUSTIFICATIVA.....	34
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 OBJETIVO GERAL.....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 ANIMAIS.....	36
4.2 DROGAS.....	38
4.3 ANÁLISE IMUNOLÓGICA.....	38
4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	40
4.4.1 Sala de comportamento.....	41
4.4.2 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE).....	41
4.4.3 Teste do campo aberto (CA).....	42
4.4.4 Teste da esquiiva inibitória (<i>step down</i>).....	43
4.4.5 Teste de interação social (3 câmaras).....	44
4.4.6 Teste de reconhecimento de objetos.....	45
4.4.7 Teste de von Frey.....	46
5 RESULTADOS.....	48
5.1 PARÂMETROS DEMOGRÁFICOS, FISIOLÓGICOS E NÍVEIS DE CITOCINAS DOSADAS EM RATAS PRENHES SUBMETIDAS À INFLAMAÇÃO E NA PROLE ADULTA.....	48
5.2 PERFIL COGNITIVO DA PROLE ADULTA DE RATAS INFLAMADAS DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL.....	52
5.3 PERFIL EMOCIONAL DA PROLE ADULTA DE RATAS INFLAMADAS DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL.....	56
5.4 EFEITOS SOBRE A SENSACÃO MECÂNICA NA PROLE ADULTA DE RATAS INFLAMADAS DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL.....	60
6 DISCUSSÃO.....	62

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO.....	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 DESENVOLVIMENTO CEREBRAL

A compreensão dos transtornos neuropsiquiátricos e sua origem são imprescindíveis para o progresso de novas práticas, protocolos e tecnologias no atendimento de crianças que apresentam algum prejuízo funcional do Sistema Nervoso Central (SNC). Em especial, o transtorno do espectro autista (TEA) é uma das desordens neuropsiquiátricas mais diagnosticada em crianças nas últimas décadas. Para que seja possível compreender os mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos no aparecimento do TEA, é indispensável a atenção de cientistas sobre o conhecimento do desenvolvimento cerebral, uma vez que este transtorno se origina precocemente no período intrauterino. (CASANOVA, M.F. 2007, MEYER; YEE; FELDON, 2007, KAZDOBA, et al., 2016, LYALL, et al., 2017)

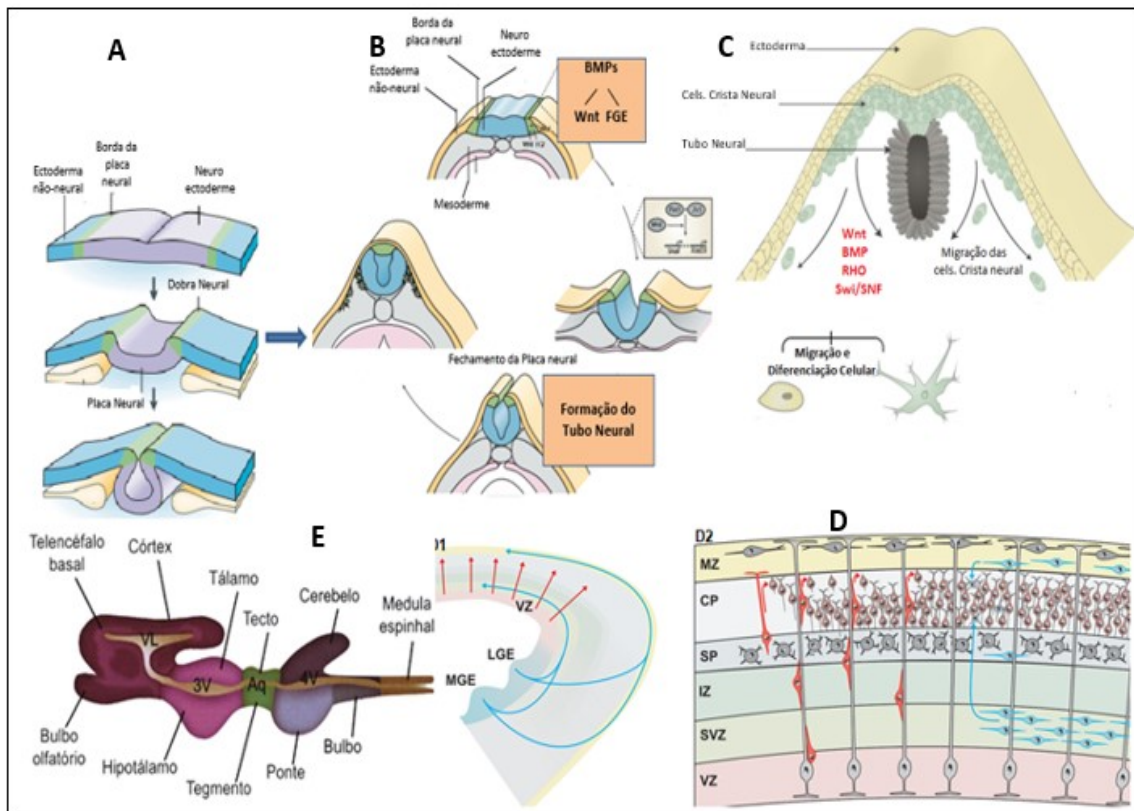
O desenvolvimento embrionário é regulado por uma série de eventos precisamente determinados que envolve uma sequência complexa e harmoniosa iniciada na terceira semana de gestação em humanos, perdurando até o início da fase adulta. Na fase inicial do desenvolvimento neural, o tecido nervoso é induzido na camada ectodérmica do embrião, que se divide em três regiões diferentes: o ectoderma neural ou placa neural, que dará origem ao SNC; o ectoderma não neural, que formará a epiderme; e as células encontradas entre o ectoderma neural e o não neural, que formarão a crista neural (GAMMILL; BRONNER-FRASER, 2003).

O tecido neural se dobra para formar o tubo neural em um processo chamado neurulação, isto ocorre por volta da quinta semana. Neste momento, as células da borda da placa neural modificam-se para formar as dobras neurais do tubo neural. Por sua vez, as células da crista neural iniciam a migração das pregas neurais fechando o tubo neural dorsal (Figura 1). Proteínas Wnt, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e fatores de crescimento (FGFs) induzem a crista neural e são responsáveis por sua manutenção (GAMMILL; BRONNER-FRASER, 2003; JOHNSEN; DYBERG; WICKSTRÖM, 2019; LUHMANN; FUKUDA; KILB, 2015; MOLNÁR et al., 2019; SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008).

Logo, inicia-se a proliferação celular, onde neuroblastos são intensamente produzidos na zona subventricular e zona ventricular e migram, iniciando a formação cortical entre a sexta e décima oitava semana gestacional em humanos (ANDERSON; SPENCER-SMITH; WOOD, 2011) e em roedores e entre o décimo primeiro dia de gestação (GD11) e o décimo sétimo dia gestacional (GD17, CHEN et al., 2017).

Em seguida, o tecido neural começa a se diferenciar ao longo dos vários eixos, sendo eles: longitudinal, formando o prosencéfalo, mesencéfalo e medula espinhal; vertical, que estabelece as porções dorsais e ventrais; e, eixo horizontal, conduz o crescimento das estruturas medial e laterais, formando o ventrículo e áreas subventriculares (GRAAF-PETERS; HADDERS-ALGRA, 2006).

Figura 1 - Ilustração das etapas do desenvolvimento cerebral. A) origem do tecido nervoso e formação da crista neural; B) Fechamento do tubo neural e início da produção e diferenciação celular; C) Proliferação, os neuroblastos são intensamente produzidos na zona subventricular e zona ventricular de neurônios e migram iniciando a formação cortical, estes processos ocorrem através da sinalização de moléculas sinalizadoras: proteínas Wnt (Wnt), proteína morfogenética óssea (BMP) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF); D) Migração neuronal radial das células piramidais e migração tangencial dos interneurônios, zona marginal (MZ); placa cortical (CP); subplaca (SP); zona subventricular (SVZ); zona ventricular (VZ); E) Prosencéfalo, mesencéfalo e medula espinhal; porções dorsais e ventrais e eixo horizontal, crescimento das estruturas medial e laterais.



Fonte: Adaptado de Gammill e Bronner-Fraser (2003); Johnsen, Dyberg e Wickström (2019); Luhmann, Fukuda e Kilb (2015); Molnár et al., (2019) e Sauka-Spengler e Bronner-Fraser (2008).

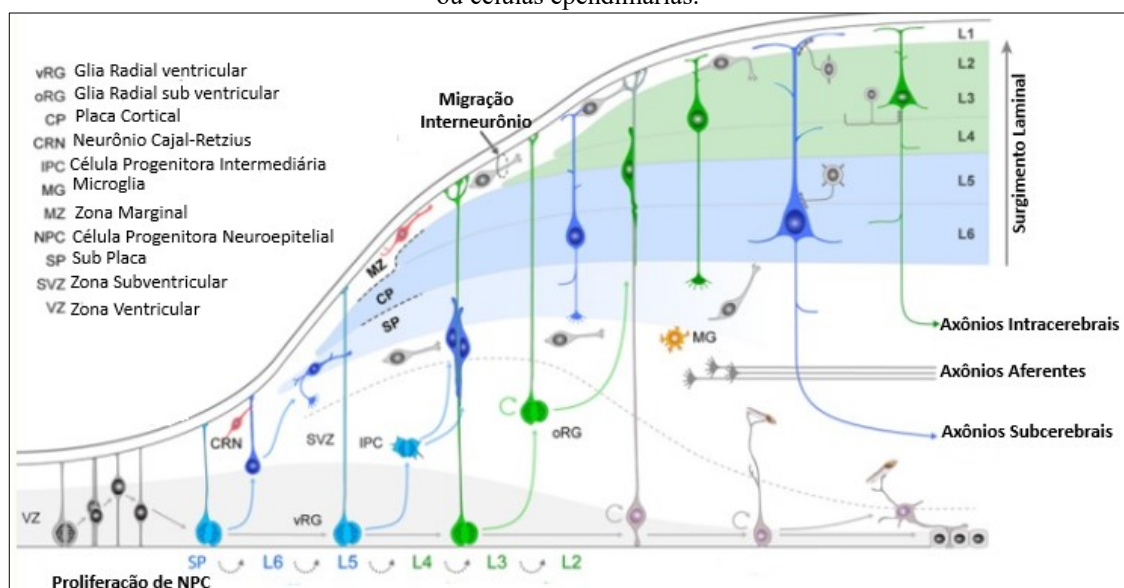
Antes do início da migração radial dos neurônios piramidais, células prematuras de vários tipos preenchem o espaço próximo à superfície basal para formar uma estrutura dinâmica e transitória denominada pré-placa. As células da pré-placa nascem antes dos primeiros neurônios piramidais e morrem para se tornar interneurônios inibitórios (BUDDAY; STEINMANN; KUHL, 2015).

As duas populações distintas de células progenitoras do córtex cerebral que geram neurônios durante a embriogênese foram identificadas como as células da glia radial e células progenitoras intermediárias (SALAMASO et al., 2014). Os neurônios gerados por elas percorrem longas distâncias até seus destinos, este processo é conhecido como migração neuronal, que é realizado graças a afinadíssimos mecanismos moleculares ativados por cascatas de sinalização através de receptores, fatores de transcrição, moléculas de adesão, proteínas de matriz extracelular e moléculas de sinalização intracelular (KRIEGSTEIN; NOCTOR, 2004).

Inicia-se o desenvolvimento da placa cortical, que primeiramente é dividida em zona marginal superficial e uma sub-placa subjacente. Os neurônios corticais se agrupam acima da sub-placa em uma sequência de dentro para fora, onde os neurônios mais antigos formam as camadas internas e, à medida que são produzidos, formam as camadas subsequentes (BUDDAY; STEINMANN; KUHL, 2015).

Grande parte dos neurônios piramidais migram ao longo da glia em sentido radial direto para a posição laminar do córtex em desenvolvimento (ANDERSON; SPENCER-SMITH; WOOD, 2011). No entanto, interneurônios podem seguir um sentido tangencial atravessando uma distância bem maior até chegar ao seu destino (Figura 2, KRIEGSTEIN; NOCTOR, 2004).

Figura 2 - Esquema ilustrando a neurogênese do córtex em mamíferos. As células progenitoras neuroepiteliais (NPCs) proliferam-se e sofrem divisão celular transformando-se em células da glia radial ventricular (vRGCs), que se dividem formando os vRGC, que são neurônios de projeção que migram radialmente da zona ventricular (VZ) em direção à placa cortical (CP). Surgem os primeiros neurônios que formam a pré-placa, que posteriormente divide-se em zona marginal (MZ) e sub-placa (SP). Novos subtipos de neurônios são gerados, os de projeção instalam-se nas camadas mais profundas e outros nos estágios intermediários da neurogênese. Novas células neuronais podem se tornar células progenitoras intermediárias (IPCs) ou células gliais radiais externas (oRGCs) na zona subventricular (SVZ). Após a neurogênese, vRGCs se tornam glicogênios gerando astrócitos ou células ependimárias.



Fonte: adaptado de Molnár et al., (2019).

O córtex cerebral é uma estrutura laminada que, dependendo da espécie, pode ter entre 3 e 6 camadas organizadas para receber informações do meio ambiente, principalmente através do tálamo e, em seguida, enviam essas informações para outras regiões cerebrais responsáveis por respostas específicas (SALAMASO et al., 2014). É através do córtex que ocorre a interação e consequente resposta ao meio externo, a percepção, a sensibilidade, o pensamento e funções cognitivas (MOLNÁR et al., 2019).

A formação cortical caracteriza uma etapa crucial no neurodesenvolvimento em todos os mamíferos. Em humanos, o pico da atividade migratória ocorre entre o terceiro e quinto mês gestacional e se completa no último trimestre (BUDDAY; STEINMANN; KUHL, 2015). Em roedores, a migração neuronal ocorre entre o décimo primeiro dia de gestação (GD11) e o décimo sétimo dia gestacional (GD17) (CHEN et al., 2017).

A migração neuronal é uma etapa fundamental na formação cortical e no funcionamento cerebral. Agravos durante este percurso podem levar a desordens no neurodesenvolvimento, resultando em transtornos como o TEA e esquizofrenia (PAN; WU; YUAN, 2019). Uma vez concluída a migração celular, ocorre a diferenciação celular, onde as células formam sistemas especializados, estabelecendo conexões relevantes e iniciando mielinização e atividade funcional. A apoptose é uma forma de morte celular programada que elimina células com conexões sinápticas pobres ou desnecessárias e resulta em degeneração de quase metade de todos os neurônios durante o desenvolvimento. Após a apoptose, conexões neuronais interligam novas áreas do córtex, fase esta do neurodesenvolvimento conhecida como sinaptogênese (BUDDAY; STEINMANN; KUHL, 2015).

Conforme mencionado, a morfogênese cerebral apresenta etapas bem estabelecidas e definidas. Muitos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento neural foram identificados nos últimos anos, mas ainda persistem muitas questões obscuras que precisam ser elucidadas. Segundo Galic, Riazi e Pittman (2012), citocinas pró-inflamatórias e inflamatórias desempenham papéis importantes no neurodesenvolvimento e possivelmente no envelhecimento normal. Paradoxalmente, parece que mediadores inflamatórios afetam o cérebro durante o desenvolvimento, resultando em distúrbios do desenvolvimento neurológico, como TEA, epilepsia e esquizofrenia. Portanto, há uma atenção crescente em direção a compreensão dos mecanismos inflamatórios e seus efeitos no funcionamento do SNC, bem como, no surgimento de doenças neuropsiquiátricas. (STOLP, 2013, JIANG et al., 2018)

Estudos recentes evidenciaram que a micróglia tem um papel central em aspectos específicos do desenvolvimento cerebral, homeostase e de doenças. Foi demonstrado que a microglia elimina os resíduos celulares apoptóticos e contribui para a reorganização sináptica,

com um papel importante na formação das fendas sinápticas. Além disto, regula o número de neurônios, as células progenitoras e axônios dopaminérgicos e axônios do corpo caloso, além de regular a migração de interneurônios corticais que são reguladores do equilíbrio excitatório-inibitório e estar implicada no surgimento de TEA e esquizofrenia (THION; GINHOUX; GAREL, 2018).

Neurônios piramidais corticais são gerados nas zonas germinativas da região dorsal e os interneurônios corticais são oriundos da região ventral. Os neurônios corticais piramidais migram no caminho radial direto à posição laminar do córtex em desenvolvimento. A migração neuronal é complexa e caracteriza-se pelo deslocamento espacial e temporal das células piramidais e interneurônios GABAérgicos. No início da neurogênese, as células GABA expressas na zona proliferativa migram para formar as camadas corticais. Padrões de migração neuronal são muito complexos, enquanto interneurônios percorrem um caminho predominantemente tangencial para formar o córtex, as células piramidais trilham um caminho radial (LEVITT, 2003).

O cérebro apresenta interneurônios excitatórios e inibitórios que se conectam, permitindo processos como a locomoção, pensamento, sensações e interação com o ambiente. Apesar dos interneurônios inibitórios compreenderem uma pequena fração, exercem um rígido controle sobre a atividade neuronal e o processamento da informação. Qualquer desequilíbrio no balanço inibitório/excitatório, por mínimo que seja, pode acarretar danos irreversíveis ao cérebro em desenvolvimento (EZZAT et al., 2018).

Apesar do GABA ser o principal neurotransmissor inibitório, tendo papel crucial no controle da excitabilidade neuronal no cérebro adulto, os interneurônios GABAérgicos têm uma importante função excitatória no período embrionário, modulando a migração neuronal e levando ao desenvolvimento cortical. A modificação do fenótipo excitatório para o fenótipo inibitório ocorre concomitantemente com o desenvolvimento cerebral. Acredita-se que isto aconteça devido às modificações das concentrações de cloreto no meio intracelular dos interneurônios (BEN-ARI et al., 2012). Assim, os interneurônios GABA têm papel fundamental no equilíbrio neuronal do cérebro adulto, além de participar ativamente na migração neuronal para a formação cortical.

Estes achados demonstram que falhas nos interneurônios GABAérgicos no período embrionário podem culminar em distúrbios ao SNC do indivíduo com TEA. Supõe-se que a elevação na quantidade de neurotransmissores GABAérgicos nos períodos iniciais do neurodesenvolvimento podem desregular o equilíbrio excitatório-inibitório do SNC. Também,

GABA está relacionado com alterações na nocicepção em modelos animais de TEA (MCPARTLAND, 2016):

A alterações encontradas no TEA são heterogêneas afetando todas ou algum tipo de percepção sensorial, indivíduos com TEA podem apresentar hipo ou hiper responsividade a estímulos sensoriais diversos (ROBERTON, BARON-COHEN, 2017). Estas características podem ser causadas por desequilíbrio excitatório-inibitório e o envolvimento da circuitaria GABAérgica. Estas alterações podem ser encaradas como fatores etiológicos fisiológicas do TEA, uma vez que interneurônios GABA têm fundamental importância para o equilíbrio neuronal do cérebro adulto, além de participar ativamente na migração neuronal para a formação cortical (NOVAIS et al., 2014).

1.2 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)

O TEA é definido como um distúrbio de desenvolvimento neurológico caracterizado por deficiências em dois domínios principais: déficits na comunicação e interação social e padrões repetitivos de comportamento, interesses e atividades, segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM-V (APA, 2014). Conforme a Organização Pan-Americana de Saúde Brasil (OPAS, 2017) e a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2017), uma em cada 160 crianças possui TEA no mundo, sendo que nos últimos 50 anos a prevalência deste transtorno parece estar aumentando globalmente. Mesmo que as causas sejam desconhecidas, existem algumas hipóteses para este aumento, como a melhoria e ampliação dos critérios de diagnóstico, o maior conhecimento e conscientização dos pais (KOGAN et al., 2018) e aumento de fatores de risco como idade parental avançada e partos prematuros (LYALL et al., 2017).

No Brasil, estudos epidemiológicos do TEA ainda são escassos, restringindo-se apenas a teses e dissertações, e raros artigos publicados sobre prevalência do autismo no território brasileiro. Além disso, informações sobre o TEA nunca foram especuladas através do censo populacional. Por isto, foi aprovada pelo Senado Federal em julho de 2019 a Lei 13.861, que inclui especificidades inerentes ao autismo nos censos demográficos (SENADO FEDERAL, 2019). As informações coletadas a partir do censo de 2020 poderão fornecer dados sobre a prevalência de TEA no país. Apesar de não haver dados precisos sobre a prevalência do TEA no Brasil, estima-se que o número de crianças brasileiras com a doença seja semelhante ao da população mundial (OPAS, 2017).

Citado pela primeira vez em 1911 por Eugen Bleuler, o autismo vem sendo estudado desde então. Em 1943, Leo Kanner observou o autismo como característica mais marcante em 11 pacientes diagnosticados com esquizofrenia (1943). Desde os primeiros relatos de autismo até a atualidade, sua nomenclatura teve algumas modificações, utilizando-se atualmente a terminologia “Transtorno do Espectro Autista” (APA, 2014), sendo o termo “espectro” usado devido à heterogeneidade de alterações funcionais.

Crianças com TEA podem apresentar uma grande variedade de disfunções, sendo uma delas a dificuldade de refletir sobre seus pensamentos e emoções, fato que gera experiências perceptivas muito diferentes do mundo. Todas as habilidades sensoriais (paladar, toque, audição, olfato e visão) podem ser comprometidas em autistas. Apesar disto, estes sintomas são considerados aspectos secundários do TEA, segundo Robertson e Baron-Cohen (2017). A falha nestas habilidades sensoriais pode ser justificada por alterações astrocitárias que levam à diminuição de eventos sinápticos em neurônios de indivíduos autista, quando comparados aos indivíduos neuro-típicos (RUSSO et al., 2018).

A diversidade de disfunções envolvendo o TEA e seus mecanismos biológicos e fisiológicos, bem como os fatores etiológicos, são obscuros. Além das alterações sensoriais descritas anteriormente, comorbidades médicas, como a epilepsia, dor, alterações de sono, problemas gastrointestinais, que são frequentes em pessoas com TEA (RATTAZ et al., 2018).

Apesar dos mecanismos neurobiológicos não serem totalmente esclarecidos, pesquisas recentes com o objetivo de elucidar possíveis alterações biológicas no aparecimento do TEA trazem um novo olhar sobre a fisiopatologia e neurobiologia do autismo (MCPARTLAND, 2016). Atualmente, existem duas evidências robustas sobre o aparecimento do TEA, conforme estudos clínicos em humanos e pré-clínicos em modelos animais. Segundo Carlezon Jr e colegas (2019), uma delas é a interferência da inflamação pré-natal e perinatal no aparecimento de distúrbios no neurodesenvolvimento, como TEA, esquizofrenia, entre outras. A outra, refere-se à incidência de epilepsia em indivíduos com TEA, sugerindo desequilíbrio no balanço excitatório e inibitório da circuitaria neuronal (que inicia no desenvolvimento embrionário, onde neuroblastos GABAérgicos - interneurônios - das eminências ganglionares migram para o córtex, telencéfalo, hipocampo e estriado).

A inflamação pré-natal causa prejuízos à mãe e também ao feto, provocando restrição no ganho de peso fetal e aumentando o risco de aborto e morte da gestante e parto prematuro (RENAUD et al., 2011; TOYAMA et al.; 2012). O parto prematuro é uma síndrome causada por múltiplos processos patológicos, sendo que a inflamação intraamniótica afeta um em cada quatro partos prematuros, evidenciando que a inflamação tem extrema relevância nos partos

antes do tempo (HASSENDRINI et al., 2019). Estima-se que 15 milhões de crianças nascem prematuras (antes da trigésima sétima semana de gestação) em todo o mundo a cada ano. Segundo Hodyl e colegas (2017), aproximadamente 40% destas apresentam alguma alteração no neurodesenvolvimento, resultando em distúrbios psiquiátricos como esquizofrenia e TEA.

O número de crianças diagnosticadas com doenças como a esquizofrenia e TEA vem aumentando consideravelmente nos últimos anos em todo o mundo, instigando profissionais e pesquisadores a desenvolver estudos clínicos e experimentais a fim de esclarecer a relação entre inflamação pré-natal e os distúrbios psiquiátricos (TSUKADA et al., 2019).

1.3 ESTUDOS CLÍNICOS SOBRE TEA

Segundo Casanova (2007), três fatores interferem no aparecimento de distúrbios do SNC, sendo eles: predisposição genética; exposição durante período crítico do desenvolvimento; e, fatores exógenos (e.g. inflamação materna, uso de medicação, poluição e outros). Sabe-se que o desenvolvimento e o comportamento de um indivíduo não são exclusivamente determinados por fatores genéticos, mas também pelas experiências pré-concepcionais, pré-natais, perinatais e pós-natais (HISLE-GORMAN et al., 2018) A inflamação aguda ativa o sistema imune, aumentando a liberação de glicocorticoides e a produção de citocinas pró-inflamatórias (e.g. IL-1 β , IL-6 e TNF) por células do sistema imune da mãe e do feto (MEYER; YEE; FELDON, 2007).

Yan e colaboradores (2015) observaram níveis séricos de IL-6 elevados associados à fobia e restrição social, irritabilidade, hiperatividade e ansiedade em crianças com TEA. Já Capano et al. (2018) observaram desregulação imune dos fatores de transcrição relacionados às células Th1/Th2/Th17 e às células TReg, sugerindo correlação da sinalização de fator de transcrição, possibilitando o tratamento de TEA (AHMAD et al., 2017). Outra investigação observou que o risco de TEA pode estar associado à presença de anticorpos maternos anti-HSV-2-Vírus Herpes Simplex 2 (MAHIC et al., 2017).

Segundo Al-Ayadhi, Allhowikan e Halepoto (2018), TGF- β 1 é uma citocina anti-inflamatória que desempenha papel crucial no neurodesenvolvimento e no controle de respostas inflamatórias. No entanto, altas expressões desta citocinas podem agravar a inflamação no cérebro. Mesmo assim, acredita-se que TGF- β 1 tenha ação neuroprotetora e que esteja reduzida nos níveis séricos de pacientes com TEA. Ainda, após o treinamento integrativo auditivo, houve melhora na consciência social, cognição social e comunicação de crianças autistas, concomitantemente ao aumento de níveis séricos de TGF- β 1.

SUZUKI et al., (2013) observaram a ativação microglial excessiva em algumas regiões do cérebro de jovens autistas através de exames de tomografia com radiotraçador para microglia. Além dos estudos relacionando o TEA com alterações imunes, diversos trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de esclarecer a relação do equilíbrio do balanço inibitório-excitatório com o surgimento do TEA e a relação deste desequilíbrio ao funcionamento neuronal e aos sintomas sensoriais.

Interessante, foi observado uma quantidade reduzida da expressão de parvalbumina de interneurônios nas áreas de Brodmann BA9, BA46 e BA47 (áreas relacionadas à memória espacial, fluência verbal, atenção auditiva e verbal, compreensão de linguagem, aspectos cognitivos comprometidos no TEA) do cérebro em necropsia de indivíduos com TEA pós-morte. Esta redução pode comprometer o balanço excitatório/inibitório alterando as oscilações gama no córtex (SCHNEIDER; LABUZ; PRZEWLOCKI, 2001).

Alterações no córtex visual, somatossensorial e auditivo podem refletir ruptura no equilíbrio excitatório/inibitório, modular as respostas sensoriais e reduzir receptores GABA, estando sido associadas ao TEA. Papel central do GABA no córtex e também no neurodesenvolvimento indicam que a sinalização GABAérgica é fundamental para a neurobiologia do autismo. Os limiares de percepção tátil no TEA podem estar alterados, sendo que alguns estudos referem que a sensibilidade pode variar em relação aos indivíduos normais (ROBERTSON; BARON-COHEN, 2017). Schneider, Labuz e Przewlocki (2001) observaram que crianças que apresentam comportamento auto-lesivo apresentaram maiores alterações nos testes aplicados em indivíduos com dificuldades de comunicação, e que a ausência de dor parece estar relacionada ao comportamento auto-lesivo no TEA, reforçando a hipótese do autor anterior sobre alterações sensoriais no TEA.

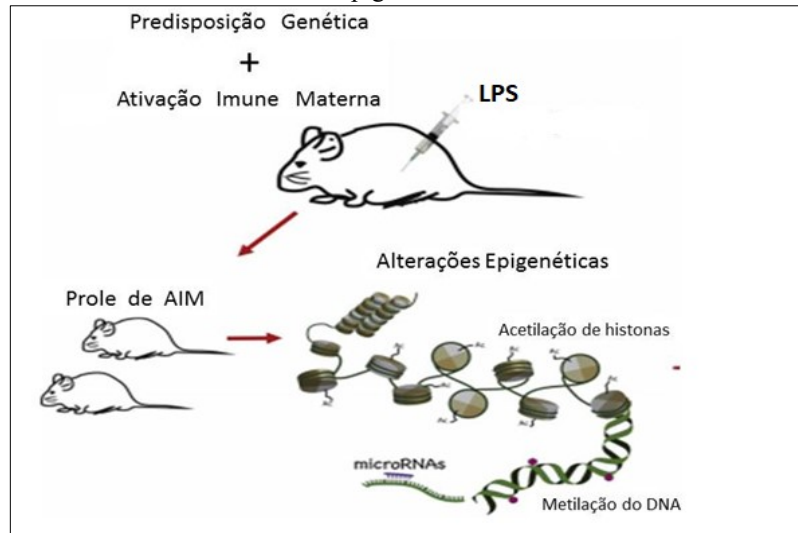
Courtemanche, Black e Reese (2016) encontraram alterações na sinalização de neurotransmissores GABAérgicos na modulação e inibição dos sistemas sensoriais relacionados com traços de autismo, havendo alteração da percepção tátil em crianças com TEA. Assim, a sinalização GABAérgica é interrompida em diferentes modelos de TEA.

1.4 ESTUDOS EXPERIMENTAIS SOBRE TEA

Estudos pré-clínicos sobre TEA têm sido desenvolvidos. Um dos modelos animais mais utilizados nestes estudos experimentais é a ativação imune materna (AIM) através de administração de lipossacarídeo (LPS) intraperitoneal em animais prenhes (MEYER; YEE; FELDON, 2007). Modelos de AIM também são utilizados na investigação dos mecanismos

envolvendo partos prematuros, interrupção de gestação espontânea e corioamnionite (FEDORKA et al., 2019; REZNIKOV et al., 1999; TRACYLUNL et al., 2018). A Figura 3 ilustra o modelo animal de AIM.

Figura 3 - Modelo de ativação imune materna estimulada com a administração de LPS, resultando em alterações epigenéticas.



Fonte: adaptado de Bergdolt e Dunaesvky (2019).

A AIM está relacionada com a elevação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no meio materno e fetal, como placenta e líquido amniótico. O que ainda é obscuro é a relação entre o aumento de citocinas no meio fetal com a elevação de citocinas nos níveis séricos maternos (RENAUD et al., 2011).

De acordo com Kaech, Bochud e Calandra (2006) citocinas são mediadores que orquestram as respostas imunes inatas ou adaptativas, sendo pequenas proteínas que estimulam a expressão umas das outras, dando origem a uma cascata de eventos moleculares e ativando os processos inflamatórios. São categorizadas em dois grupos principais que exercem atividades pró- e anti-inflamatórias.

Podem interferir das etapas do neurodesenvolvimento, incluindo diferenciação, maturação e sobrevivência celular. A elevação dos níveis de citocinas mediadas por infecção de patógenos no ambiente materno e no ambiente fetal, pode comprometer drasticamente o SNC do feto implicando em transtornos mentais ao longo da vida (MEYER; YEE; FELDON, 2007).

As citocinas pró- e anti-inflamatórias TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10, além de participar do sistema imune materno e fetal, podem ter importante papel no desenvolvimento embrionário e fetal, participando na maturação normal do feto. Apesar de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10 serem as

mais investigadas na relação com AIM, outras citocinas também participam na atividade imune e neurodesenvolvimento. Entre elas, o TGF- β 1 é uma citocina anti-inflamatória que executa muitas funções celulares, incluindo o controle do crescimento celular, proliferação celular, diferenciação celular e apoptose, atuando tanto no desenvolvimento cerebral quanto nas respostas inflamatórias e imunológicas (AL-AYADHI; ALHOWIKAN; HALEPOTO, 2018).

O sistema imunológico orchestra diferentes vias efetoras, a fim de proporcionar proteção contra invasores e moléculas nocivas. Diferentes receptores de padrões de reconhecimento expressos em células imunes reconhecem moléculas derivadas de micróbios, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e moléculas associadas a danos (DAMPs). O sistema complemento é uma parte importante da função imune, perfazendo uma cascata enzimática que consiste em mais de 50 proteínas e glicoproteínas que circulam no sangue, além de receptores ou reguladores solúveis ligados à membrana celular, que agem no combate a invasores (LEE; COULTHARD; WOODRUFF, 2019). As citocinas são produzidas por células do sistema imune como: monócitos, macrófagos, linfócitos e outros, ativadas por receptores *Toll-like 4* (TRL4) a partir da detecção do Lipossacarídeo (LPS) de bactérias Gram negativas (KAECH; BOCHUD; CALANDRA, 2006).

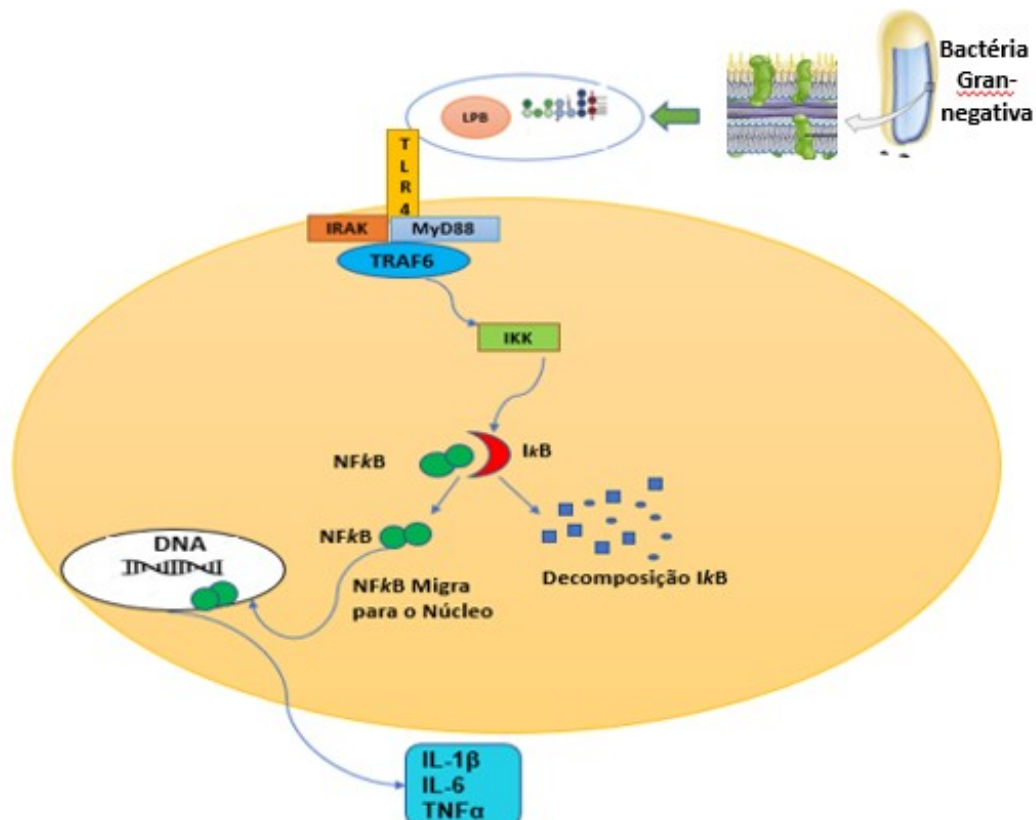
O LPS, conhecido como endotoxina, é uma molécula com alto teor de toxicidade derivada da membrana celular externa de bactérias gram-negativas. Sua liberação ocorre quando a bactéria se multiplica ou quando é fagocitada e degradada pelas células imunes. Interage com TRL4 e produz resposta inflamatória. O LPS se liga às proteínas ligantes do polissacarídeo (LBP) de seu hospedeiro, e forma-se então o complexo LPS-LPB, que em contato com receptores CD14 dos macrófagos e TLR4 ativam a produção de citocinas pró-inflamatórias interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de transcrição de necrose tumoral (TNF- α), produzindo então a resposta inflamatória (ROSADINI; KAGAN, 2017).

A ativação de citocinas nas células do sistema imune regulada por TRL-4 gera processos inflamatórios, uma cascata de eventos do sistema imune e seus órgãos, células e moléculas, que formam um complexo primoroso com a função de proteger o organismo. AIM é um caso específico de imunidade que regula a proteção contra agentes infecciosos, como vírus e bactérias, pois estes podem atingir tanto a saúde materna quanto a do embrião ou feto. Evidências demonstraram que inflamação intrauterina pode interferir no desenvolvimento do SNC do feto (TOYAMA et al., 2015; LINS et al., 2019; TSUKADA et al., 2019).

Uma questão bastante conflitante que merece ser elucidada é o fato de que citocinas no meio fetal podem encaminhar o desenvolvimento e manutenção embrionária e fetal, ao mesmo tempo que podem causar graves prejuízos ao neurodesenvolvimento fetal. Segundo Lee,

Coulthard e Woodruff (2019), durante o desenvolvimento fetal, fatores do sistema de complemento da placenta, líquido amniótico e cérebro fetal contribuem para proliferação, diferenciação, migração e poda sináptica. Porém, a desregulação deste complemento desequilibra o desenvolvimento do SNC, manifestando-se em transtornos do neurodesenvolvimento como o TEA. Partindo disto, percebe-se que o sistema imune participa ativamente do neurodesenvolvimento, mas em contrapartida seu desequilíbrio pode promover danos irreversíveis ao SNC.

Figura 4 - Reconhecimento do LPS por diferentes sensores do sistema imune inato. Os receptores Toll-like (TRL), ou TLR-4, que utilizam uma proteína acessória chamada de diferenciação mieloide-2 (MD-2) no meio intracelular que auxilia seu trajeto a superfície celular. Outras proteínas são ativadas para o reconhecimento do LPS (LBP) e CD14. O LPS se separa da membrana da bactéria gram-negativa, é capturada por LBP e transferido para o CD14, encontrado na superfície dos macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (TLR4/MD-2/CD14), onde induz a ativação da proteína adaptadora fator de diferenciação mieloide (MyD88) e moléculas adaptadoras de TRL-4 (TIR /TIRAP), levando ao recrutamento do receptor de IL-1 associado à quinase 4 (IRAK4), dissociando-se de MyD88 e liga-se ao fator de necrose tumoral 6 (TRAF6), que dissocia e recruta proteínas incluindo quinase-1 ativada por fator de crescimento I (TAK1), que se fosforila induzindo a ativação de proteína Kappa B (IKB) que se degrada estimulando o fator de transcrição nuclear Kappa B (NFkB) para o núcleo.



Fonte: adaptado de Molteni, Gemma e Rossetti (2016) e Rosadini e Kagan (2017).

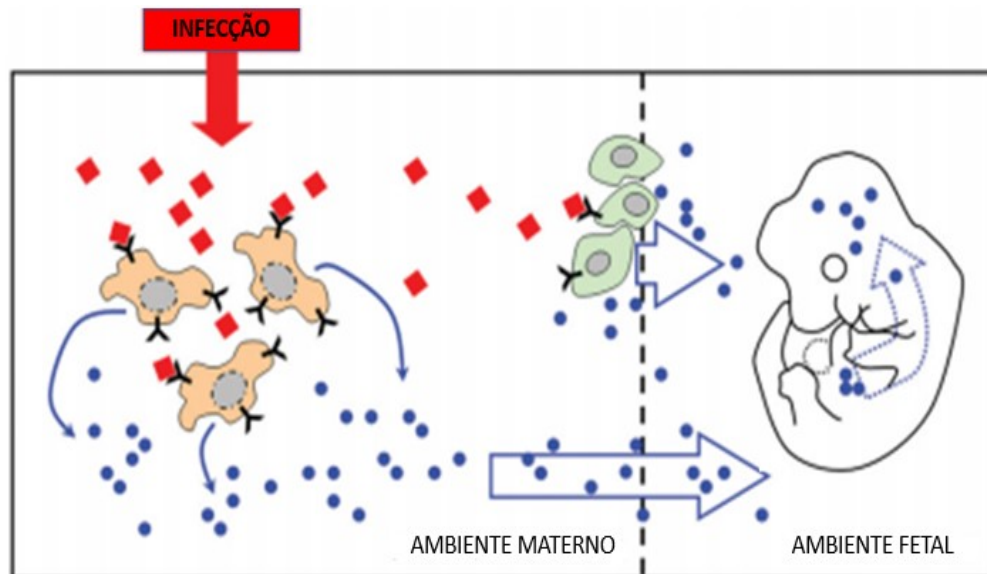
Existe uma lacuna sobre a interface do sistema imune materno-fetal, questionando sobre o compartimento que dispara as cascatas pró-inflamatórias, se é no meio materno ou fetal (RENAUD et al., 2011). Em estudo recente realizado por Tsukada et al. (2019), é reforçada a teoria de que a AIM é um fator de risco para desordens neurológicas como TEA. A sinalização de TNF- α e IL-6 no meio materno ativa a produção destas citocinas no meio fetal, mas não desconsidera a ativação direta das citocinas no meio placentário, enfatizando a necessidade de novos estudos a fim de elucidar a interface do sistema imune materno-fetal.

Outro esclarecimento necessário é quanto à alteração de resposta inflamatória ao longo da vida, após insultos inflamatórios pré-natais. Partindo disto, percebe-se que muitas dúvidas continuam sem repostas, mas o que está bem claro no modelo de inflamação pré-natal é que as citocinas envolvidas no sistema imune materno e fetal são principalmente TNF- α , IL-1-b, IL-6 e IL-10 (MOLTENI, GEMMA e ROSSETTI, 2016; ROSADINI e KAGAN, 2017)

A concentração de citocinas IL-1 no líquido amniótico normalmente é elevada durante a gestação, principalmente no terceiro trimestre (BRY; LAPPALAINEN; HALLMAN, 1996; KAECH; BOCHUD; CALANDRA, 2006). Citocinas inflamatórias podem influenciar nas etapas do neurodesenvolvimento, incluindo diferenciação, maturação e sobrevivência celular. A elevação dos níveis de citocinas mediadas por infecção no ambiente materno e no ambiente fetal, pode comprometer drasticamente o desenvolvimento normal do SNC do feto, implicando em transtornos mentais ao longo da vida (MEYER; YEE; FELDON, 2007).

O feto e a placenta montam uma resposta ativa a insultos infecciosos, ativando várias citocinas, levando ao influxo de neutrófilos e macrófagos na cavidade amniótica. À medida que a resposta cruzada entre o sistema imunológico materno e fetal progride, desenvolve-se a resposta imunológica, que pode provocar consequências adversas para o feto (FEDORKA et al., 2019). A figura 5 ilustra a resposta inflamatória durante a gravidez, demonstrando a invasão de patógenos maternos no meio fetal.

Figura 5 - Resposta imune e liberação de citocinas durante a gravidez. Patógenos (diamantes) invadindo o hospedeiro materno são reconhecidos por células imunitárias materna (laranja) através da ligação com receptores TRL4. Produção e liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias (pontos azuis) no ambiente materno. Muitos receptores são expressos por células materna (linha tracejada), incluindo trofoblastos e células epiteliais uterinas (verde). Essas células podem montar respostas sobre a infecção materna. Transferência transplacentária de citocinas e produção de citocinas no sistema materno-fetal elevando essas moléculas no ambiente fetal incluindo o cérebro fetal.



Fonte: adaptado de Meyer, Yee e Feldon (2007).

O desenvolvimento fetal é arquitetado por complexo sistema, incluindo o cordão umbilical, líquido amniótico e placenta. As membranas fetais são constituídas por duas camadas, a corion que tem contato com as células maternas e a membrana amniótica que é a camada interior da placenta, e envolve completamente o embrião ou feto, delimitando a cavidade amniótica preenchida com o líquido amniótico (NAMEDE et al., 2012).

A placenta estabelece uma interface entre mãe e feto desempenhando funções cruciais ao longo de toda a gestação. Sintetiza e secreta vários hormônios e moléculas reguladoras que atuam como barreira imunológica entre mãe e feto, barreira hematoencefálica (BHE) e a barreira placentária (BP) atuam concomitantemente para isolar o cérebro fetal de microrganismos. (ZARETSKY et al., 2004; MISHRA et al., 2009). A transferência transplacentária das citocinas maternas mais a produção de citocinas na interface materno-fetal elevam essas moléculas no ambiente intrauterino atingindo o sistema nervoso central (MEYER; YEE; FELDON, 2007).

Conforme Simões e colegas (2018), existem duas maneiras do cérebro e o embrião se protegerem da invasão de patógenos, através da BHE e a BP. Estas barreiras permitem a migração de nutrientes necessários para o desenvolvimento durante a organogênese e também tem a função de proteger o SNC e o embrião contra danos causados por microrganismos nocivos (MISHRA et al., 2009).

Apesar deste orquestrado sistema de proteção do SNC e do embrião ou feto, patógenos podem infiltrar o meio intrauterino. A placenta reage fortemente à ativação imune, tanto morfológica quanto imunologicamente, sintetizando citocinas que contribuem para o dano fetal. AIM leva a produção intensa de citocinas pró-inflamatórias que atingem o

compartimento fetal, atravessando a BHE. Citocinas atingem o cérebro fetal por diferentes vias, uma parte advinda da mãe produzida no útero e placenta por meio de infecção intrauterina e, outra, pela imaturidade BHE fetal, tendo em vista que a BHE do feto é mais frágil e imatura, permitindo o acesso das citocinas no cérebro fetal com facilidade (ZARETSKY et al, 2004).

De acordo com Harvey e Boksa (2014), o sistema neuroimune tem grande papel na patogênese de diferentes desordens do SNC. O neurodesenvolvimento é bastante suscetível a insultos ambientais. Dados epidemiológicos sugerem que a infecção durante a gestação aumenta o risco de transtornos neuropsiquiátricos na prole (BERGDOLT; DUNAEVSKY, 2019).

A administração de LPS, POLY (I:C) e ácido valpróico em roedores durante a gestação mimetizam transtornos mentais. Modelos de ativação da imunidade materna têm sido frequentemente utilizados em pesquisas experimentais de vários transtornos mentais, como: esquizofrenia, TEA, depressão e transtornos de ansiedade.

O sistema imunológico orchestra diferentes vias efetoras para garantir proteção contra invasores e moléculas nocivas, diferentes receptores de padrões de reconhecimento expressos em células imunes reconhecem moléculas derivadas de micróbios conhecidas como PAMPS. Em estudo anterior deste grupo de pesquisa, foi observado que camundongos submetidos a inflamação pré-natal por LPS se mostram mais ansiosos quando comparados ao grupo controle (TOYAMA et al., 2015). A prole de ratas tratadas com LPS exibiu retardo no reflexo de aversão e aquisição tardia de aprendizado, associado a déficit cognitivo e comportamental, lembrando traços de distúrbios do espectro do autismo e esquizofrenia (HARVEY; BOKSA, 2014).

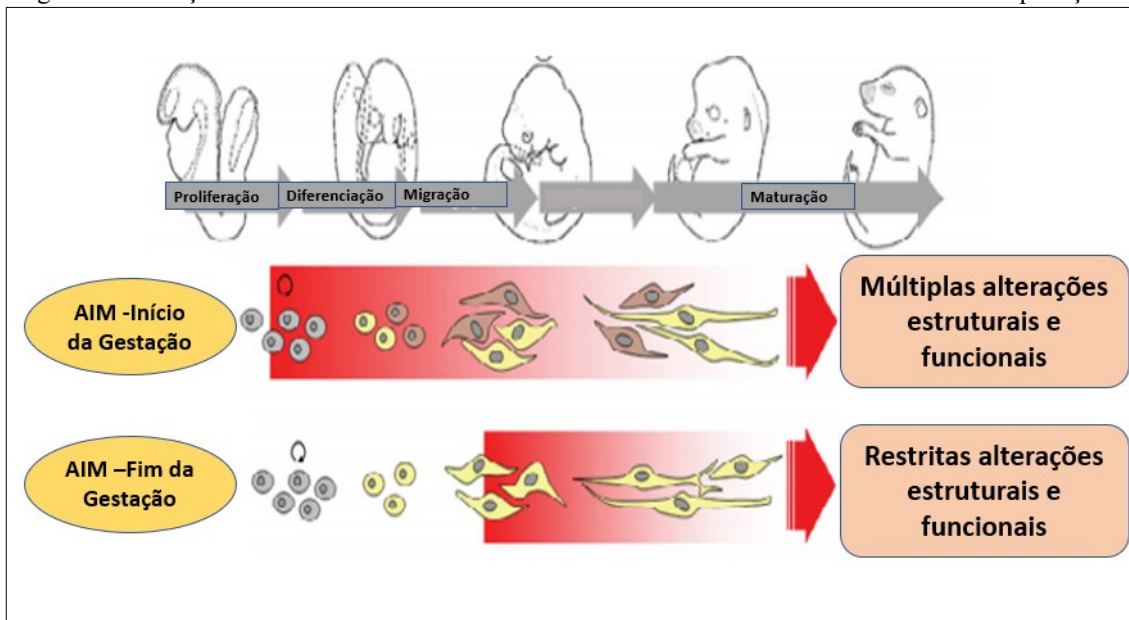
A administração de LPS no GD14 e GD16 afetou a memória e aprendizagem de sua prole, associado ao déficit de neurônios GABAérgicos (interneurônio) no hipocampo e deficiência pré-sináptica da transmissão GABAérgica na prole masculina. Também, induziu desequilíbrio GABAérgico/glutamatérgico no cérebro fetal e diminuição da atividade motora na prole adulta (NOVAIS et al., 2014). No GD9, a injeção de LPS causou diminuição do reconhecimento de odor materno e diminuição dos níveis dopaminérgicos do bulbo olfatório da prole (BATINIC et al., 2017). A inflamação materna no GD17 aumentou citocinas inflamatórias no fim da gestação sem causar inflamação hipocampal da prole, mas causou comprometimento cognitivo relacionados ao hipocampo em camundongos (WISCHHOF et al., 2015).

O neurodesenvolvimento ocorre em etapas bem estabelecidas, conforme descrito anteriormente, sendo todas imprescindíveis para maturação cerebral. Da mesma forma, os efeitos do processo inflamatório sobre o cérebro em desenvolvimento foram ressaltados. Porém,

é importante salientar que os transtornos neurológicos oriundos da AIM são variáveis, dependendo do período que ocorrer o insulto inflamatório (Figura 6, MEYER; YEE; FELDON, 2007).

Bergdolt e Dunaevsky (2019). Recentemente observaram o aumento significativo de TNF- α no líquido amniótico de roedores três horas após a injeção de LPS (150 μ /kg), porém esses níveis diminuíram após setenta e duas horas da administração de LPS. Em outros estudos LPS elevou TNF- α na placenta, causando hipóxia e diminuição de neurogênese fetal e hemorragia placentária (FEDORKA et al., 2019; TSUKADA et al., 2019) TNF- α pode estar bastante envolvido na mediação da morte fetal (RENAUD et al., 2011).

Figura 6 - Ativação imune materna em diferentes fases do desenvolvimento do SNC e suas implicações.



Fonte: Meyer, Yee e Feldon (2007).

A IL-1 β também esteve aumentada no líquido amniótico após dose única de LPS (150 μ /kg), mas diminuiu após a aplicação de 3 doses. Mesmo em gestações normais, há um aumento significativo de IL-1 β no líquido amniótico (REZNIKOV et al., 1999). Segundo Bry, Lappalainen e Hallman (1996) e Ning et al. (2008), a IL-1 no líquido amniótico normalmente está elevada durante a gestação, principalmente no terceiro trimestre. Em outros estudos, os níveis de IL-1 β aumentaram no soro materno e não no líquido amniótico (BERGDOLT; DUNAEVSKY, 2019; GAYLE et al., 2004; LASALA; ZHOU, 2007).

De forma similar, estudos anteriores amniótico também demonstraram ativação de anti-inflamatórias IL-10 e IL-6 após administração de LPS no líquido amniótico e soro materno, além de alterações comportamentais da prole adulta associados a AIM, e ativação de citocinas

TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-6. (BERGDOLT; DUNAEVSKY, 2019; GAYLE et al., 2004; LASALA; ZHOU, 2007; TOYAMA et al., 2015)

Nesse sentido, através dos estudos aqui mencionadas, evidencia-se que o desenvolvimento cerebral pode ser influenciado pela AIM. Infecções maternas, tanto bacterianas quanto virais, podem alterar de forma variada as diferentes etapas embrionárias, principalmente a migração neuronal e formação cortical, que pode culminar em transtornos mentais na infância, adolescência e vida adulta, o transtorno de espectro autista (TEA).

2 JUSTIFICATIVA

Como vimos anteriormente de acordo com a (OMS, 2017 e OPAS, 2017) o TEA é distúrbio no neurodesenvolvimento que causa déficits na comunicação e interação social, padrões repetitivos de comportamentos; e ainda alterações secundárias que envolvem os processos de percepções sensoriais. Vimos também que nas últimas décadas vêm ocorrendo uma alta prevalência de crianças diagnosticadas com TEA, apesar disto, há uma grande lacuna no esclarecimento e conhecimento em torno dos fatores etiológicos e os processos fisiológicos e moleculares envolvidos neste transtorno.

Todavia estudos evidenciam a influência da inflamação materna no surgimento de alterações do desenvolvimento do SNC, principalmente com relação aos aspectos afetivos e comportamentais. Doenças como esquizofrenia, TEA, déficit de atenção e hiperatividade, transtornos de ansiedade e humor, parecem estar associadas a agravos da inflamação ocorridos na vida intrauterina. Sabe-se que a inflamação durante a gestação aumenta o risco de desenvolvimento de TEA na prole, transtorno que apresenta grande comprometimento do comportamento social.

As alterações no desenvolvimento do SNC podem estar associadas a dois componentes: a programação genética e fatores ambientais, sendo o último preponderante ao primeiro. As malformações induzidas no período pré-natal resultam em déficits cognitivos como aprendizado e memória, distúrbios ligados ao comportamento de ansiedade e sociabilidade e alterações nas funções somestésicas. Agravos como a inflamação, exposição ao estresse, anemia materna e hipotermia, podem implicar em alterações no desenvolvimento da prole.

A AIM tem-se revelado como forte evento biológico associado ao TEA, sendo que dependendo do período gestacional, os agravos do desenvolvimento podem ser variáveis. Portanto, o objetivo desta pesquisa justifica-se pela necessidade de elucidação dos mecanismos fisiopatológicos associados à inflamação materna como fator de risco para alterações cognitivas, emocionais e, principalmente, de dificuldades sociais e alterações na percepção sensorial.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta inflamatória materna e da prole induzida por diferentes doses de LPS no período pré-natal e sua influência nos aspectos imunológicos e comportamentais de ratos *Wistar* relacionados às características de TEA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar os efeitos imunológicos (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) maternos e fetais induzidos por administração única ou múltipla de LPS nas concentrações de 15 μ g/kg e 150 μ g/kg no período gestacional GD17 ou GD15-17, respectivamente;
- ✓ Avaliar os efeitos nas habilidades cognitivas da prole de ratas *Wistar* inflamadas pela administração única ou múltipla de LPS nas concentrações de 15 μ g/kg e 150 μ g/kg no período gestacional GD17 ou GD15-17, respectivamente;
- ✓ Observar os efeitos sobre a emocionalidade na prole de ratas *Wistar* inflamadas pela administração única ou múltipla de LPS nas concentrações de 15 μ g/kg e 150 μ g/kg no período gestacional GD17 ou GD15-17, respectivamente;
- ✓ Analisar as características sociais da prole de ratas *Wistar* inflamadas pela administração única ou múltipla de LPS nas concentrações de 15 μ g/kg e 150 μ g/kg no período gestacional GD17 ou GD15-17, respectivamente;
- ✓ Investigar o comportamento somatossensorial da prole de ratas *Wistar* inflamadas pela administração única ou múltipla de LPS nas concentrações de 15 μ g/kg e 150 μ g/kg no período gestacional GD17 ou GD15-17, respectivamente;
- ✓ Correlacionar os resultados da inflamação perinatal induzida por LPS em diferentes doses com o desfecho comportamental de habilidades cognitivas, emocionais, interação social e função somatossensorial na vida adulta da prole, e relacionar sintomas de TEA em humanos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Ciências Médicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Laboratório de Bionergética e Estresse Oxidativo da (UFSC) e Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Todos os procedimentos foram realizados considerando o bem-estar dos animais, em concordância com as diretrizes internacionais e normas dos procedimentos éticos e aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC), nº 687170217.

O número de animais por experimento foi definido estatisticamente levando-se em consideração o poder do estudo e o tamanho do efeito esperado, garantindo o número mínimo necessário de animais por grupo sem comprometer os resultados. Realizou-se cálculo de poder da análise, através do software G*Power, onde o tratamento pode causar a variação da média amostral em, ao menos, 0,25 desvio padrão, com 60% de chance de identificar uma significância estatística, considerando-se experiência prévia do laboratório. Foram utilizados 449 ratos *Wistar*, sendo 176 fêmeas e 57 machos recebidos do Biotério Central para a realização do acasalamento, somados aos 216 filhotes machos e fêmeas reproduzidos no Biotério do Laboratório de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

A pesquisa foi dividida em duas etapas: na primeira, foi realizada análise dos parâmetros bioquímicos e moleculares dos efeitos imunológicos nos tecidos maternos e fetais. Nesta etapa, a gestação foi interrompida no GD17 para a coleta das amostras dos tecidos maternos e fetais. Na segunda etapa, foram observados os aspectos comportamentais da prole adulta. Neste momento, as ratas permaneceram prenhes até o nascimento dos filhotes, onde as proles permaneceram com suas respectivas mães e o desmame conduzido no GD22, concomitante à sexagem e separação dos filhotes machos e fêmeas. Após a separação por sexo, os filhotes permaneceram alocados no biotério, onde receberam os devidos cuidados até completarem sessenta dias de nascimento e ter início os testes comportamentais.

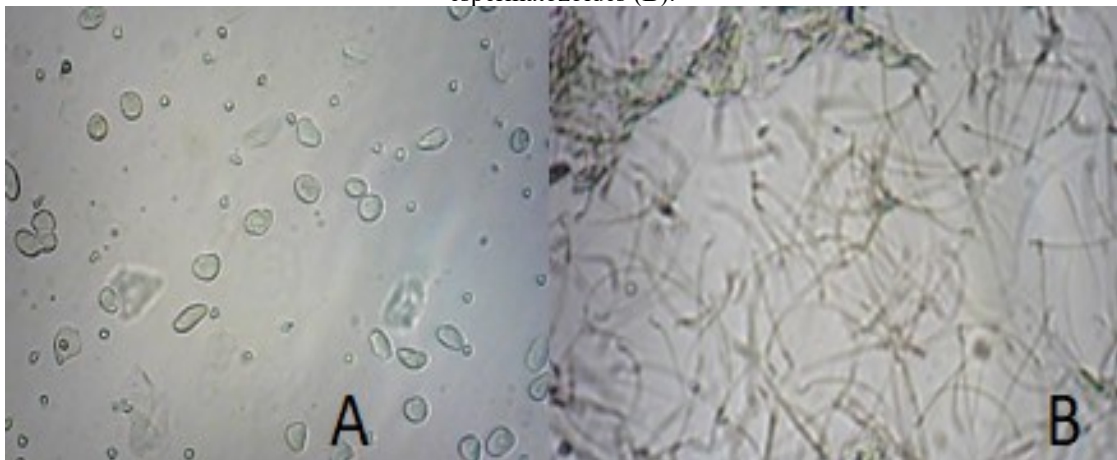
Na primeira etapa da pesquisa, foram utilizadas 95 ratas nulíparas e 31 ratos *Wistar* com 12 a 14 semanas de idade e peso corporal entre 200 a 250 g, recebidas do Biotério Central da UFSC. Os animais permaneceram abrigados em caixas de polipropileno forradas com maravalha e mantidos em temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ \text{C}$), sob o ciclo claro e escuro (luz

entre 7:00-19:00 h). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. As caixas moradias foram trocadas 3 vezes por semana por caixas limpas e maravalha nova.

Após o período de pareamento, verificou-se o peso corporal das fêmeas e o ciclo estral através de lavado vaginal para identificação do período de Estro. Em seguida, 3 fêmeas foram alocadas em uma caixa com 1 rato macho para iniciar o acasalamento. O lavado vaginal foi realizado utilizando-se uma pipeta Pasteur preenchida com aproximadamente 100 μ l de NaCl 0,9%, onde a ponta da ponteira foi leve e cuidadosamente introduzida no introito vaginal das ratas, para não estimular o cérvix uterino e não agredir a parede vaginal. Imediatamente após, foi injetado e aspirado uma gota de NaCl 0,9%, colocado posteriormente em lâmina de vidro para a visualização do ciclo estral em microscópio óptico (STUDARlab), com lente objetiva de 10X.

Na manhã seguinte ao início do acasalamento, foi realizado lavado vaginal no período matutino entre 08:00 a 10:00 h para identificação do plug copulatório ou a presença conjunta de células estrais e espermatozoides (Figura 7).

Figura 7 - Lavado vaginal de fêmeas sem a presença de espermatozoides (A) e lavado positivo contendo espermatozoides (B).



Fonte: a autora.

As fêmeas que não apresentaram plug positivo retornaram à caixa juntamente com o rato macho, onde foram submetidas ao lavado vaginal durante 4 dias no período matutino entre 08:00 e 10:00h, até a detecção de prenhes. Nos casos em que nenhuma fêmea da mesma caixa apresentou plug positivo, o macho foi substituído por outro animal e os lavados continuaram por mais quatro dias ou até a presença do plug positivo. As ratas que apresentaram o plug copulatório foram retiradas da caixa com o macho e colocadas em nova caixa com mais duas fêmeas supostamente prenhes, sendo submetidas durante quatro dias, ao lavado vaginal para verificar a permanência no diestro, período onde as concentrações séricas de estradiol

continuam baixas, havendo na secreção vaginal predominância de leucócitos e ausência de células estrais. Setenta e quatro por cento das ratas foram consideradas prenhes e permaneceram juntas até o décimo sétimo dia gestacional (GD17), sendo pesadas semanalmente durante este período e tendo acesso livre à água e ração.

4.2 DROGAS

O lipossacarídeo (LPS) derivado da *E. coli* sorotipo 0111:B4, número L-2630 (Sigma, St. Louis, MO), foi recebido em forma de pó liofilizado, diluído em solução salina, sonificado (Jeken Modelo PS-08A 1.3L) por 1 minuto e congelado em freezer à -18°C em alíquotas nas doses de 15 e 150 µg/kg. A solução salina foi empregada tanto para diluir o LPS como para o tratamento dos grupos controle, sendo constituída de solução aquosa de NaCl estéril a 0,9% e administrada via intraperitoneal (i.p.) com volume equivalente ao da solução de LPS (1 µl para cada grama do peso do animal). As alíquotas de LPS foram descongeladas e sonificadas por 1 minuto antes das injeções. Para cada dose, grupos foram categorizados conforme protocolo de tratamento, recebendo uma única dose (GD17) ou repetidas doses, com o mesmo volume, em três dias consecutivos (GD15-17).

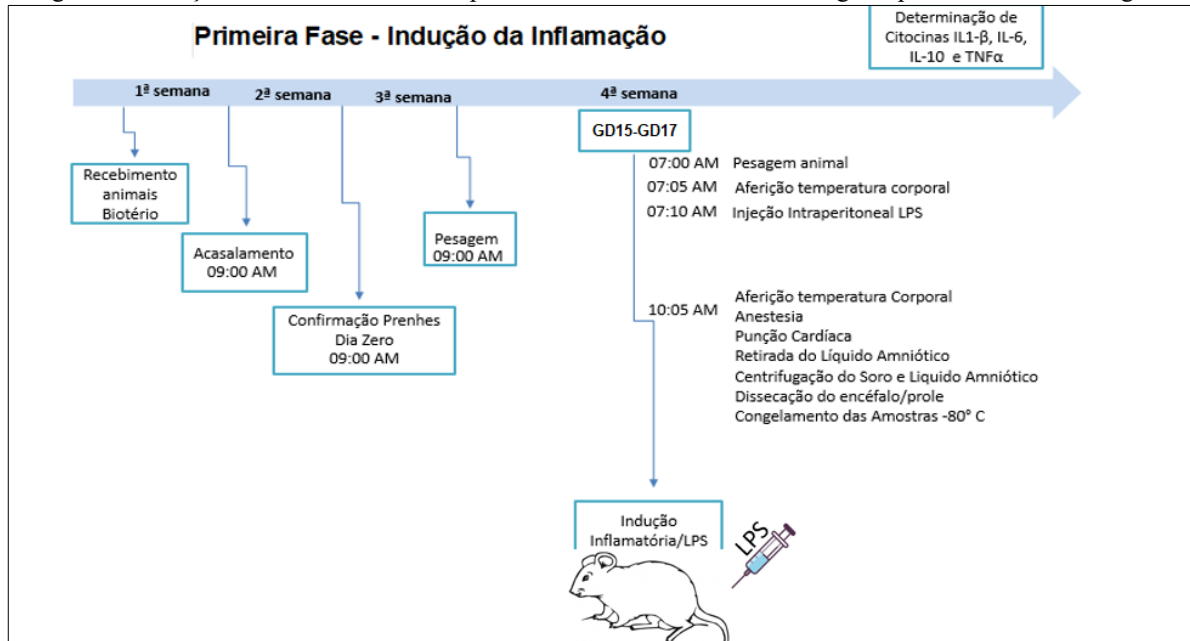
4.3 ANÁLISE IMUNOLÓGICA

A linha do tempo da primeira etapa da pesquisa é observada abaixo, onde as amostras de sangue materno, líquido amniótico e tecidos encefálicos dos fetos foram coletadas para posterior análise das citocinas TNF- α , IL-1- β , IL-6 e IL-10.

Nesta etapa do estudo, as ratas prenhes foram divididas randomicamente nos seguintes grupos: Grupo 1 (Controle 1), que recebeu injeção única de NaCl 0,9% (GD17); Grupos 2 e 3, submetidos à injeção de LPS (15 ou 150 µg/kg) em dose única, respectivamente; Grupo 4 (Controle 2), submetido a três doses de NaCl 0,9% durante 3 dias consecutivos (GD15-17); grupos 5 e 6, receberam três injeções consecutivas de LPS (15 ou 150 µg/kg) durante 3 dias consecutivos (GD15-17), respectivamente.

Experimentos iniciaram às 07:00 h, sendo as ratas prenhes randomicamente divididas em grupos, pesadas para a determinação correta do volume a ser administrado, seguido pela aferição da temperatura corporal com termômetro infravermelho antes e após a injeção de LPS.

Figura 8 - Indução inflamatória nas ratas prenhes e coleta de amostras biológicas para análise imunológica.



Fonte: a autora.

Após 3 horas da administração das soluções, a temperatura corporal dos animais foi novamente aferida, sendo estes anestesiados com overdose de quetamina (150 mg/kg/i.p.) e xilazina (20 mg/kg/i.p.), para a realização da punção cardíaca, coleta do líquido amniótico e tecidos encefálicos dos embriões. Ato contínuo, foram submetidos à toracotomia *in vivo* para extração de 1 ml de sangue, centrifugado logo após a 3000 rpm por 5 minutos para obtenção do soro. Aproximadamente 1 ml de líquido amniótico foi coletado, extraído dos sacos gestacionais por sucção com uma agulha de insulina e centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos.

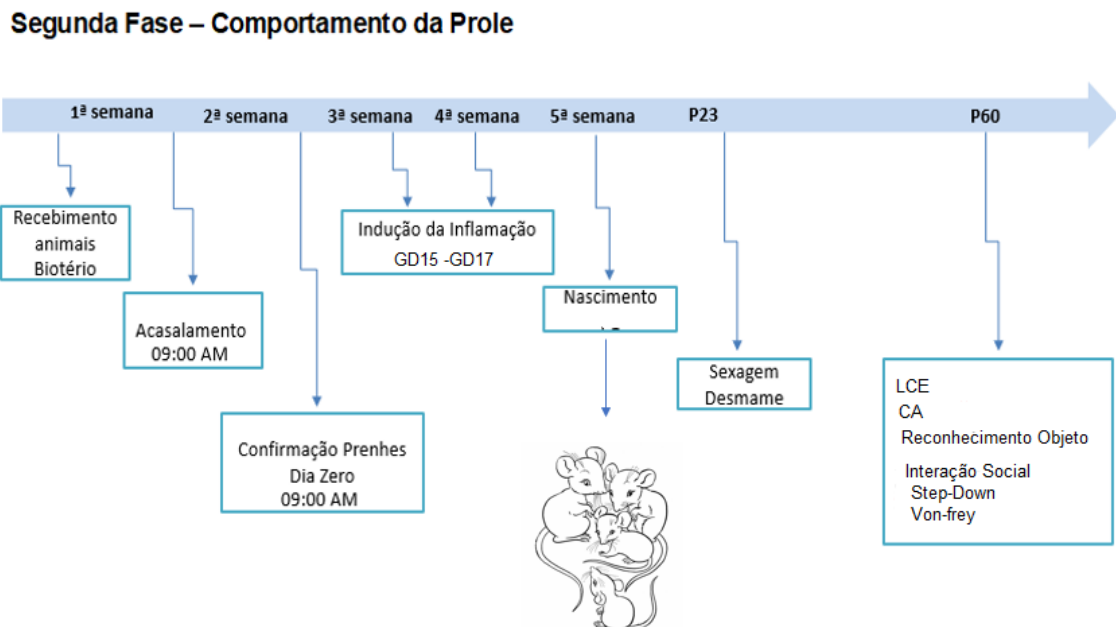
Para a análise dos marcadores inflamatórios, foi realizado um *pool* do soro materno e líquido amniótico após centrifugação. As amostras extraídas foram estocadas em freezer a -80°C até a análise. O soro e o fluido amniótico foram utilizados para a detecção dos marcadores de IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α. Os níveis das citocinas foram mensurados através do ensaio de ELISA em triplicata, com a utilização de *DuoSet® Kits* (R&DSYSTEMS).

Os embriões foram retirados dos sacos gestacionais, decapitados com tesoura cirúrgica, os encéfalos foram dissecados para a coleta do tecido cortical com pinças e tesouras para microcirurgias. A dissecação foi realizada com auxílio de uma lupa para aumentar o campo visual das estruturas teciduais retiradas que foram imediatamente congelados em nitrogênio e posteriormente armazenados em freezer -80°C.

4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Na segunda etapa do trabalho, foram realizados testes comportamentais e bioquímicos na prole adulta. Oitenta ratas e vinte e seis ratos *Wistar* foram colocados para acasalar seguindo os mesmos procedimentos da primeira etapa deste estudo. Após a confirmação da prenhez, as ratas foram divididas aleatoriamente em grupos (conforme descrito anteriormente) e induzidas à inflamação através da injeção de LPS nas doses de 15 ou 150 µg/kg, em dose única ou repetida em três dias consecutivos. Para cada grupo experimental de LPS utilizou-se um grupo controle tratado com salina (a linha do tempo destes procedimentos está ilustrada na Figura 9).

Figura 9 - Linha do tempo dos procedimentos experimentais da segunda etapa do trabalho.



Fonte: a autora.

Após o GD17, as ratas prenhes foram colocadas individualmente em caixas moradias e monitoradas diariamente até o dia do parto, que ocorreu naturalmente. O primeiro dia do filhote foi definido como dia de vida pós-natal (PND1). Neste dia, a ninhada foi pesada e depois mantida com a genitora para receber os cuidados até o PND23. Neste período, as maravalhas foram trocadas apenas uma vez por semana, para evitar o estresse da rata e possível interrupção do aleitamento. Após 23 dias de nascimento da prole, foi realizada a sexagem através da diferença visual da distância ano-genital (maior nos machos que nas fêmeas). Neste momento, também foi realizado o desmame e os filhotes machos foram separados das fêmeas,

permanecendo agrupados com seus respectivos irmãos em caixas-moradia (5 filhotes por caixa).

Os animais permaneceram recebendo cuidados em todos os procedimentos, sendo as maravalhas das caixas trocadas 3 vezes por semana. Os animais receberam água e ração em livre demanda. Após 60 dias do nascimento da prole (PND60), quando estes entraram na fase adulta, iniciou-se os procedimentos para os testes comportamentais nos animais machos e fêmeas.

Foram utilizados 216 filhotes, submetidos aos seguintes testes: labirinto em cruz elevado, campo aberto, esquiiva inibitória, reconhecimento de objetos, interação social e teste de von Frey. Foram utilizados 18 filhotes de cada grupo experimental, sendo que 9 fêmeas e 9 machos submeteram-se aos testes do labirinto em cruz elevado, campo aberto, esquiiva inibitória e von Frey. Outros 9 filhotes fêmeas e 9 machos, de cada grupo, foram submetidos aos testes de interação social, reconhecimento de objetos e von Frey. Os experimentos foram realizados na ordem em que foram descritos, sendo, portanto, o teste de von Frey o último realizado.

Após a realização de todos os testes comportamentais, os animais foram anestesiados para a coleta de sangue e tecidos e posterior quantificação de citocinas, conforme mencionado anteriormente.

4.4.1 Sala de comportamento

Os experimentos comportamentais foram realizados na sala de comportamento do Laboratório de Pós-Graduação em Ciências Médicas, onde a temperatura e luminosidade foram controladas, na fase clara do ciclo claro-escuro dos animais. O ambiente possui uma antessala separada da sala de realização dos testes comportamentais, para ambientação e manipulação dos animais.

4.4.2 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto de cruz elevada (LCE) é um instrumento validado e bastante confiável nas pesquisas sobre ansiedade, que permite estudo de drogas ansiolíticas e ansiogênicas, bem como os mecanismos envolvidos na ansiedade (HALLER; ALICKI, 2012). Neste trabalho o LCE, foi empregado para a investigação dos efeitos do processo inflamatório induzidos por LPS sobre os aspectos comportamentais relacionados a ansiedade da prole adulta inflamada no período préé-natal.

O LCE é confeccionado em madeira na cor cinza, em forma de cruz, constituído por dois braços abertos opostos um ao outro (com 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, elevados 40 cm do chão) e dois braços fechados por paredes elevadas, opostos um ao outro com medidas iguais. No centro, uma plataforma de 10 cm² conecta os 4 braços. Presume-se que os braços abertos e elevados provoquem aversão inata (não condicionada) aos animais, levando a uma preferência pela exploração e permanência nos braços fechados. Este comportamento de evitação corresponde a um comportamento defensivo em resposta às condições aversivas dos braços abertos (ambiente mais claro, aberto e elevado, em relação aos braços fechados), razão pela qual o teste é sensível à investigação de fármacos ansiolíticos (Figura 10).

Figura 10 - Labirinto em cruz elevado.



Fonte: a autora.

No presente estudo, após completar 60 dias de vida, os animais foram colocados individualmente na plataforma central do aparato, com a cabeça voltada para um dos braços fechados, para exploração livre por 5 minutos (PELLOW et al., 1985). O comportamento foi monitorado por meio de sistema de vídeo, sendo posteriormente contabilizadas as variáveis espaço-temporais: tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos e fechados. Os resultados foram avaliados por meio do software ANYMAZE® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). O aparato foi higienizado com álcool 10% previamente ao teste de cada animal.

4.4.3 Teste do campo aberto (CA)

O teste foi utilizado com o intuito de avaliar emocionalidade e perfil locomotor dos animais adultos submetidos a inflamação por LPS no período pré-natal (distância percorrida e número de cruzamentos) seguindo o modelo estabelecido por Hall (1934). O aparato consiste numa arena com dimensões de 1 m², fechada por paredes de 40 cm de altura e confeccionada

em madeira, pintada com tinta acrílica automotiva cinza, a fim de contrastar com a cor do animal. O teste do CA foi realizado em seguida ao teste de LCE. No início do experimento, o animal foi colocado no canto inferior esquerdo do aparato e seu comportamento registrado através de sistema de vídeo-monitoramento por 5 minutos. As gravações foram avaliadas por meio do software ANYMAZE® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). Para a análise da locomoção o aparato foi dividido em 16 quadrados e computado a distância percorrida e número de quadrantes cruzados. Entre um animal e outro, o aparato foi limpo com solução de álcool 10% (Figura 11).

Figura 11 - Teste do campo aberto.



Fonte: a autora.

4.4.4 Teste da esquiva inibitória (*step down*)

O aparato consiste de uma caixa de acrílico com base metálica (EP - 104 INSIGHT), contendo uma plataforma onde o rato é inicialmente alocado, havendo disponibilidade para descer da plataforma para um gradil rebaixado. A caixa é conectada a um sistema elétrico que estimula carga elétrica à grade. O teste é utilizado para observar evocação de memória aversiva e aprendizado dos animais (IZQUIERDO et al., 1998). O animal aprende a relacionar a descida da plataforma com um leve choque aplicado nas patas. Com isso, numa segunda exposição à caixa, ele evita o comportamento inato de descer da plataforma para explorar a caixa.

No presente estudo, este teste foi empregado para investigar os efeitos da inflamação pré-natal nos aspectos cognitivos com relação a memória aversiva na prole adulta. Os animais

foram colocados sobre a plataforma, sendo o tempo de permanência cronometrado. Imediatamente após o animal colocar as quatro patas na grade, é aplicado um choque elétrico de 0,7 mA durante 2 segundos. Os animais foram recolocados duas vezes. A primeira, 90 min após a primeira exposição e, a segunda, 24 h após. Nas duas reexposições foi cronometrado a permanência do animal testado na plataforma. A caixa de acrílico foi higienizada com álcool 10% a cada animal testado (Figura 12).

Figura 12 - Teste de esquiva inibitória (*step down*).



Fonte: a autora.

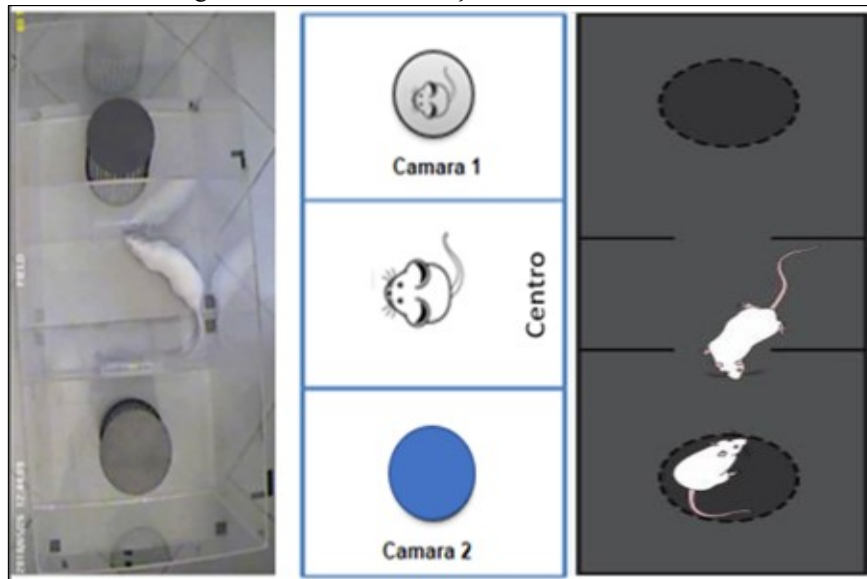
4.4.5 Teste de interação social (3 câmaras)

Este teste permite a avaliação de dois aspectos do comportamento social: a sociabilidade e a memória social e de novidade (YANG; SILVERMAN; CRAWLEY, 2011). Para a realização destes testes, foi utilizado um aparato de acrílico, divididos em três compartimentos iguais, com abertura de acesso aos três compartimentos. A sociabilidade é avaliada pela preferência que o animal tem de permanecer com um novo animal, em detrimento de um objeto. A preferência pela novidade social é medida pela preferência que o animal testado apresenta por um novo animal do que um animal familiar (Figura 13).

Para analisar a sociabilidade, o animal foi colocado no centro da câmara do meio, que permaneceu fechada durante 5 minutos para a ambientação e exploração. Após este período, foi colocado um animal desconhecido em uma gaiola na câmara 1 e liberado o acesso às duas câmaras, permitindo a livre locomoção entre o aparato durante 10 minutos. As gaiolas dos animais foram produzidas com grades finas, permitindo a exploração dos animais entre as grades.

Os experimentos foram registrados através de sistema de vídeo-monitoramento. A caixa de três câmaras e as gaiolas foram higienizadas com álcool 10% a cada novo animal testado. O número de entradas, tempo de permanência nas câmaras e tempo gasto pelo animal testado para explorar o animal desconhecido e o objeto foram quantificados através da observação dos vídeos gravados.

Figura 13 - Teste de interação social de 3 câmaras.



Fonte: a autora.

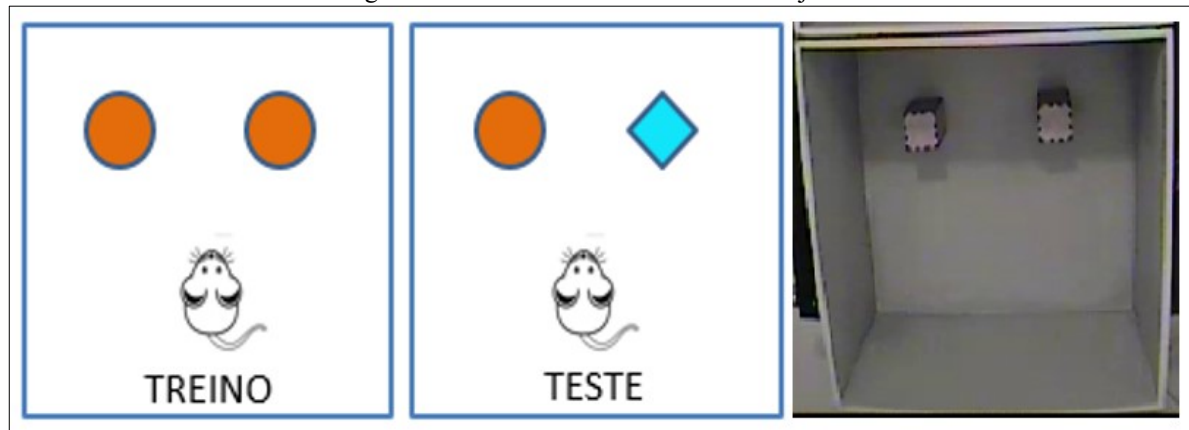
4.4.6 Teste de reconhecimento de objetos

O reconhecimento de objetos foi utilizado para avaliar os efeitos do processo inflamatório induzido por LPS sobre a memória de longa duração de ratos e ratas Wistar nascidos de mães inflamadas durante o período gestacional. Este teste foi conduzido em um campo aberto de madeira (50 x 50 x 50 cm), em uma sala iluminada por lâmpada branca (30 lux) e poucas pistas no ambiente. Os objetos apresentados tinham diferentes cores e formatos, mas dimensões similares. Cada objeto foi aderido ao piso da arena com fita adesiva, sendo posicionado a 10 cm das paredes do aparato e 20 cm do outro objeto. As posições dos objetos foram alternadas em cada sessão. O protocolo experimental do teste de reconhecimento de objetos consistiu em três fases distintas: habituação, treinamento e teste. Previamente ao teste, todos os animais foram ambientados à arena através de livre exploração por 30 min, sem a presença de objetos durante três dias. No dia seguinte (treino), todos os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) durante 10 min. Vinte e quatro horas depois (teste), ratos foram

expostos por 10 min no campo aberto a um dos objetos apresentados previamente durante a fase de treino (objeto A ou B) com a substituição por um novo objeto (objeto C).

O tempo gasto pelos animais explorando cada objeto foi registrado por um sistema de vídeo e posteriormente analisado. A exploração do objeto foi definida a partir do direcionamento do nariz do rato ao objeto a uma distância igual ou inferior a 2 cm e/ou ao tocar o objeto com o nariz e/ou patas. O tempo gasto explorando cada objeto foi expresso (em segundos) como porcentagem da exploração total (ROSSATO et al., 2007). O aparato foi limpo com solução etanol 10% entre as sessões (Figura 14).

Figura 14 - Teste de reconhecimento de objetos.



Fonte: a autora.

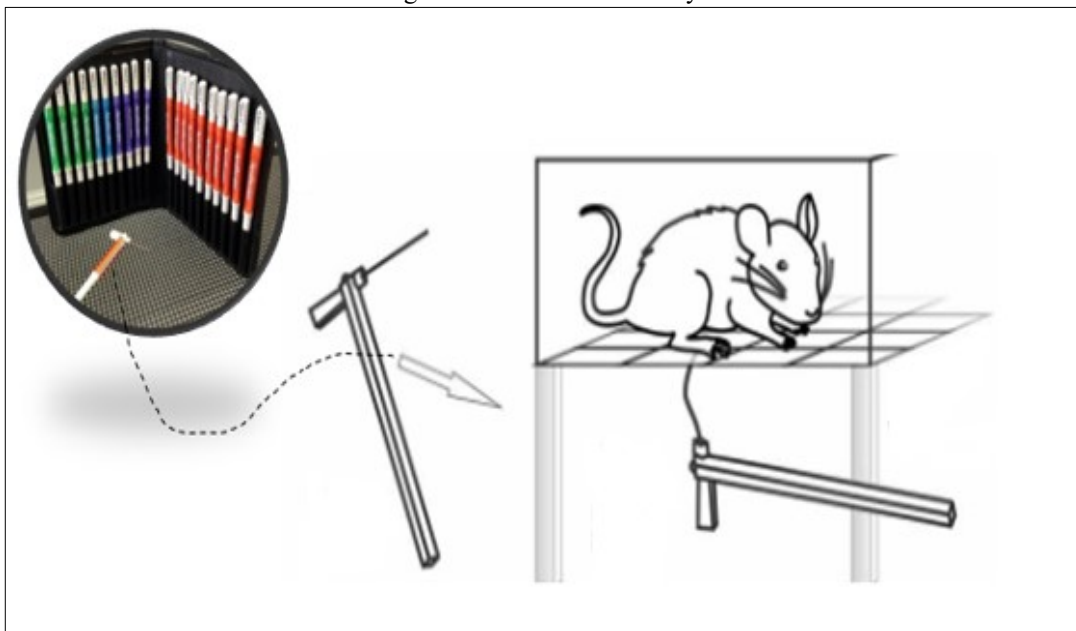
4.4.7 Teste de von Frey

Modelos animais são rotineiramente utilizados para o estudo dos mecanismos da dor, embora a dor não possa ser medida diretamente nos animais. Por isso, são utilizados métodos que quantificam comportamentos referentes à dor. Nesse sentido, o teste de von Frey é amplamente empregado como método capaz de avaliar alodinia mecânica em roedores. Apesar de existirem testes eletrônicos, a execução manual do teste continua sendo padrão-ouro para a determinação dos limiares mecânicos em ratos e camundongos (DEUIS et al., 2017). Nesta pesquisa, foi realizado o método manual, onde os animais foram colocados em caixas de acrílico individuais, com o assoalho penetrável, constituído de rede de arame de aço com pequenos orifícios e permitindo a estimulação na pata dos animais com os filamentos. O teste teve início 15 min após a colocação dos animais nas caixas do experimento, para que estes pudessem se ambientar.

Os filamentos foram aplicados perpendicularmente à superfície plantar da pata posterior direita. Como os filamentos são flexíveis, foi considerado estímulo o momento em

que estes se curvaram. A resposta positiva ao estímulo pode ser percebida através da reação do animal, como a retirada, lambedura ou agitação da pata durante ou imediatamente após a aplicação dos filamentos. Os estímulos foram realizados de forma crescente com filamentos de gramatura entre 0,4 a 15. Os estímulos foram repetidos 10 vezes sem resposta positiva, sendo substituídos gradualmente por uma gramatura maior. Foi considerada resposta positiva o momento em que o animal testado reage de alguma forma a seis estímulos. Neste momento, o teste foi finalizado. A cada novo animal testado, as caixas de acrílico foram higienizadas com álcool 10%. A urina eliminada pelo animal durante o teste foi coletada e congelada para análise bioquímica (Figura 15).

Figura 15 - Teste de von Frey.



Fonte: a autora.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os valores são expressos como média \pm E.P.M. ou mediana \pm intervalo interquartil. Dados paramétricos foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias, tendo “duração do tratamento” e “tratamento” como fatores, seguidos pelo teste pos hoc de Student Newman-Keuls para múltiplas comparações quando apropriado. Dados não-paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste pos hoc de Dunn quando apropriado. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os testes foram conduzidos usando o programa Statistica® (StaSoft Inc., Tulsa, USA), versão 8,0 e gráficos confeccionados no programa GraphPad Prism®, versão 5,0.

5. RESULTADOS

Como relatado previamente, o TEA compreende uma condição heterogênea que pode comprometer diferentes funções do indivíduo, como: aspectos cognitivos, emocionalidade, sociabilidade e percepção sensorial. Portanto, avaliou-se esses aspectos através de diferentes testes cujo os resultados estão divididos em categorias, de acordo com cada parâmetro avaliado.

5.1 PARÂMETROS DEMOGRÁFICOS, FISIOLÓGICOS E NÍVEIS DE CITOCINAS DOSADAS EM RATAS PRENHES SUBMETIDAS À INFLAMAÇÃO E NA PROLE ADULTA

Inicialmente, são apresentados os dados demográficos e fisiológicos relacionados aos efeitos inflamatórios de AIM induzidos por diferentes doses de LPS, administrado uma única vez ou 3 vezes consecutivas. Foram observados os seguintes parâmetros após indução do processo inflamatório: temperatura corporal, ganho de peso materno gestacional, número de filhotes nascidos vivos e óbito materno, além da quantificação de citocinas encontradas no soro materno, líquido amniótico e no soro da prole adulta.

Conforme observado na Tabela 1, apenas o fator “tratamento” mostrou-se significante [F(2,87)=6,04, $p<0,005$], não havendo diferenças estatísticas na comparação múltipla entre os grupos, apesar de uma tendência no efeito hipotérmico causado por uma única injeção de LPS (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) em relação ao grupo controle ($p=0,06$). Quanto ao ganho de peso materno durante o período gestacional (em E17, conforme tratamento), o fator “tratamento” mostra-se alterado [F(2,77)=21,81, $p<0,00001$], com diminuição do ganho de peso materno causado pela injeção única ($p<0,005$) ou múltipla ($p=0,001$) da maior dose de LPS (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) em relação aos respectivos grupos controle. De forma similar, a dose maior de LPS usada uma única vez ($p<0,005$) ou em 3 vezes consecutivas ($p=0,001$) diminuiu significativamente o número de filhotes nascidos vivos em relação às ratas tratadas com salina [tratamento: F(2,87)=17,74, $p<0,00001$].

Tabela 1 - Efeitos do processo inflamatório induzido por LPS sobre parâmetros fisiológicos e demográficos de ratas prenhes.

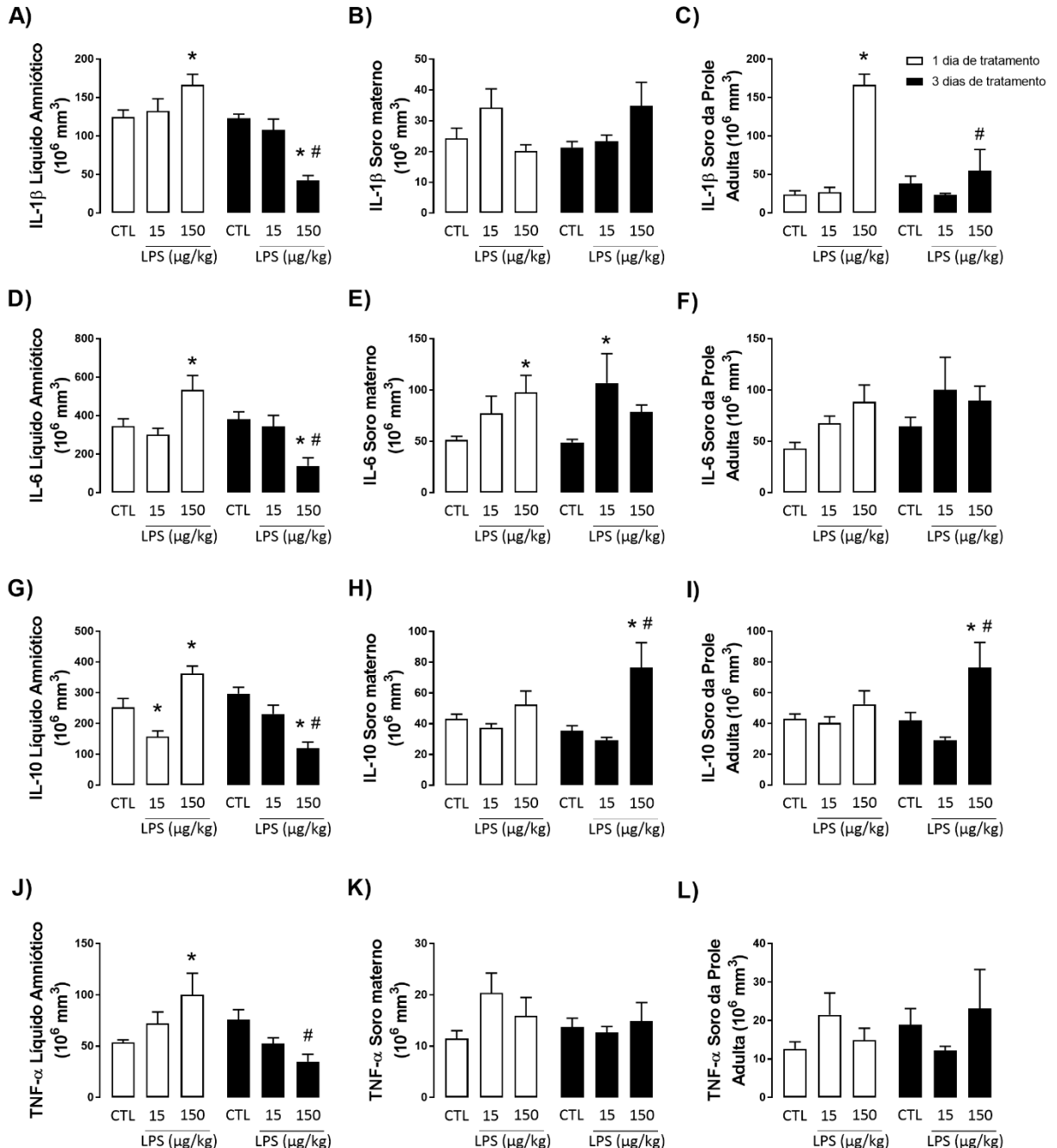
Duração do tratamento	Tratamento (µg/kg)	Parâmetros gestacionais (média ± E.P.M.)						
		Temperatura corporal (°C)	N	Ganho de peso materno (g)	N	Filhotes nascidos vivos	N	Óbitos maternos (%)
1 dia	Controle	35,61 (0,13)	17	111,82 (5,01)	17	9,75 (1,01)	16	0
	LPS 15	35,68 (0,24)	6	99,45 (5,34)	11	7,3 (0,83)	18	5,55
	LPS 150	35,14 (0,15)†	19	82,18 (5,08)*	17	5 (1,23)*	17	11,11
3 dias	Controle	35,26 (0,07)	19	114,19 (4,71)	16	9,87 (1,13)	15	0
	LPS 15	35,65 (0,11)	15	108,67 (7,30)	6	7,29 (1,30)	7	0
	LPS 150	35,25 (0,08)	17	81,56 (4,69)*	16	2,65 (0,87)*	20	23,07

Valores são representados como média ± E.P.M. e analisados por ANOVA de duas vias (“duração do tratamento” e “tratamento” como fatores) seguido pelo teste pos-hoc de Newman Keuls quando necessário. *p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle (tratado com salina). †p=0,06 em relação ao respectivo grupo controle (tratado com salina). “N”, número de ratos avaliados conforme parâmetro.

O processo inflamatório induzido por LPS foi investigado a partir da quantificação das citocinas presentes no soro materno, líquido amniótico das ratas prenhes e soro da prole quando adulta. Conforme observado na Figura 16, ANOVA de duas vias revelou diferenças significantes nos fatores “dias de tratamento” [$F(1,42)=30,38, p<0,00001$] e interação entre este fator e “tratamento” [$F(2,42)=17,68, p<0,00001$] na mensuração de IL-1 β no líquido amniótico. De acordo com a comparação pos-hoc, a injeção única de LPS (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) aumentou os níveis de IL-1 β comparado ao grupo salina ($p<0,05$). No entanto, LPS (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) administrado em 3 dias consecutivos diminuiu significativamente os níveis desta citocina em relação aos animais controle ($p=0,0001$) e também quando comparados com a mesma dose administrada apenas uma vez ($p=0,0001$). A mensuração de IL-1 β no soro materno (Figura 16B) mostrou-se significativamente diferente na interação entre os fatores “tratamento” e “dias de tratamento” [$F(2,39)=4,26, p<0,05$], sem diferenças na comparação entre os grupos. Quando dosado no soro da prole adulta, IL-1 β alterou os fatores “tratamento” [$F(2,45)=29,38, p<0,00001$], “duração do tratamento” [$F(1,45)=12,01, p<0,01$] e interação entre estes [$F(2,45)=16,03, p=0,00001$]. Na comparação pos-hoc, a injeção única de LPS (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) aumentou os níveis de IL-1 β comparado ao grupo salina ($p<0,0001$). A mesma dose administrada três vezes não causou o mesmo efeito, sendo significativamente menor em relação à aplicação única ($p=0,0001$, Figura 16C).

Os níveis de IL-6 no líquido amniótico (Figura 16D) alteraram os fatores “dias de tratamento” [$F(1,45)=6,90, p<0,05$] e interação entre este fator e “tratamento” [$F(2,45)=12,04, p<0,0001$], conforme ANOVA de duas vias. O teste pos-hoc mostrou o aumento nos níveis de IL-6 após a injeção única de LPS (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) comparado ao grupo controle ($p<0,05$). O tratamento consecutivo com LPS (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) diminuiu os níveis de IL-6 no líquido amniótico em relação ao grupo controle ($p<0,01$) e quando comparado à mesma dose administrada uma única vez ($p<0,001$). ANOVA de duas vias mostrou diferença estatística no fator “tratamento” na mensuração de IL-6 no soro materno [$F(2,37)=10,99, p=0,0001$]. A comparação entre grupos mostrou o aumento de IL-6 após a administração única de LPS (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) em relação aos ratos tratados com salina ($p<0,05$). As injeções múltiplas de LPS (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$) também aumentaram os níveis de IL-6 em relação ao grupo controle ($p<0,01$, Figura 16E). Quando mensurada no soro da prole, IL-6 não se mostrou modificada, apesar da alteração significativa no fator “tratamento” após ANOVA de duas vias [$F(2,46)=4,09, p<0,05$, Figura 16F).

Figura 16 - Efeitos da inflamação induzida por LPS sobre citocinas dosadas no líquido amniótico e soro materno de ratas prenhes e soro da prole quando adultos. Valores são representados como média \pm E.P.M. e analisados por ANOVA de duas vias (“dias de tratamento” e “tratamento” como fatores) seguida do teste pos-hoc Newman Keuls quando necessário. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle respectivo (tratado com salina). # $p < 0,05$ em relação à dose respectiva administrada uma única vez ($n = 4-14$ /grupo).



Fonte: a autora.

A ANOVA de duas vias mostrou mudanças significantes nos fatores “tratamento” [$p < 0,05$] e interação entre este fator e “dias de tratamento” [$F(2,50) = 20,19$, $p < 0,00001$] quando avaliados os níveis de IL-10 no líquido amniótico. Na comparação entre os grupos, quando administrado uma única vez, LPS (15 $\mu\text{g/kg}$) diminuiu ($p < 0,05$), enquanto a dose de 150 $\mu\text{g/kg}$

aumentou os níveis de IL-10 em relação ao tratamento com salina ($p=0,01$). Quando administrado por 3 dias consecutivos, LPS 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ diminuiu IL-10 no líquido amniótico em relação ao grupo controle respectivo ($p<0,001$) e quando comparado à mesma dose tratada uma única vez ($p<0,001$, Figura 16G). ANOVA de duas vias mostrou diferenças no fator “tratamento” na quantificação dos níveis de IL-10 no soro materno [$F(2,44)=8,51$, $p<0,001$]. Na comparação entre grupos, a administração múltipla de LPS 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aumentou os níveis de IL-10 no soro materno em relação ao grupo controle ($p<0,01$) e à mesma dose administrada uma vez ($p<0,05$, Figura 16H). No soro da prole, ANOVA revelou diferenças estatísticas no fator “tratamento” [$F(2,46)=6,50$, $p<0,01$], evidenciando aumento dos níveis de IL-10 após administração consecutiva de LPS 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em relação ao respectivo grupo controle e à mesma dose aplicada uma única vez (Figura 16I).

TNF- α foi quantificado no líquido amniótico. O fator “dias de tratamento” [$F(1,38)=5,62$, $p<0,05$] e interação entre este fator e “tratamento” [$F(2,38)=9,05$, $p<0,001$] mostrou diferença significativa na ANOVA de duas vias. Análise pos-hoc evidenciou aumento nos níveis de TNF- α após a injeção única de LPS 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ comparado ao grupo controle ($p<0,05$). A administração múltipla de LPS 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ diminuiu significativamente os níveis de TNF- α em relação à mesma dose administrada apenas uma vez (Figura 16J). Nenhuma alteração foi observada nos níveis de TNF- α no soro materno ou da prole quando adulta (Figura 16K-L).

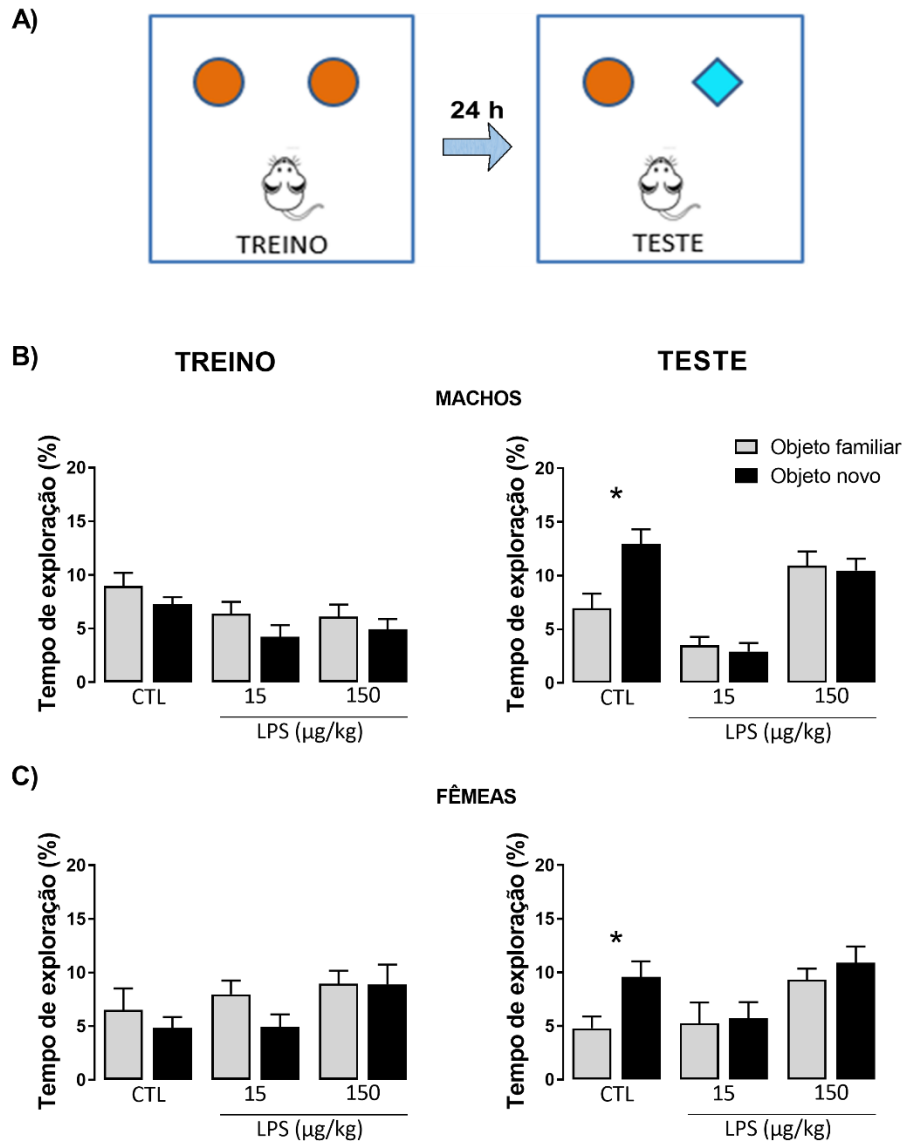
5.2 PERFIL COGNITIVO DA PROLE ADULTA DE RATAS INFLAMADAS DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL

O reconhecimento de objetos foi utilizado para avaliar os efeitos do processo inflamatório induzido por LPS sobre a memória de longa duração de ratos e ratas Wistar nascidos de mães inflamadas durante o período gestacional (Figura 17). O teste t de Student não revelou alterações significativas no tempo de exploração dos objetos A e B durante a fase de treino, indicando que todos os grupos, machos e fêmeas, exploraram de forma similar ambos os objetos (Figura 17B-C). Durante o período de teste, apenas os animais tratados com salina exploraram por maior tempo o objeto novo em relação ao objeto familiar (machos: $t=-3,16$; $p=0,005$; fêmeas: $t=-2,62$; $p<0,05$). Esses achados indicam que todos os grupos reconheceram o objeto familiar no período de teste (Figura 17B-C).

No entanto, os animais inflamados por LPS pré-natal em dose única em ambas as concentrações não foram capazes de reconhecer o objeto novo, parecendo apresentar algum

prejuízo cognitivo uma vez que ratos hígdidos preferem investigar o objeto novo. Este resultado foi encontrado tanto nos filhotes machos quanto fêmeas.

Figura 17 - Efeitos do processo inflamatório induzido por dose única de LPS sobre a performance cognitiva de ratos e ratas nascidos de mães inflamadas durante o período gestacional. (A) Linha do tempo experimental. Valores são representados como média \pm E.P.M. e analisados pelo teste t de Student durante treino e teste em ratos machos (B) e fêmeas (C). * $p < 0,05$ na comparação entre objetos familiar e novo ($n = 7-10$ /grupo).

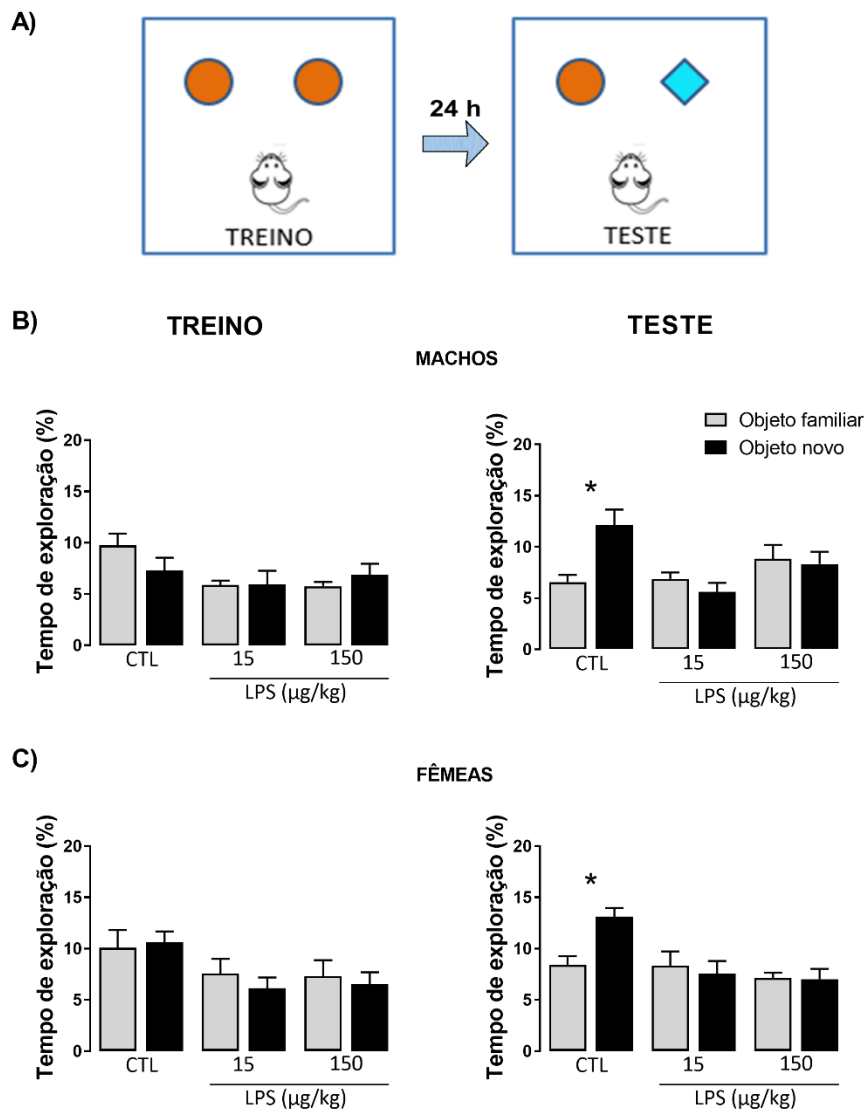


Fonte: a autora.

De forma similar, os efeitos do processo inflamatório induzido por 3 doses diárias de LPS sobre a memória da prole de mães inflamadas durante o período gestacional foram investigados (Figura 18). Conforme teste t de Student, não foram encontradas diferenças entre o tempo de exploração dos objetos A e B durante a fase de treino, indicando que todos os grupos, machos e fêmeas, exploraram de forma similar os objetos (Figura 18B-C). Apenas os animais tratados com salina exploraram mais o objeto novo em relação ao objeto familiar

durante o teste (machos: $t=-3,40$; $p<0,005$; fêmeas: $t=-3,00$; $p<0,005$, Figura 18B-C). Todos os grupos reconheceram o objeto familiar no período de teste. Animais submetidos a três doses de LPS no período pré-natal nas diferentes concentrações, também não foram capazes de reconhecer o objeto novo, indicando que a AIM pode interferir no desenvolvimento cognitivo da prole, tanto nos filhotes machos quanto nas fêmeas.

Figura 18 - Efeitos do processo inflamatório induzido por 3 doses consecutivas de LPS sobre a performance cognitiva de ratos e ratas nascidos de mães inflamadas durante o período gestacional. (A) Linha do tempo experimental. Valores são representados como média \pm E.P.M. e analisados pelo teste t de Student durante treino e teste em ratos machos (B) e fêmeas (C). * $p<0,05$ na comparação entre objetos familiar e novo ($n=7-10$ /grupo).

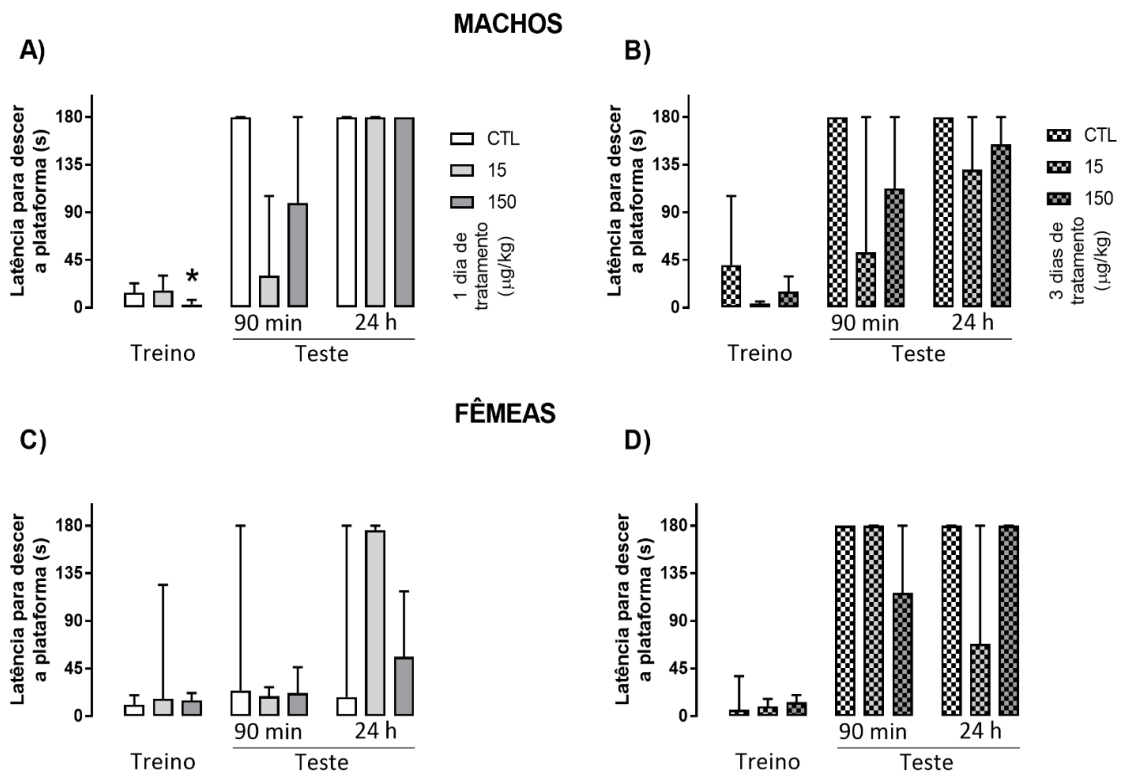


Fonte: a autora.

O teste da esquia inibitória foi empregado para investigar os efeitos do processo inflamatório induzido por LPS sobre a memória aversiva da prole adulta de ratos que tiveram as mães inflamadas durante o período gestacional (Figura 19). O teste não-paramétrico de

Kruskal-Wallis evidenciou significância durante período de treino ($\chi^2=7,11$, $df=2$, $p<0,05$), com a diminuição da latência para descer da plataforma nos ratos machos tratados uma única vez com LPS 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p<0,05$, Figura 19A). Não foram observadas alteração significativas nos demais parâmetros (treino e teste) em ratos machos ou fêmeas. Apesar das fêmeas apresentarem diferença significativa na latência para descer da plataforma, tanto no grupo controle quanto nos grupos que receberam dose única de LPS; neste trabalho, não consideramos como efeitos da inflamação. Devido ao fato de que não realizamos a verificação do ciclo estral das fêmeas no momento dos testes. Portanto esses resultados podem ser influenciados pelo período estral das ratas, ou seja, as fêmeas poderiam estar no estro, período em que ficam mais ansiosas e estressadas.

Figura 19 - Efeitos do processo inflamatório induzido por uma única ou 3 doses consecutivas de LPS sobre a performance cognitiva de ratos e ratas nascidos de mães inflamadas durante o período gestacional. Valores são representados como mediana \pm intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e teste pos-hoc de Dunn quando necessário durante treino e teste em ratos machos (A-B) e fêmeas (C-D). * $p<0,05$ em relação ao grupo controle respectivo (tratado com salina). # $p<0,05$ em relação à dose respectiva administrada uma única vez ($n=6-9/\text{grupo}$).

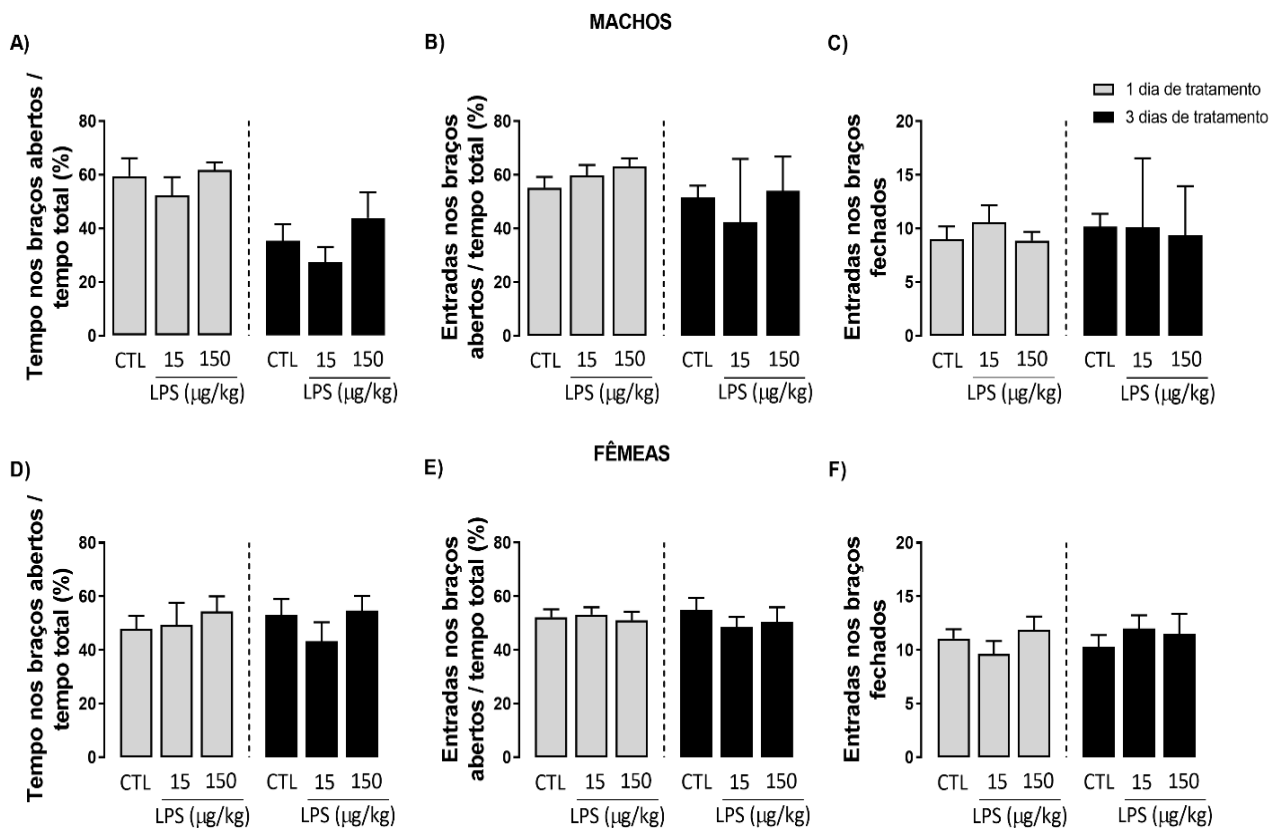


Fonte: a autora.

5.3 PERFIL EMOCIONAL DA PROLE ADULTA DE RATAS INFLAMADAS DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL

O teste do labirinto em cruz elevado foi utilizado para investigar os efeitos do processo inflamatório induzido por LPS sobre os comportamentos relacionados à ansiedade da prole adulta de ratos que tiveram as mães inflamadas durante o período gestacional (Figura 20). Tendo como referência o fator “tratamento”, ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas entre o tratamento de LPS e o grupo tratado com salina (controle) nos parâmetros clássicos do labirinto em cruz elevado, tanto quando administrados uma única vez ou em 3 dias consecutivos, em ratos machos ou fêmeas.

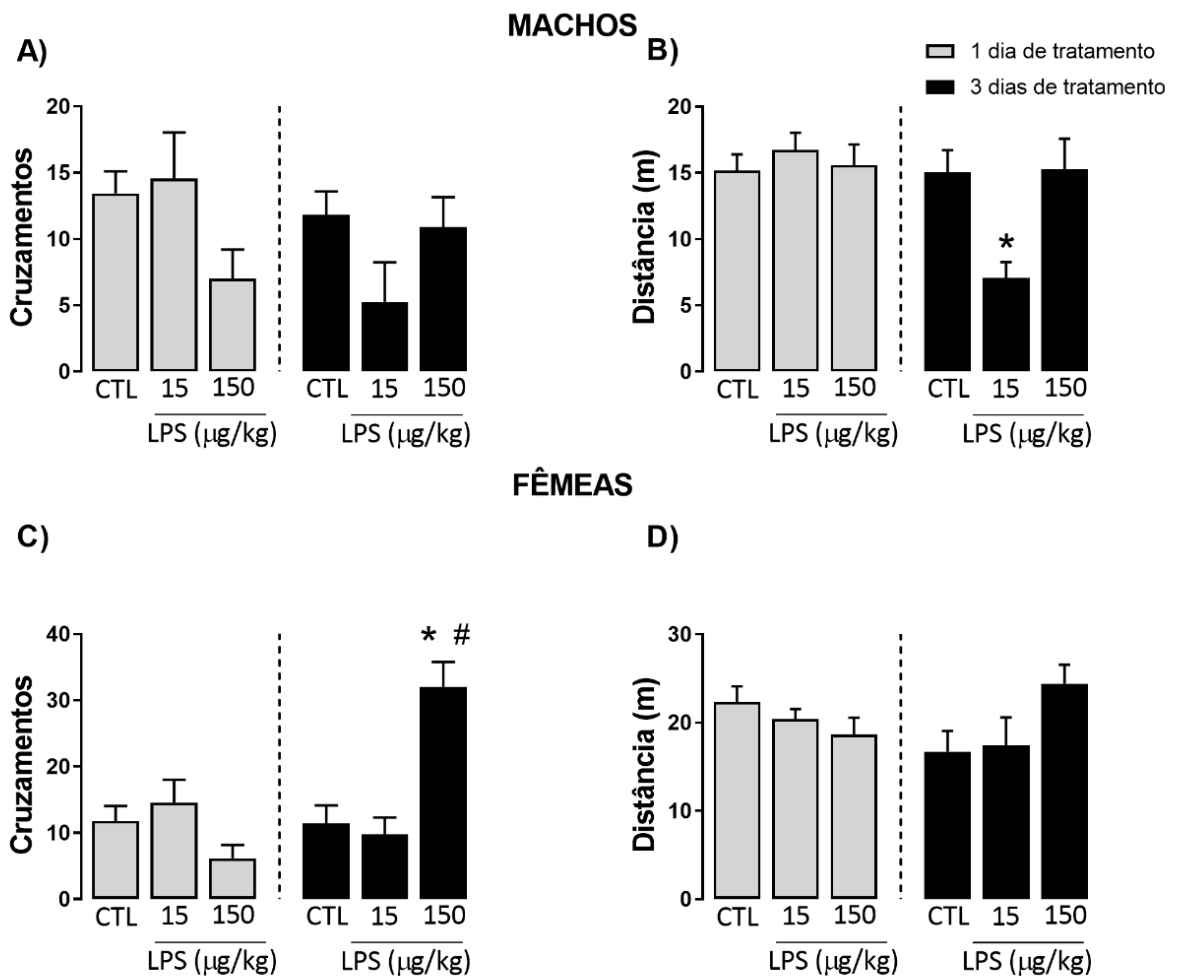
Figura 20 – Resultados do processo inflamatório induzido por uma única ou 3 doses consecutivas de LPS sobre comportamentos emocionais de ratos e ratas nascidos de mães inflamadas durante o período gestacional. Valores são representados como média \pm E.P.M. e analisados por ANOVA de uma via (“tratamento” como fator), seguida pelo teste pos-hoc de Newman Keuls quando necessário (n=6-15/grupo).



Fonte: a autora.

O perfil locomotor da prole adulta também foi avaliado a partir do teste de campo aberto (Figura 21). Conforme ANOVA de uma via, ratos machos tratados durante 3 dias consecutivos apresentaram alteração da atividade locomotora [$F(2,30)=5,21$, $p=<0,05$], havendo diminuição da distância percorrida após administração de LPS (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$) em relação ao grupo controle ($p<0,01$, Figura 21B). Em contrapartida, ANOVA evidencia diferença significativa do número de cruzamentos no desempenho de ratas fêmeas tratadas durante 3 dias consecutivos [$F(2,28)=12,41$, $p=0,0001$], havendo aumento deste parâmetro nas ratas tratadas com LPS (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) em relação ao grupo controle ($p<0,001$) e a dose menor ($p<0,001$, Figura 21C).

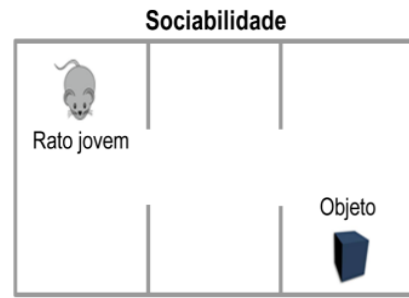
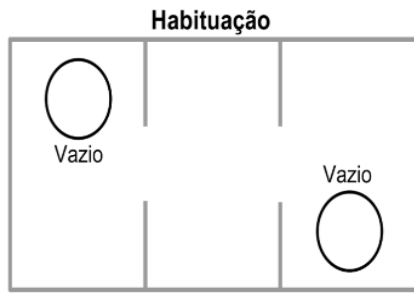
Figura 21 - Efeitos do processo inflamatório induzido por uma única ou 3 doses consecutivas de LPS sobre a atividade locomotora de ratos e ratas nascidos de mães inflamadas durante o período gestacional. Valores são representados como média \pm E.P.M. e analisados por ANOVA de uma via (“tratamento” como fator), seguida pelo teste pos-hoc de Newman Keuls quando necessário. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle respectivo (tratado com salina). # $p<0,05$ em relação à dose de LPS administrada da mesma forma ($n=7-16/\text{grupo}$).



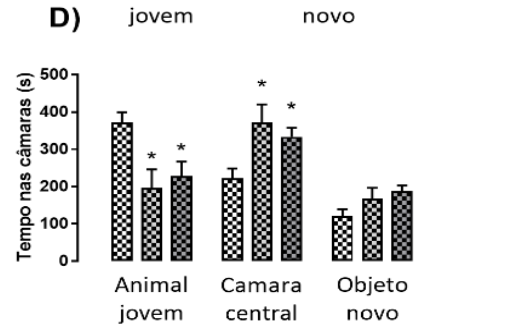
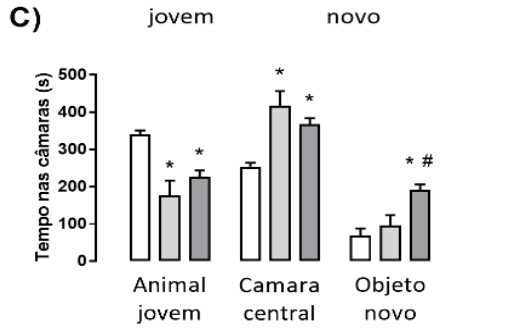
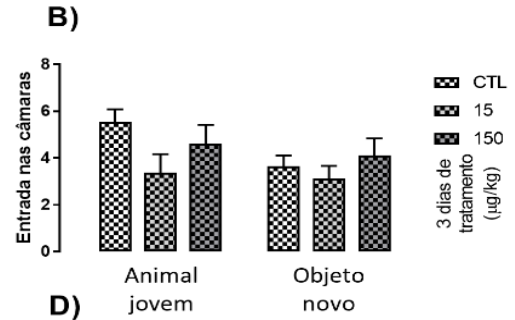
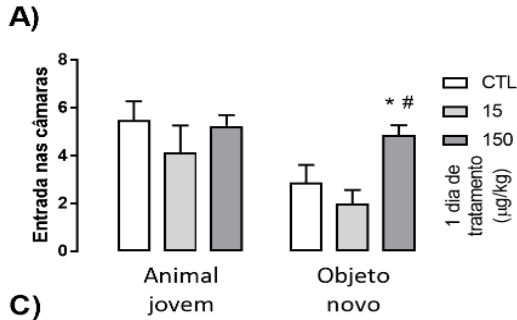
Parâmetros comportamentais relacionados à sociabilidade foram avaliados no teste de interação social (Figura 22). Conforme ANOVA de uma via, foram observadas diferenças significativas quanto ao número de entrada na câmara com objeto novo [$F(2,21)=6,32$, $p<0,01$] e tempo gasto nas câmaras central [$F(2,21)=11,20$, $p<0,001$], com objeto novo [$F(2,21)=9,33$, $p=0,001$] ou rato jovem [$F(2,21)=11,26$, $p<0,001$] causadas pelo tratamento em ratos machos.

Assim, animais tratados com uma única dose de LPS (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) apresentaram maior número de entradas na câmara com objetos novo em relação ao grupo salina ($p<0,05$) e grupo LPS de menor dose ($p<0,01$, Figura 22A). Ainda, ratos machos tratados com LPS (15 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) gastaram menor tempo nas câmaras com animal jovem ($p<0,001$ e $p<0,01$) e maior na central ($p<0,001$ e $p<0,01$) em relação ao grupo controle, além do maior tempo gasto na câmara com objeto novo após tratamento com LPS (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) em relação ao tratamento com salina ($p=0,001$) e à dose menor de LPS ($p<0,01$, Figura 22C). O tratamento com LPS em 3 dias consecutivos também modificou o tempo gasto pelos animais nas câmaras com animal jovem [$F(2,22)=6,06$, $p<0,01$] e central [$F(2,20)=5,73$, $p<0,05$]. Conforme Figura 22D, animais machos tratados por 3 dias com LPS (15 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) gastaram menor tempo na câmara com animal jovem ($p=0,01$ e $p=0,01$), contrapondo o maior tempo gasto na câmara central ($p=0,01$ e $p<0,05$).

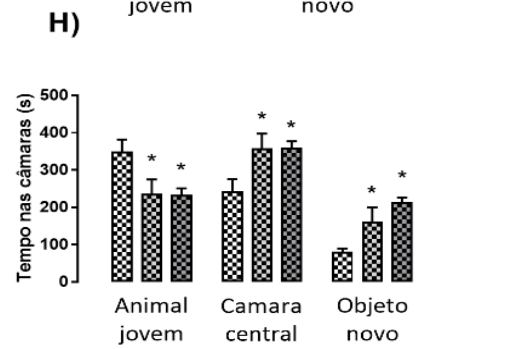
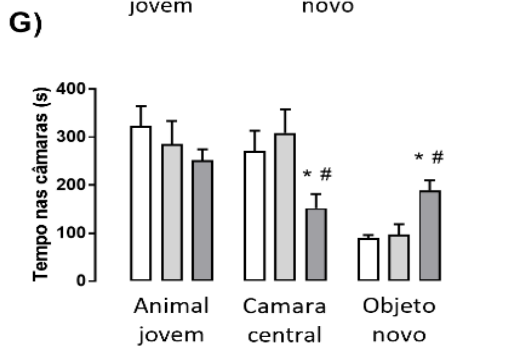
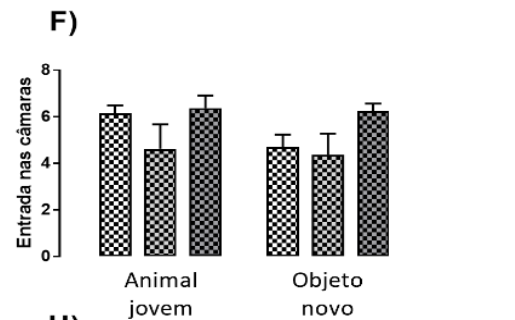
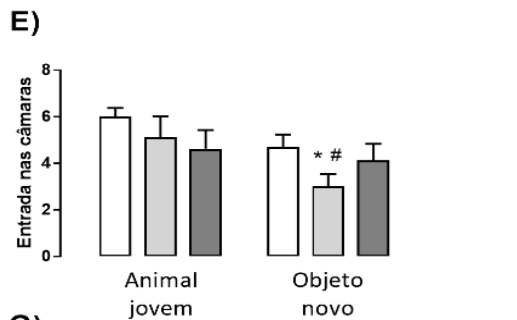
Figura 22 - Efeitos do processo inflamatório induzido por uma única ou 3 doses consecutivas de LPS sobre o comportamento social no teste das três câmaras em ratos e ratas nascidos de mães inflamadas durante o período gestacional. Painel superior demonstra o design experimental com seções de habituação e sociabilidade. Valores são representados como média \pm E.P.M. e analisados por ANOVA de uma via ("tratamento" como fator), seguida pelo teste pos-hoc de Newman Keuls quando necessário. * $p\leq 0,05$ em relação ao grupo controle respectivo (tratado com salina). # $p<0,05$ em relação à dose de LPS administrada da mesma forma ($n=7-9/\text{grupo}$).



MACHOS



FÊMEAS



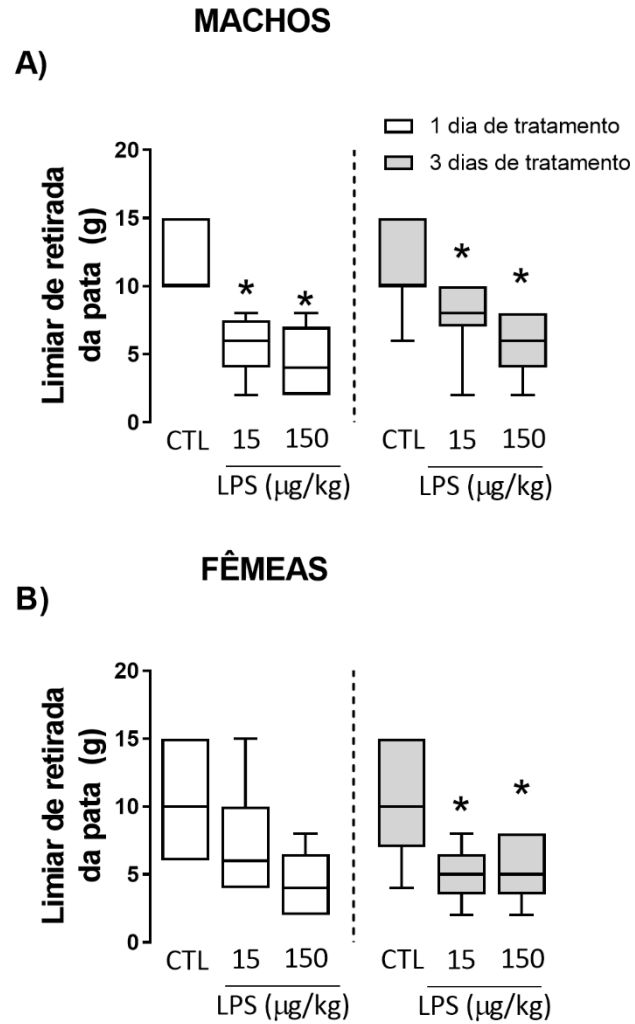
Fonte: a autora.

A administração única de LPS em ratas fêmeas promoveu alterações no número de entradas na câmara com objeto novo [$F(2,19)=6,40$, $p<0,01$] e tempo nas câmaras central [$F(2,19)=3,79$, $p<0,05$] e com objeto novo [$F(2,19)=9,43$, $p=0,01$]. Nesse sentido, a dose única de LPS (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$) diminuiu o número de entradas na câmara com objeto novo em relação ao grupo controle ($p<0,05$) e à dose maior ($p<0,01$). A dose maior de LPS (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) diminuiu o tempo gasto pelos animais na câmara central e aumentou o tempo de exposição ao objeto novo em relação ao grupo controle ($p=0,05$) e de menor dose ($p<0,05$, Figura 22E-G). A administração múltipla em 3 dias consecutivos de LPS alterou significativamente o tempo gasto pelas ratas nas câmaras com o animal jovem [$F(2,20)=4,39$, $p<0,05$], central [$F(2,20)=4,47$, $p<0,05$] e com objeto novo [$F(2,20)=7,42$, $p<0,01$]. LPS em ambas as doses (15 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) diminuiu o tempo gasto na câmara com o rato jovem ($p=0,01$ e $p<0,05$), além de aumentar o tempo de exposição nas câmaras central ($p=0,01$ e $p<0,05$) e com objeto novo ($p<0,05$ e $p<0,01$), quando comparado ao grupo controle (Figura 22H).

5.4 EFEITOS SOBRE A SENSACÃO MECÂNICA NA PROLE ADULTA DE RATAS INFLAMADAS DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL

O teste de von Frey foi utilizado para investigar os efeitos do processo inflamatório induzido por LPS sobre a sensibilidade mecânica plantar da prole adulta de ratos que tiveram as mães inflamadas durante o período gestacional (Figura 23). O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis evidenciou significância no limiar para retirada da pata em ratos machos após administração de uma única dose de LPS ($\chi^2=12,76$, $\text{df}=2$, $p<0,01$), com diminuição do limiar de retirada em ambos os grupos ($p=0,005$ e $p<0,001$), e após 3 dias consecutivos ($\chi^2=20,66$, $\text{df}=2$, $p<0,00001$), também com diminuição deste limiar em relação ao controle ($p=0,05$ e $p<0,0001$, Figura 23A). O comportamento de retirada também esteve significativamente alterado após 3 dias de tratamento com LPS ($\chi^2=7,34$, $\text{df}=2$, $p<0,05$) nas ratas fêmeas, com a diminuição com diminuição do limiar de retirada da pata após tratamento com ambas as doses em relação ao grupo controle ($p=0,01$ e $p<0,05$, Figura 23B).

Figura 23 - Efeitos do processo inflamatório induzido por uma única ou 3 doses consecutivas de LPS sobre a dor de ratos e ratas nascidos de mães inflamadas durante o período gestacional. Valores são representados como mediana \pm intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e teste pos-hoc de Dunn quando necessário em ratos machos (A) e fêmeas (B). * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle respectivo (tratado com salina) (n=8-13/grupo).



Fonte: a autora.

6 DISCUSSÃO

A administração sistêmica de LPS nas diferentes doses não alterou a temperatura corporal de ratas prenhes durante o E15 ou E17, apesar da discreta tendência à hipotermia causada pela injeção única de LPS 150 µg/kg. Esses achados corroboram parcialmente com estudos prévios que observaram a influência de diferentes doses de LPS nos parâmetros fisiológicos de ratos *Wistar*, evidenciando que doses baixas de LPS não interferiram na temperatura corporal dos animais, apesar de observado efeito hipotérmico em concentrações acima de 125 µg/kg (BISON et al., 2008). Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa também revelou que injeções de LPS na concentração 150 µg/kg causaram hipotermia em ratas prenhes (TOYAMA et al., 2015). Gomez-Lopez e colaboradores (2018) observaram que LPS em dose de 15 µg/kg injetado i.p. causou hipotermia e nascimento prematuro da prole. Quando injetado diretamente na cavidade intrauterina, LPS não promoveu reduziu a temperatura corporal de camundongos. Corroborando esses achados, Tsang, Fewell e Moore (2016) encontraram efeito hipotérmico similar em ratas prenhes após a injeção sistêmica de LPS.

A hipotermia é um indicador da ativação do sistema imune e, apesar da febre ser considerada característica fundamental no processo de sepse, a redução da temperatura corporal está associada à inflamação grave ou fatal. Segundo Huang e colegas (2016), a ligação do TLR4 pelo LPS ativa produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF, que pode ter função protetora e está ligado à modulação térmica, apesar desses mecanismos não estarem esclarecidos.

O LPS causou óbito em 23,07% das ratas gestantes que receberam três doses de LPS 150 µg/kg e 11,11% entre as ratas que receberam uma dose de LPS 150 µg/kg, não havendo influência das doses menores sobre a mortalidade das ratas gestantes. O ganho de peso gestacional ficou comprometido nas ratas prenhes submetidas às injeções de LPS na maior dose, efeito também demonstrado por Lins et al. (2019), Peiris et al. (2019) e Toyoma et al. (2015).

Conforme observado em nosso estudo, a IL-1β esteve aumentada no líquido amniótico após injeção única de LPS 150 µg/kg e diminuiu após a aplicação de 3 doses. Importante ressaltar, mesmo em gestações sem intercorrências, há um aumento significativo de IL-1β no líquido amniótico (REZNIKOV et al., 1999), principalmente no terceiro trimestre gestacional (BRY; LAPPALAINEN; HALLMAN, 1999; NING et al., 2008). Assim, nossos resultados são justificados ao evidenciar uma quantidade consideravelmente maior de citocinas no líquido amniótico em relação ao meio materno, reforçando o questionamento de estudos anteriores acerca do gatilho para ativação do sistema imune, sendo o meio materno ou o meio fetal capaz

de ativar respostas imunes sem a interferência materna ou a existência de uma interface entre os dois. Além disso, diversos estudos relataram o aumento dos níveis de IL-1 β no soro materno e não no líquido amniótico (BERGDOLT; DUNAEVSKY, 2019; GAYLE et al., 2004; LASALA; ZHOU, 2007; TOYAMA et al., 2015). Portanto, são necessários estudos futuros que esclareçam o papel da ativação imune materno-fetal.

TNF- α e IL-1 β possuem características pró-inflamatórias e ativam cascatas anti-inflamatórias em resposta à invasão de agentes infecciosos, sendo as primeiras citocinas a serem ativadas no líquido amniótico (MAMEDE et al., 2012; RENAUD et al., 2011; REZNIKOV et al., 1999; TSUKADA et al., 2019). Especificamente, a ativação imune-materno-fetal ativa IL-6 e IL-10 (HARVEY; BOKSA, 2014; GOMES-LOPES et al., 2019; SIMOES et al., 2018), corroborando nossos resultados, onde a administração de LPS 150 μ g/kg aumentou as concentrações de IL-6 e IL-10 no soro materno e no líquido amniótico, embora no líquido amniótico este aumento tenha ocorrido após 3 horas e diminuído após 72 horas. No soro materno, IL-6 aumentou em 3 horas (150 μ g/kg) e manteve-se elevada somente na dose de 15 μ g/kg após 72 horas da inflamação induzida por LPS. IL-10 também foi ativada no líquido amniótico em 3 horas, normalizando após 72 horas, enquanto no soro materno permaneceu ativada após 72 horas.

A IL-6 pode ser considerada uma citocina pró-inflamatória que também participa das cascatas moleculares anti-inflamatórias. Por sua vez, IL-10 tem papel crucial nos mecanismos anti-inflamatórios (BRY; LAPPALAINEN; HALLMAN, 1999; NING et al., 2008). Assim, esses resultados corroboram com estudos prévios onde, inicialmente, TNF- α e IL-1 foram ativadas em três horas no ambiente fetal, posteriormente acionando as citocinas anti-inflamatória que permaneceram elevadas por 72 horas. Importante ressaltar, a relação entre a ativação materna e fetal ainda não está clara, uma vez que não observamos aumento das citocinas pró-inflamatórias no meio materno. Talvez isso possa ocorrer logo após a indução do processo inflamatório por LPS. Estes resultados indicam que tanto o meio materno quanto o meio fetal respondem ao LPS, não evidenciando a participação materna ou do ambiente fetal no gatilho da resposta autoimune ou se estes participam de forma dependente ou não.

A dose de 150 μ g/kg de LPS aumentou o nível de TNF- α presente no líquido amniótico após três horas da injeção, corroborando estudos prévios que observaram diminuição desta citocina 72 h após administração de LPS (BERGDOLT; DUNAEVSKY, 2019; GAYLE et al., 2004; REZNIKOV et al., 1999; TOYAMA et al., 2015) Interessante, LPS elevou TNF- α na placenta de ratas (TSUKADA et al., 2019). A sinalização de TNF- α na placenta pode atingir o feto desempenhando papel crítico na hipóxia, diminuição de neurogênese fetal (SIMÕES et al.,

2018), hemorragia placentária (FEDORKA et al., 2019) e pode estar muito envolvida na mediação da morte fetal (RENAULD et al., 2011). Paradoxalmente, elevados níveis de TNF- α no meio fetal, além de causar agravos, podem ter papel protetor por estar envolvido na regulação térmica e na identificação do alvo infectante, ativando cascatas anti-inflamatórias.

Apesar de não esclarecido totalmente, as células amnióticas produzem uma variedade de fatores anti-inflamatórios, como a IL-10 (SIMÕES et al., 2018; TSUKADA et al., 2019; WISCHHOF et al., 2015), que aumenta com a presença de TNF- α , IL-1 e LPS (GOMEZ-LOPEZ et al., 2019). A ativação de TNF- α ocorre imediatamente após a infecção, sendo produzido pelo âmnio e liberado diretamente no líquido amniótico (KAECH; BOCHUD; CALANDRA, 2006). Esses achados poderiam justificar a não elevação de TNF- α no nível sérico materno, apesar de isto ter sido observado em alguns estudos (GAYLE et al., 2004; LASALA; ZHOU, 2007; SIMÕES et al., 2018). Em contrapartida, semelhante aos nossos achados, Fedorka e colegas (2019) relataram o aumento de TNF- α no líquido amniótico após injeção de LPS, mas não no soro materno, embora este estudo tenha sido realizado em éguas prenhes e não em roedores. Esses resultados levantam dúvidas sobre a relação do sistema imune materno-fetal e quem seria responsável por desencadear as cascatas anti-inflamatórias, a mãe ou o ambiente fetal, questionamento também realizado previamente (RENAUD et al., 2011). Outra suposição para que os níveis séricos maternos de TNF- α não estivessem elevados destaca que o pico de ativação materna possa ter ocorrido bem antes do momento de coleta do soro, que ocorreu três horas após administração de LPS.

Importante, mesmo em doses baixas, o LPS foi capaz de ativar moléculas anti-inflamatórias. Este modelo animal de ativação do sistema imune-materno é frequentemente utilizado em estudos sobre alterações do neurodesenvolvimento, principalmente do TEA. É um modelo validado e bem aceito, porém estudos anteriores referem doses de LPS injetadas nas ratas prenhes que permeiam 100 a 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (CARLEZON JR et al., 2019; RENAUD et al., 2011; TOYAMA et al., 2015; WISCHHOF et al., 2015).

Portanto, a alteração provocada por uma dose baixa de LPS apresentada neste estudo pode trazer contribuições para futuros estudos sobre AIM, encorajando novos pesquisadores a utilizar protocolos com doses menores de LPS e, com isso, diminuindo o investimento financeiro com os experimentos, além de reforçar a atenção que deve ser dada à inflamação materno-fetal, já que há evidências robustas que este evento pode levar desfechos negativos ao feto, como alterações no neurodesenvolvimento (HARVEY; BOKSA, 2014; NAMEDE et al., 2012; THEIS et al., 2020).

O presente trabalho também evidenciou que as respostas inflamatórias ativadas por AIM podem manter-se alteradas na prole até a vida adulta. Isto foi observado através da quantificação de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias no soro da prole adulta, onde os animais que foram expostos à inflamação no período intrauterino com a dose de 150 µg/Kg, tanto em dose única quanto em doses repetidas, mantiveram elevados níveis séricos de IL-1β e IL-10. Este resultado corrobora com duas revisões, Depino (2018) e Bergdolt e Dunaevsky (2019), que referem alteração da resposta imune e aumento de citocinas periféricas na prole exposta à AIM, podendo perdurar ao longo da vida. Outros trabalhos demonstraram alteração na quantificação de citocinas em regiões cerebrais, como: córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo em animais adultos submetidos à AIM (CARLEZON JR et al., 2019; SIMÕES et al., 2018).

É amplamente conhecido que a inflamação no período pré-natal pode desencadear o aparecimento de distúrbios neuropsiquiátricos. TEA é considerado um destes transtornos que se caracteriza por diferentes sintomas bastante heterogêneos (KAZDOBA et al., 2016). Funções cognitivas, comportamentos de ansiedade e sociabilidade e a percepção sensorial podem estar comprometidos em indivíduos autistas (GLASS et al., 2019). Os transtornos neuropsiquiátricos são em torno de 5 vezes mais prevalentes no sexo masculino (CARLEZON JR et al., 2019; LAI et al., 2015), por isto, grande parte dos estudos pré-clínicos que investigaram comportamentos em modelos animais de AIM observaram apenas o sexo masculino. Aqui, nós avaliamos aspectos comportamentais relacionados ao TEA na prole adulta das ratas *Wistar* submetidas à inflamação, investigando a prole adulta composta por machos e fêmeas.

No teste de esQUIVA INIBITÓRIA, os animais machos e fêmeas aumentaram a latência para descer da plataforma, demonstrando que consolidaram o aprendizado. Não encontramos estudos anteriores sobre AIM que tenha investigado a memória aversiva através da esQUIVA INIBITÓRIA. As funções cognitivas estão comprometidas no TEA, estando a deficiência intelectual presente em aproximadamente 30% dos autistas (MATSON; SHOEMAKER, 2009). Nossos dados obtidos através do teste de reconhecimento de objetos apontaram prejuízos na memória dos animais expostos à inflamação pré-natal por LPS. Tanto os machos quanto as fêmeas inflamadas nas doses menores e maiores reconheceram o objeto familiar na sessão de teste, mas não demonstraram interesse no objeto novo.

O teste de reconhecimento de objetos é simples e eficaz, fornecendo parâmetros de memória. Animais com a memória preservada naturalmente preferem investigar a novidade. Diferente da memória de localização de objeto, dependente do funcionamento hipocampal, a memória de reconhecimento de objeto parece estar relacionada a outras regiões cerebrais

(VOGEL-CIERNIA; WOOD, 2014). Investigações sobre a base neural da memória de reconhecimento referiram que outras regiões corticais, como o córtex pré-frontal, estão envolvidas nos mecanismos de memória (BARKER; WARBURTON, 2011).

Esses resultados corroboram com outros estudos, onde após a administração pré-natal de LPS, a memória de reconhecimento de objetos foi prejudicada na prole em ambos os sexos, com os machos sendo mais severamente afetados (WISCHHOF et al., 2015). Harvey e Boksa (2014) observaram na prole exposta ao LPS pré-natal retardo no reflexo de aversão e aquisição tardia de aprendizado, associado a déficit cognitivo.

Outros modelos animais de TEA demonstraram prejuízos cognitivos na prole. Um deles, é a ativação imune por injeção de *Poly C* (GIOVANOLI et al., 2015; LINS et al., 2019). O outro, utiliza o ácido valpróico em animais prenhes (NICOLINI; FAHNESTOCK, 2018; OLEXOVÁ; STEFÁNIK; KRŠKOVÁ, 2016). Recentemente, foi desenvolvido um modelo de AIM utilizando enterotoxinas *Staphylococcus* (GLASS et al., 2019). Estes estudos observaram prejuízos na memória da prole configurando déficits cognitivos e demonstrando que fatores ambientais podem causar alterações no desenvolvimento e funcionamento cerebral, sugerindo que a AIM pode ser um forte indicador de distúrbios de neurodesenvolvimento como o TEA, apesar de que sua fisiopatologia ainda não está totalmente elucidada.

AIM eleva níveis de citocinas no meio materno-fetal (MEYER; YEE; FELDON, 2007), principalmente citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10 (RENAUD et al., 2011). No entanto, estas citocinas têm importante papel no desenvolvimento embrionário e fetal participando na maturação normal do feto (AL-AYADHI; ALHOWIKAN; HALEPOTO, 2018). Contudo, a elevação exacerbada de citocinas no SNC do feto pode comprometer a formação cortical, causando danos irreversíveis ao funcionamento cerebral (BERGDOLT; DUNAESVKY, 2019; FEDORKA et al., 2019).

A alteração no desenvolvimento cortical pode ter impacto negativo sobre as funções corticais superiores, como a sociabilidade, emocionalidade e processamento sensorial. Portanto, alterações em qualquer uma dessas funções no desenvolvimento neurológico poderia disparar uma cascata neuro-imune desencadeando os transtornos neurológicos como o TEA (GOYAL; MIYAN, 2014).

Podemos interpretar que os animais machos e fêmeas inflamados por LPS no período pré-natal não foram capazes de reconhecer o novo objeto, podendo indicar um déficit cognitivo que pode ter sido causado pela AIM. Este estudo traz um importante dado, dado que mesmo em doses baixas, o LPS provocou alterações na memória de reconhecimento, podendo indicar o surgimento de alterações em regiões corticais. Outro fator que merece atenção é que neste

estudo a prole de fêmeas também apresentou dificuldades de memória de reconhecimento, já que a maioria dos estudos anteriores com modelo animal de TEA investigaram apenas a prole de machos.

Comportamentos de emocionalidade também foram avaliados neste trabalho, porém contrariando o estudo realizado anteriormente em nosso laboratório, onde camundongos expostos ao LPS pré-natal apresentaram uma tendência a comportamentos de ansiedade (HARVEY; BOKSA, 2014; TOYAMA et al., 2015). Nossos resultados não apresentaram alterações significativas de ansiedade através dos testes de LCE e CA entre os animais submetidos ao LPS pré-natal em comparação aos animais que receberam salina. Interessante, outros estudos em modelo animal de indução de AIM por LPS também não demonstraram comportamentos relacionados à ansiedade, como o CA e LCE (CARLEZON JR et al., 2019; CUSTÓDIO et al., 2018; WISCHHOF et al., 2015).

De acordo com a literatura, as principais características do TEA são alterações no domínio social, dificuldades de linguagem e movimentos repetitivos, juntamente com prejuízos na percepção sensorial (CASANOVA, 2007). Lai e colegas (2014), em sua revisão sobre TEA, referiu que em humanos, cerca de 29% de indivíduos com TEA apresentam transtornos de ansiedade, ocorrendo alterações mentais como dificuldades cognitivas, que parecem ser sintomas secundários do TEA.

Cage, Monaco e Newell (2018) referem em sua revisão que a prevalência de comorbidades mentais no TEA é surpreendentemente alta, sendo que 77% dos jovens adultos autistas apresentam diagnósticos adicionais de saúde mental, incluindo ansiedade, depressão e transtorno bipolar. Segundo os mesmos autores, isto pode ser uma consequência de fatores como a restrição social e alterações sensoriais que podem limitar o aprendizado. Sendo assim, os transtornos mentais se configuram como respostas às limitações encontradas nos indivíduos com TEA.

Os resultados relevantes deste trabalho referem-se à cognição, comportamentos de sociabilidade e também a percepção sensorial. Os testes realizados para avaliar esses aspectos apresentaram diferenças significativas entre os animais expostos ao LPS pré-natal e o grupo controle, tanto em doses baixas quanto em doses altas, demonstrando que o modelo animal de AIM foi capaz de reproduzir o comportamento do TEA. Estes comportamentos atípicos foram encontrados nos animais machos e fêmeas. Outro achado que merece atenção é que as doses com baixa concentração de LPS foram também capazes de evocar comportamentos relacionados às desordens neurológicas.

Apesar do desenvolvimento de vários estudos com intuito de investigar a neurobiologia do TEA, ainda existem muitos aspectos que merecem ser elucidados. A interação social é uma das características mais marcantes no TEA e pode se manifestar por meio de isolamento, dificuldades de interação e de manifestar emoções (ROULLET; CRAWLEY, 2011).

Para avaliar a sociabilidade, utilizamos o teste de interação social, conhecido como teste de três câmaras (ROULLET; CRAWLEY, 2011). A tarefa de interação social tem sido amplamente utilizada como teste padrão para avaliar sociabilidade em roedores. Considera-se sociabilidade preservada quando o animal passa mais tempo na câmara contendo um outro animal do que na câmara que contém um objeto (YANG; SILVERMAN; CRAWLEY, 2011).

Observamos que os animais machos e fêmeas submetidos ao LPS pré-natal, mesmo em doses baixas, preferiram permanecer próximo ao objeto em detrimento de permanecer junto a um animal jovem desconhecido, sugerindo prejuízos nos aspectos sociais dos animais. Os mesmos resultados foram encontrados em estudos prévios (CARLEZON JR et al., 2019; CUSTÓDIO et al., 2018; FORTUNATO et al., 2017).

A inflamação pré-natal em dose única de LPS, na maior dose, alterou o interesse social da prole de machos. Os animais permaneceram o maior tempo na câmara do centro e na câmara do objeto. A permanência na câmara central pode ser interpretada como a necessidade do animal em evitar o contato com animal co-específico. Os ratos que receberam as doses em três dias consecutivos apresentaram um comportamento semelhante. As fêmeas replicaram o comportamento antissocial, permanecendo mais tempo na câmara que continha o objeto do que na câmara com animal co-específico. Estes achados convergem com os resultados do teste de reconhecimento de objetos, reforçando positivamente a aplicabilidade deste modelo animal nas investigações sobre TEA.

Importante ressaltar, mesmo os animais que receberam a menor dose de LPS, tanto em dose única como em doses repetidas, apresentaram alterações de comportamento social, que pode ser comparado ao comportamento autista em humanos. O mesmo resultado foi encontrado com relação aos aspectos cognitivos.

De acordo com Goyal e Miyan (2014), desarranjos no desenvolvimento cortical podem acarretar disfunções cognitivas de ordem superior em humanos, como a memória de trabalho, linguagem, tomada de decisão e comportamento social, que ocorrem principalmente no córtex pré-frontal e conectam-se com outras áreas. Os neurônios piramidais participam ativamente destas conexões. A eficiência dos circuitos corticais depende muito de interneurônios GABAérgicos, que atuam como moduladores essenciais no processamento de funções corticais

(MOLNÁR et al., 2019). O GABA é o principal transmissor inibitório do cérebro adulto. No entanto, durante o período de desenvolvimento cerebral, interneurônios GABAérgicos têm uma importante função excitatória, participando ativamente na modulação da migração neuronal e consequente formação cortical (BEN-ARI et al., 2012).

A elevação de neurotransmissores GABAérgicos nos períodos iniciais do neurodesenvolvimento pode desregular o equilíbrio excitatório-inibitório do SNC adulto, causando alterações nas funções corticais cognitivas, sensoriais, de linguagem e nos comportamentos sociais em modelos de TEA (MCPARTLAND, 2016).

As alterações no balanço excitatório-inibitório podem ser encaradas como fatores etiológicos fisiológicas do TEA (NOVAIS et al., 2014). Em recente revisão sobre as alterações imunes maternas, Gumusoglu e Stevens, (2019) encontrou dois trabalhos que observaram alterações do sistema GABAérgico associados à inflamação pré-natal no modelo de AIM.

Lins e colegas (2019) observaram alterações de sociabilidade e reconhecimento de objetos em animais fêmeas inflamadas com LPS pré-natal, demonstrando falhas na integração multissensorial. As alterações no comportamento social e cognitivo encontrados neste trabalho e em pesquisas prévias nos animais inflamados no período pré-natal podem estar relacionadas a falhas na circuitaria GABAérgica, causadas pela ativação e desregulação imune fetal. Esta hipótese é reforçada a partir dos resultados encontrados nos testes de sensibilidade tátil de von Frey (CARLEZON JR et al., 2019; CUSTÓDIO et al., 2018; FORTUNATO et al., 2017; GUMUSOGLU; STEVENS, 2019; LINS et al., 2019).

Os animais machos submetidos à inflamação pré-natal por LPS em ambas as doses apresentaram hipersensibilidade em relação aos animais controles. As fêmeas que receberam três doses de LPS reproduziram o mesmo padrão de resposta encontrada nos machos, havendo diferenças significativas da percepção sensorial em relação ao grupo controle. As regiões cerebrais implicadas no processamento das percepções táteis, por exemplo, córtex insular, também estão envolvidas na percepção social e cognição social (SCHAFFLER; MIDDLETON; ABDUS-SABOOR, 2019). Sendo assim, os resultados do teste de von Frey podem ser de extrema relevância para auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos no TEA.

Para o nosso conhecimento, esta foi a primeira vez que o teste de von Frey foi aplicado em um modelo animal de TEA a partir da indução de LPS. Apesar disso, estudos clínicos em humanos referem alterações na sensação tátil e dor como fenótipo de TEA (COURTEMANCHE; BLACK; REESE, 2016; ROBERTSON; BARON-COHEN, 2017; SCHNEIDER; LABUZ; PRZEWLOCKI, 2001).

De acordo com Robertson e Baron-Cohen (2017), o TEA caracteriza-se como um atraso no desenvolvimento que altera a cognição social e experiências perceptivas. Sintomas sensoriais são clinicamente documentados a partir dos seis meses em crianças diagnosticadas com TEA. Os limiares táteis são alterados, no entanto, podem ser hiporresponsíveis ou hiperresponsíveis a estímulos táteis. A sensação tátil é essencial para o controle motor e exploração do ambiente. O sistema somatossensorial concede aos mamíferos a capacidade de explorar seu ambiente e interagir com seus pares através da estimulação tátil da pele, além da capacidade de se proteger de danos físicos (OREFICE, 2020).

No sistema Nervoso Periférico, os gânglios da raiz dorsal e os gânglios trigêmeos aferentes primários conectam a periferia com o SNC. Os neurônios destes gânglios respondem além da percepção tátil mecânica, mas a estímulos térmicos e cocéira. Em geral, neurônios de grande diâmetro bastante mielinizados respondem ao toque e neurônios menores pouco mielinizados respondem à dor (SCHAFFLER; MIDDLETON; ABDUS-SABOOR, 2019).

A sinalização tátil é enviada diretamente ao cérebro, partindo de alguns núcleos medulares ou indiretamente através de neurônios de projeção ascendendo até o tronco cerebral (KRIDSADA et al., 2018). A sensação de dor chega ao cérebro a partir da medula espinhal através dos neurônios de projeção que cruzam para o lado oposto da medula, ascendendo ao cérebro em cinco vias ascendentes. A informação da percepção tátil estende-se do tálamo e é codificada no córtex somatossensorial, enquanto as sensações de dor são codificadas em regiões talâmicas (CORDER et al., 2019; MEDA et al., 2019).

Considerando que a sensação tátil é codificada em regiões corticais somatossensoriais, e que as funções corticais dependem do bom funcionamento dos interneurônios GABAérgicos, pode-se presumir que alterações no desenvolvimento cortical disparado por alterações imunes podem estar associados ao desequilíbrio do balanço excitatório-inibitório, culminando no aparecimento de características do TEA, conforme dados obtidos neste estudo, tanto nos aspectos cognitivos, sociais e da sensação tátil.

Aqui, os animais machos e fêmeas apresentaram comportamento similar ao de indivíduos com TEA nos testes relacionados às funções corticais, sendo que os efeitos da inflamação pré-natal por LPS nos diferentes parâmetros testados foram similares nas doses de baixa e alta concentração. Efeitos negativos na cognição e sociabilidade foram encontrados em estudos anteriores. As respostas referentes à sensação tátil não foram investigadas anteriormente. Portanto, esses resultados poderão contribuir para o desenvolvimento de novas investigações.

Recentemente, duas revisões, Schaffler, Middleton e Abdus-Saboor (2019) e Orefice (2020), pesquisaram a relação do TEA com dificuldades sensoriais e concluíram que a disfunção na sensação tátil, juntamente com déficits sociais e cognitivos, pode ser considerada um fenótipo de TEA. Este dado pode auxiliar pesquisas clínicas, no diagnóstico e futuras alternativas terapêuticas do TEA. Assim, Schaffler, Middleton e Abdus-Saboor (2019) e Orefice (2020) levantaram uma dúvida importante sobre o surgimento das alterações sensoriais no TEA. As disfunções sensoriais poderiam alterar o desenvolvimento das funções cognitivas e sociais? Ou a restrição social, falta de estímulos e pouca exploração dos ambientes, características do TEA, podem levar a falha no desenvolvimento do sistema somatossensorial.

O que está bem estabelecido é que as funções sensoriais estão intimamente relacionadas com desenvolvimento cognitivo e social. Neste trabalho, foram observadas alterações de comportamento sociais e cognitivos associados a alterações sensoriais. Neste caso, os animais demonstram-se hiperrresponsíveis aos estímulos dos filamentos do teste de von Frey. As alterações foram encontradas tanto nos animais machos quanto nas fêmeas. Além disso, baixas concentrações de LPS foram capazes de alterar o comportamento das proles inflamadas. Esses resultados são relevantes para o desenvolvimento de futuras pesquisas, com intuito de elucidar os mecanismos envolvidos no TEA.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se através dos resultados obtidos neste trabalho que o modelo de AIM pode ser uma excelente ferramenta para o estudo dos mecanismos do TEA. Foi observado que a inflamação pré-natal induzida por LPS pode ativar respostas imunes materno-fetais, causando abortos espontâneos e uma tendência à hipotermia materna.

Constatou-se que as doses em baixas concentrações de LPS foram capazes de induzir respostas imunes, podendo causar efeitos negativos no desenvolvimento cerebral, tendo como desfechos alterações no comportamento social, cognitivo e sensorial.

Um resultado relevante foi o fato de que tanto os filhotes machos quanto as fêmeas apresentaram alterações nos comportamentos social, cognitivo e sensorial, enquanto a maioria dos achados anteriores investigaram apenas animais machos.

O desfecho negativo no comportamento sensorial foi de extrema relevância, visto que o teste de dor de von Frey não foi aplicado em estudos anteriores com este modelo de ativação da resposta imune induzida por LPS, podendo assim servir como base para futuros estudos.

O modelo de AIM configura-se como um modelo eficaz de TEA, podendo auxiliar no esclarecimento dos sintomas do TEA em humanos, assim como no surgimento de novas tendências terapêuticas para amenizar os desfechos negativos observados em indivíduos acometidos pelo TEA.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S.F.; ZOHEIR, K.M.A.; ZOHEIR, K.M.A.; ANSARI, M.A.; NADEEM, A.; BAKHEET, S.A.; AL-AYADHI, L.Y.; AL-SHABANAH, M.Z.; ATTIA, S.M. Dysregulation of Th1, Th2, Th17, and T regulatory cell-related transcription factor signaling in children with autism. **Molecular Neurobiology**, v. 54, p. 4390-4400, 2017.
- AL-AYADHI, L.; ALHOWIKAN, A.M.; HALEPOTO, D.M. Impact of auditory integrative training on transforming growth factor- β 1 and its effect on behavioral and social emotions in children with autism spectrum disorder. **Medical Principles and Practice**, v. 27, n. 1, p. 23-29, 2018.
- ANDERSON, V.; SPENCER-SMITH, M.; WOOD, A. Do children really recover better? Neurobehavioural plasticity after early brain insult. **Brain**, 134, p. 2197-221, 2011.
- APA. American Psychiatric Association. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais – DSM-V**. 5. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2014.
- BARKER, G.R.I.; WARBURTON, E.C. When is the hippocampus involved in recognition memory? **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 29, p. 10721-10731, 2011.
- BATINIC, B.; SANTRAC, A.; JANCIC, I.; LI, G.; VIDOJEVIC, A.; MARKOVIC, B.; COOK, J.M.; SAVIC, M.M. Positive modulation of α 5 GABAA receptors in preadolescence prevents reduced locomotor response to amphetamine in adult female but not male rats prenatally exposed to lipopolysaccharide. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 61, p. 31-39, 2017.
- BEN-ARI, Y.; KHALILOV, I.; KAHLE, K.T.; CHERUBINI, E. The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. **The Neuroscientist**, v. 18, n. 5, p. 467-486, 2012.
- BERGDOLT, L.; DUNAEVSKY, A. Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 175, p. 1-19, 2019.
- BISON, S.; CARBONI, L.; ARBAN, R.; BATE, S.; GERRARD, P.A.; RAZZOLI, M. Differential behavioral, physiological, and hormonal sensitivity to LPS challenge in rats. **Dovepress**, v. 2009, n. 1, p. 1-13, 2008.
- BRY, K.; LAPPALAINEN, U.; HALLMAN, M. Cytokines and production of surfactant components. **Seminars in Perinatology**, v. 20, n. 3, p. 194-205, 1996.
- BUDDAY, S.; STEINMANN, P.; KUHL, E. Physical biology of human brain development. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. 257, 2015.
- CAGE, E.; MONACO, J.; NEWELL, V. Experiences of autism acceptance and mental health in autistic adults. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 48, n. 2, p. 473-484, 2018.
- CAPANO, L.; DUPUIS, A.; BRIAN, J.; MANKAD, D.; GENORE, L.; ADAMS, R.H.; SMILE, S.; LUI, T.; ODRIBINA, D.; FOSTER, J.A.; ANAGNOSTOU, E. A pilot dose finding study of pioglitazone in autistic children. **Molecular Autism**, v. 9, n. 59, 2018.
- CARLEZON JR, W.A.; KIM, W.; MISSIG, G.; FINGER, B.C.; LANDINO, S.M.; ALEXANDER, A.J.; MOKLER, E.L.; ROBBINS, J.O.; LI, Y.; BOLSHAKOV, V.Y.; MCDUGLE, C.J.; KIM, K.S. Maternal and early postnatal immune activation produce sex-specific effects on autism-like behaviors and neuroimmune function in mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 16928, 2019.
- CASANOVA, M.F. The neuropathology of autism. **Brain Pathology**, v. 17, n. 4, p. 422-433, 2007.
- CHEN, V.S.; MORRISON, J.P.; SOUTHWELL, M.F.; FOLEY, J.F.; BOLON, B.; ELMORE, S.A. Histology atlas of the developing prenatal and postnatal mouse Central Nervous System, with emphasis on prenatal days E7.5 to E18.5. **Toxicologic Pathology**, v. 45, n. 6, p. 705-744, 2017.

CORDER, G.; AHANONU, B.; GREWE, B.F.; WANG, D.; SCHNITZER, M.J.; SCHERRER, G. **An amygdalar neural ensemble that encodes the unpleasantness of pain.** *Science*, v. 363, n. 6424, p. 276-281, 2019.

COURTEMANCHE, A.B.; BLACK, W.R.; REESE, M. The relationship between pain, self-injury, and other problem behaviors in Young children with autism and other developmental disabilities. *American Journal on Intellectual and Developmental Disabilities*, v. 121, p. 194-203, 2016.

CUSTÓDIO, C.S.; MELLO, B.S.F.; CHAVES FILHO, A.J.M.; LIMA, C.N.C.; CORDEIRO, R.C.; MIYAJIMA, F.; RÉUS, G.Z.; VASCONCELOS, S.M.M.; BARICHELLO, T.; QUEVEDO, J.; OLIVEIRA, A.C.; LUCENA, D.F.; MACEDO, D.S. Neonatal immune challenge with lipopolysaccharide triggers long-lasting sex- and age-related behavioral and immune/neurotrophic alterations in mice: relevance to autism spectrum disorders, *Molecular Neurobiology*, v. 55, n. 5, p. 3775-3788, 2018.

DEPINO, A.M. Perinatal inflammation and adult psychopathology: from preclinical models to humans. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 77, p. 104-114, 2018.

DEUIS, J.R.; DVORAKOVA, L.S.; VETTER, I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 284, p. 1-17, 2017.

EZZAT, H.; JEANELLE, A.; HAILLE, R.; STEPHEN, C.; NOCTOR, M.C. The number of parvalbumin-expressing interneurons is decreased in the prefrontal cortex in autism. *Cerebral Cortex*, v. 28, p. 1931-1943, 2018.

FEDORKA, C.E.; BALL, B.A.; SCHOGGIN, K.E.; LOUX, S.C.; TROEDSSON, M.H.T.; ADAMS, A.A. The fetomaternal immune response to equine placentitis. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 82, n. 5, 2019.

FORTUNATO, J.J.; ROSA, N.; LAURENTINO, A.O.M.; GOULART, M.; MICHALAK, C.; BORGES, L.P.; SOARES, E.C.C.; REIS, P.A.; FARIA NETO, U.C.C.; PETRONILHO, F. Effects of ω -3 fatty acids on stereotypical behavior and social interactions in Wistar rats prenatally exposed to lipopolysaccharides. *Nutrition*, v. 35, p. 119-127, 2017.

GALIC, M.A.; RIAZI, K.; PITTMAN, Q.J. Cytokines and brain excitability. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 33, n. 1, p. 116-125, 2012.

GAMMILL, L.S.; BRONNER-FRASER, M. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 4, n. 10, p. 795-805, 2003.

GAYLE, D.A.; BELOOESKY, R.; DESAI, M.; AMIDI, F.; NUÑEZ, S.E.; ROSS, M.G. Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 286, n. 6, p. 1024-1029, 2004.

GIOVANOLI, S.; NOTTER, T.; RICETTO, J.; LABOUESSE, M.A.; VUILLERMOT, S.; RIVA, M.A.; MEYER, U. Late prenatal immune activation causes hippocampal deficits in the absence of persistent inflammation across aging. *Journal of Neuroinflammation*, v. 12, n. 221, 2015.

GLASS, R.; NORTON, S.; FOX, N.; KUSNECOV, A.W. Maternal immune activation with staphylococcal enterotoxin A produces unique behavioral changes in C57BL/6 mouse offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 75, p. 12-25, 2019.

GOMEZ-LOPEZ, N.; ROMERO, R.; ARENAS-HERNANDEZ, M.; PANAITESCU, B.; GARCIA-FLORES, V.; MIAL, T.N.; SAHI, A.; HASSAN, S.S. Intra-amniotic administration of lipopolysaccharide induces spontaneous preterm labor and birth in the absence of a body temperature change. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, v. 31, n. 4, p. 439-446, 2018.

GOMEZ-LOPEZ, N.; ROMERO, R.; GALAZ, J.; XU, Y.; PANAITESCU, B.; SLUTSKY, R.; MOTOMURA, K.; GILL, N.; PARA, R.; PACORA, P.; JUNG, E.; HSU, C.D.. Cellular immune responses in amniotic fluid of women with preterm labor and intra-amniotic infection or intra-amniotic inflammation. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 82, n. 5, 2019.

- GOYAL, D.K.; MIYAN, J.A. Neuro-immune abnormalities in autism and their relationship with the environment: a variable insult model for autism. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. 29, 2014.
- GRAAF-PETERS, V.B.; HADDERS-ALGRA, M. Ontogeny of the human central nervous system: What is happening when? **Early Human Development**, v. 8, p. 257-663, 2006.
- GUMUSOGLU, S.B.; STEVENS, H.E. Maternal inflammation and neurodevelopmental programming: a review of preclinical outcomes and implications for translational psychiatry. **Biological Psychiatry**, v. 85, n. 2, p. 107-121, 2019.
- HALL, C.S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385-403, 1934.
- HALLER, J.; ALICKI, M. Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 25, p. 59-64, 2012.
- HARVEY, L.; BOKSA, P. Do prenatal immune activation and maternal iron deficiency interact to affect neurodevelopment and early behavior in rat offspring? **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 35, p. 144-154, 2014.
- HISLE-GORMAN, E.; SUSI, A.; STOKES, T.; GORMAN, G.; ERDIE-LALENA, C.; NYLUND, C.M.; Prenatal, perinatal, and neonatal risk factors of autism spectrum disorder. **Pediatric Research**, v. 84, p. 190-198, 2018.
- HODYL, N.A.; ABOUSTATE, N.; BIANCO-MIOTTO, T.; ROBERTS, C.T.; CLIFTON, V.L.; STARK, M.J. Child neurodevelopmental outcomes following preterm and term birth: What can the placenta tell us? **Placenta**, v. 57, p. 79-86, 2017.
- HUANG, W.; MORALES, J.L.; GAZIVODA, V.P.; AUGUST, A. Non-receptor tyrosine kinases ITK and BTK negatively regulate mast cell pro-inflammatory responses to lipopolysaccharide. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 4, p. 1197-1205, 2016.
- IZQUIERDO, I.; BARROS, D.M.; MELLO, T.S.; DE SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, L.A.; MEDINA, J.H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, p. 635-636, 1998.
- JIANG, N.M.; COWAN, M.; M00NAH, S.N.; PETRI, W.A. Jr. The Impact of Systemic Inflammation on Neurodevelopment. **Trends Mol Med**. v. 9, p. 794-804, 2018.
- JOHNSEN, J.I.; DYBERG, C.; WICKSTRÖM, M. Neuroblastoma – a neural crest derived embryonal malignancy. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, n. 9, 2019.
- KAECH, C.; BOCHUD, P.Y.; CALANDRA, T. Cytokines and Escherichia coli Sepsis. **EcoSal Plus**, v. 2, n. 1, 2006.
- KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **Nervous Child**, v. 2, p. 217-250, 1943.
- KAZDOBA, T.M.; LEACH, P.T.; YANG, M.; SILVERMAN, J.L.; SOLOMON, M.; CRAWLEY, J.N. Translational mouse models of autism: advancing toward pharmacological therapeutics. **Behavioral Neuroscience**, v. 28, p. 1-52, 2016.
- KOGAN, M.D.; VLADUTIU, C.J.; SCHIEVE, L.A.; GHANDOUR, R.M.; BLUMBERG, S.J.; ZABLOTSKY, B.; PERRIN, J.M.; SHATTUCK, P.; KUHLTHAU, K.A.; HARWOOD, R.L.; LU, M.C. The Prevalence of Parent-Reported Autism Spectrum Disorder Among US Children. **Pediatrics**, v. 142, n. 6, 2018.
- KRIDSADA, K.; NIU, J.; HALDIPUR, P.; WANG, Z.; DING, L.; LI, J.J.; LINDGREN, A.G.; HERRERA, E.; THOMAS, G.M.; CHZHIKOV, V.V.; MILLEN, K.J.; LUO, W. Roof plate-derived radial glial-like cells support

developmental growth of rapidly adapting mechanoreceptor ascending axons. **Cell Reports**, v. 23, n. 10, p. 2928-2941, 2018.

KRIEGSTEIN, A.R.; NOCTOR, S.C. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 7, p. 392-399, 2004.

LAI, M.-C.; LOMBARDO, M.V.; AUYEUNG, B.; CHAKRABARTI, B.; BARON-COHEN, S. Sex/gender differences and autism: setting the scene for future research. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 54, n. 1, p. 11-24, 2015.

LASALA, N.; ZHOU, H. Effects of maternal exposure to LPS on the inflammatory response in the offspring. **Journal of Neuroimmunology**, v. 189, n. 1-2, p. 95-101, 2007.

LEE, J.D.; COULTHARD, L.G.; WOODRUFF, T.M. Complement dysregulation in the central nervous system during development and disease. **Seminars in Immunology**, v. 45, 2019.

LEVITT, P. Structural and functional maturation of the developing primate brain. **The Journal of Pediatric**, v. 143, p. 35-45, 2003.

LINS, B.R.; MARKS, W.N.; ZABDER, N.K.; GREBA, Q.; HOWLAND, J.G. Maternal immune activation during pregnancy alters the behavior profile of female offspring of Sprague Dawley rats. **ENeuro**, v. 6, n. 2, 2019.

LUHMANN, H.J.; FUKUDA, A.; KILB, W. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. **Frontiers in Cell Neuroscience**, v. 9, n. 4, 2015.

LYALL, K.; CROEN, L.; DANIELS, J.; FALLIN, M.D.; LADD-ACOSTA, C.; LEE, B.K.; PARK, B.Y.; SNYDER, N.W.; SCHENDEL, D.; VOLK, H.; WINDHAM, G.C.; NEWSCHAFFER, C. The changing epidemiology of autism spectrum disorders. **Annual Review of Public Health**, v. 38, p. 81-102, 2017.

MAHIC, M.; MJAALAND, S.; BOLVELSTAD, H.M.; GUNNES, N.; SUSSER, E.; BRESNAHAN, M.; OYEN, S.S.; LEVIN, B.; CHE, X.; HIRTZ, D.; REICHBORN-KJENNERUD, T.; SCHOLBERG, S.; ROTH, C.; MAGNUS, P.; STOLTENBERG, C.; SUREN, P.; HORNIG, M.; LPKIN, W.I. Maternal immunoreactivity to herpes simplex virus 2 and risk of autism spectrum disorder in male offspring. **mSphere**, v. 2, n. 1, 2017.

MAMEDE, A.C.; CARVALHO, M.J.; ABRANTES, A.M.; LARANJO, M.; MAIA, C.J.; BOTELHO, M.F. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 2, p. 447-58, 2012.

MATSON, J.L.; SHOEMAKER, M. Intellectual disability and its relationship to autism spectrum disorders. **Research in Developmental Disabilities**, v. 30, n. 6, p. 1107-1114, 2009.

MCPARTLAND, J.C. Considerations in biomarker development for neurodevelopmental disorders. **Current Opinion in Neurology**, v. 29, n. 2, p. 118-122, 2016.

MEDA, K.S.; PATEL, T.; BRAZ, J.M.; MALIK, R.; TURNER, M.L.; SEIFIKAR, H.; BASBAUM, A.I.; SOHAL, V.S. Microcircuit mechanisms through which mediodorsal thalamic input to anterior cingulate cortex exacerbates pain-related aversion. **Neuron**, v. 102, n. 5, p. 944-959, 2019.

MEYER, U.; YEE, B.K.; FELDON, J. The neurodevelopment impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? **The Neuroscientist**, v. 13, n. 3, p. 241-256, 2007.

MISHRA, M.K.; DUTTA, K.; SAHEB, S.K.; BASU, A. Understanding the molecular mechanism of blood-brain barrier damage in an experimental model of Japanese encephalitis: correlation with minocycline administration as a therapeutic agent. **Neurochemistry International**, v. 55, n. 8, p. 717-723, 2009.

MOLNÁR, C.; CLOWRY, G.J.; ŠESTAN, N.; ALZU'BI, A.; BAKKEN, T.; HEVNER, R.F.; HÜPPI, P.S.; KOSTOVIĆ, I.; RAKIC, P.; ANTON, E.S.; EDWARDS, D.; GARCEZ, P.; HOERDER-SUABEDISSEN, A.;

KRIEGSTEIN, A. New insights into the development of the human cerebral cortex. **Journal of Anatomy**, v. 235, n. 3, p. 432-451, 2019.

MOLTENI, M.; GEMMA, S.; ROSSETTI, C. The Role of toll-like receptor 4 in infectious and noninfectious inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016.

NAMEDE, A.C.; CARVALHO, M.J.; ABRANTES, A.M.; LARNAJO, M.; BOTELHO, M.F. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. **Cell and Tissue Research**, v. 349, p. 447-458, 2012.

NICOLINI, C.; FAHNESTOCK, M. The valproic acid-induced rodent model of autism. **Experimental Neurology**, v. 299, pt A, p. 217-227, 2018.

NING, H.; WANG, H.; ZHAO, L.; ZHANG, C.; LI, X.Y.; CHEN, Y.H.; XU, D.X. Maternally administered lipopolysaccharide (LPS) increases tumor necrosis factor alpha in fetal liver and fetal brain: its suppression by low-dose LPS pretreatment. **Toxicology Letters**, v. 176, n. 1, p. 13-9, 2008.

NOVAIS, A.R.B.; CROUZIN, N.; CAVALIER, M.; BOUBAL, M.; GUIRAMAND, J.; COHEN-SOLAL, C.; FERREIRA, M.J.; CAMBONIE, G.; VIGNES, M. Tiagabine improves hippocampal long-term depression in rat pups subjected to prenatal inflammation. **Plos One**, v. 9; p. 106-302, 2014.

OLEXOVÁ, L.; ŠTEFÁNIK, P.; KRŠKOVÁ, L. Increased anxiety-like behaviour and altered GABAergic system in the amygdala and cerebellum of VPA rats - an animal model of autism. **Neuroscience Letters**, v. 629, p. 9-14, 2016.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Transtornos do espectro autista**. 2017. Disponível em: http://www.who.int/sdhconference/discussion_paper/Discussion_Paper_PT.pdf. Acesso em: 1 abr. 2018.

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde Brasil. **Folha informativa - Transtorno do espectro autista**. 2017. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?Itemid=1098>. Acesso em: 28 jan. 2020.

OREFICE, L.L. Peripheral somatosensory neuron dysfunction: emerging roles in autism spectrum disorders. **Neuroscience**, 2020.

PAN, Y.H.; WU, N.; YUAN, X.B. Toward a Better Understanding of Neuronal Migration Deficits in Autism Spectrum Disorders. **Front Cell Dev Biol**, v.7, n.205, p.1-8, 2019.

PEIRIS, H.N.; ROMERO, R.; VASWANI, K.; REED, S.; GOMEZ-LOPEZ, N.; TARCA, A.L.; GUDICHA, D.W.; EREZ, O.; MAYMON, E.; MITCHELL, M.D. Preterm labor is characterized by a high abundance of amniotic fluid prostaglandins in patients with intra-amniotic infection or sterile intra-amniotic inflammation. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 29, p. 1-16, 2019.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

RENAUD, S.J.; COTECHINI, T.; QUIRT, J.S.; MACDONALD-GOODFELLOW, S.K.; OTHMAN, M.; GRAHAM, C.H. Spontaneous pregnancy loss mediated by abnormal maternal inflammation in rats is linked to deficient utero placental perfusion. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 3, 1799-808, 2011.

REZNIKOV, L.L.; FANTUZZI, G.; SELZMAN, C.H.; SHAMES, B.D.; BARTON, H.A.; BELL, H.; MCGREGOR, J.A.; DINARELLO, C.A. Utilization of endoscopic inoculation in a mouse model of intrauterine infection-induced preterm birth: role of interleukin 1beta. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 5, p. 1231-1238, 1999.

ROBERTSON, C.; BARON-COHEN, S. Sensory perception in autism. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 11, p. 671-684, 2017.

ROSADINI, C.V.; KAGAN, J.C. Early Innate Immune Responses to Bacterial LPS. **Current Opinion in Immunology**, v. 44, p. 14-19, 2017.

ROSSATO, J.I.; BEVILAQUA, L.R.; MYSKIW, J.C.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning and Memory**, v. 14, n. 1, p. 36-46, 2007.

ROULLET F.I.; CRAWLEY, J.N. Mouse models of autism: testing hypotheses about molecular mechanisms. **Behavioral Neuroscience**, v. 7, p. 187-212, 2011.

RUSSO, F.B.; FREITAS, B.C.; PIGNATARI, G.C.; FERNANDES, I.R.; SEBAT, J.; MOUTRI, A.R.; BELTRÃO-BRAGA, P.C.B. Modeling the interplay between neurons and astrocytes in autism using human induced pluripotent stem cells. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 7, p. 569-578, 2018.

SALAMASO, N.; JABLONSKA, B.; SCAFIDI, J.; VACCARINO, F.M. Neurobiology of premature brain injury. **Nature Neurosciense**, v. 17, p. 341-346, 2014.

SAUKA-SPENGLER, T.; BRONNER-FRASER, N. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 7, p. 557-568, 2008.

SCHAFFLER, M.D.; MIDDLETON, L.J.; ABDUS-SABOOR, I. Mechanisms of tactile sensory phenotypes in autism: current understanding and future directions for research. **Current Psychiatry Reports**, v. 21, n. 12, 2019.

SCHNEIDER, T.; LABUZ, D.; PRZEWLOCKI, R. Nociceptive changes in rats after prenatal exposure to valproic acid. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 53, n. 5, p. 531-534, 2001.

SENADO FEDERAL. Censo Demográfico vai coletar dados sobre autismo. 2019. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/noticias/audios/2019/10/censo-demografico-vai-coletar-dados-sobre-autismo>. Acesso em: 07 mar. 2020.

SIMÕES, L.R.; SANGIOGO, G.; TASHIRO, M.H.; GENEROSO, J.S.; FALLER, C.J.; DOMINGUINI, D.; MASTELLA, G.A.; SCAINI, G.; GIRIDHARAN, V.V.; MICHELS, M.; FLORENTINO, D.; PETRONILHO, F.; RÉUS, G.Z.; DAL-PIZZOL, F.; ZUGNO, A.I.; BARICHELLO, T. Maternal immune activation induced by lipopolysaccharide triggers immune response in pregnant mother and fetus, and induces behavioral impairment in adult rats. **Journal of Psychiatry Research**, v. 100, p. 71-83, 2018.

STOLP, H.B. Neuropoietic cytokines in normal brain development and neurodevelopmental disorders. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 53, p. 63-68, 2013.

SUZUKI, K.; SUGIHARA, G.; OUCHI, Y.; NAKAMURA, K.; FUTATSUBASHI, M.; TAKEBAYASHI, K.; YOSHIHARA, Y.; OMATA, K.; MATSUMOTO, K.; TSUCHIYA, K.J.; IWATA, Y.; TSUJII, M.; SUGIYAMA, T.; MORI, N. Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 1, p. 49-58, 2013.

THEIS, K.R.; ROMERO, R.; MOTOMURA, K.; GALAZ, J.; WINTERS, A.D.; PACORA, P.; MILLER, D.; SLUTSKY, R.; FLOROVA, V.; LEVENSON, D.; PARA, R.; VARREY, A.; KACEROVSKY, M.; HSU, C.D.; GOMEZ-LOPEZ, N. Microbial burden and inflammasome activation in amniotic fluid of patients with preterm prelabor rupture of membranes. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 48, n. 2, p. 115-131, 2020.

THION, M.S.; GINHOUX, F.; GAREL, S. Microglia and early brain development: an intimate journey. **Science**, v. 362, n. 6411, p. 185-189, 2018.

TOYAMA, R.P.; XIKOTA, J.C.; SCHWARZBOLD, M.L.; FRODE, T.S.; BUSS ZDA, S.; NUNES, J.C.; FUNCHAL, G.D.; NUNES, F.C.; WALZ, R.; PIRES, M.M. Dose-dependent sickness behavior, abortion and inflammation induced by systemic LPS injection in pregnant mice. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 28, n. 4, p. 426-430, 2015.

TSANG, M.; FEWELL, J.E.; MOORE, S.L. LPS induced hypothermia in pregnant rats: a regulated thermoregulatory response. **Physiology & Behavior**, v. 89, n. 2, p. 235-240, 2006.

TSUKADA, T.; SHIMADA, H.; SAKATA-HAGA, H.; IIZUKA, H.; HATTA, T. Molecular mechanisms underlying the models of neurodevelopmental disorders in maternal immune activation relevant to the placenta. **Congenital Anomalies (Kyoto)**, v. 59, n. 3, p. 81-87, 2019.

VOGEL-CIERNIA, A.; WOOD, M.A. Examining object location and object recognition memory in mice. **Current Protocols**, v. 69, n. 1, p. 8.31.1-8.31.117, 2014.

WISCHHOF, L.; IRRSACK, E.; OSORIO, C.; KOCH, M. Prenatal LPS-exposure - a neurodevelopmental rat model of schizophrenia - differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 57, p. 17-30, 2015.

YAN, C.J.; LIU, C.L.; SANG, B.; ZHU, X.M.; DU, Y.J. The combined role of serotonin and interleukin-6 as biomarker for autism. **Neuroscience**, v. 284, p. 290-296, 2015.

YANG, M.; SILVERMAN, J.L.; CRAWLEY, J.N. Automated three-chambered social approach task for mice. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 8, n. 8.26, 2011.

ZARETSKY, M.V.; ALEXANDER, J.M.; BYRD, W.; BAWDON, R.E. Transfer of inflammatory cytokines across the placenta. **Obstetrics & Gynecology**, v. 103, n. 3, p. 546-550, 2004.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA



Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos de injeções de agonistas e antagonistas GABAérgicos no núcleo accumbens em ratos Wistar submetidos a inflamação pré-natal", protocolada sob o CEUA nº 3687170217, sob a responsabilidade de **Joao Carlos Xikota e equipe; Ana Cláudia Januário** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 05/06/2017.

We certify that the proposal "Effects of injections of GABAergic agonists and antagonists on the nucleus accumbens in Wistar rats submitted to prenatal inflammation", utilizing 334 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 3687170217, under the responsibility of **Joao Carlos Xikota and team; Ana Cláudia Januário** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 06/05/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [03/2017](#) a [03/2021](#) Área: [Ciências da Saúde](#)

Origem: [Biotério Central](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [60 a 80 dias](#)

N: [334](#)

Linhagem: [Ratos/Wistar](#)

Peso: [180 a 230 g](#)