

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**FERNANDO VITOR VIEIRA**

**EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO LIPOPOLISSACARÍDEO COMO MODELO  
TRANSLACIONAL DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

Alfenas/MG

2017

**FERNANDO VITOR VIEIRA**

**EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO LIPOPOLISSACARÍDEO COMO MODELO  
TRANSLACIONAL DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia  
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva

Alfenas/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Vieira, Fernando Vitor.

Exposição pré-natal ao lipopolissacarídeo como modelo translacional de transtorno do espectro autista / Fernando Vitor Vieira. -- Alfenas/MG, 2017. 97 f.

Orientador: Alexandre Giusti-Paiva.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Transtornos do Espectro Autista. 2. Transtorno Autístico.  
3. Lipopolissacarídeos. I. Giusti-Paiva, Alexandre. II. Título.

CDD-612.82

FERNANDO VITOR VIEIRA

EXPOSIÇÃO PRE-NATAL AO LIPOPOLISSACARÍDEO COMO MODELO  
TRANSLACIONAL DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

A banca abaixo-assinada, aprova a dissertação como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

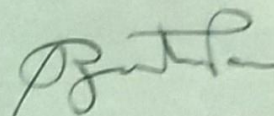
Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia  
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva

Aprovado em: 25.08.2017

Prof.: Alexandre Giusti Paiva

Instituição: UNIFAL

Assinatura:



Prof.: Nilson Carlos Sereia Junior

Instituição: USP

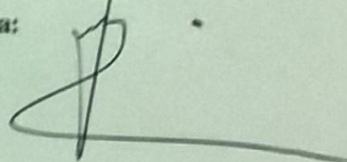
Assinatura:



Prof.: VALDEMAR ANTONIO RAFFARE JUNIOR

Instituição: UNIFAL

Assinatura:



Alfenas/MG

2017

Dedico este trabalho a minha família que é  
meu alicerce e minha noiva Juliana meu porto  
seguro.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus;

À todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para que eu chegasse até aqui;

À minha família que sempre esteve a meu lado, meus pais pelo incentivo e apoio incondicional, por sempre me mostrar o caminho e ensinar a combater o bom combate;

Agradeço a minha noiva Juliana pelo apoio, paciência e por compreender a minha ausência em vários momentos;

Ao Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva pela oportunidade e por me aceitar como aluno de mestrado mesmo sem me conhecer. Pela orientação, ensinamentos, amizade construída e confiança depositada em mim e meu trabalho;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Cardoso Vilela Giusti por toda ajuda durante todo o trabalho, mas principalmente pela paciência durante a imunoistoquímica e pela amizade construída;

Aos colegas de laboratório por terem me recebido tão bem. Em especial a minha colega intercambista Carolina Trujillo por cobrir minha ausência nos experimentos enquanto eu cursava as disciplinas externas e a mestrandia Sheila por adequar seu calendário de experimentos para que eu pudesse realizar os meus;

Aos técnicos José Reis e Gizelda que tão bem cuidam de nossos animais e da limpeza do laboratório;

Ao Prof. Dr. Waldemar Paffaro por me deixar acompanhar a rotina e estagiar no laboratório;

Por último, a meu grande amigo Renato Horvath por me ensinar as rotinas do laboratório e me apresentar ao mundo da pesquisa;

À todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para que eu chegasse até aqui.

À UNIFAL e as empresas de fomento CAPES e FAPEMIG.

Um muito obrigado a todos!

“Onde houver uma grande disposição não pode haver uma grande dificuldade”  
(Nicolau Maquiavel, O Príncipe 1513)

## RESUMO

O transtorno do espectro autista (TEA) é um transtorno psiquiátrico de desenvolvimento comportamental de etiologia desconhecida que afeta 1:88 crianças nascidas, sendo que a proporção entre meninos e meninas é de 4:1. É caracterizado por atraso ou ausência de comunicação verbal, contato visual, interação social, movimentos repetitivos e/ou estereotipados entre outros. A detecção geralmente ocorre antes dos 3 anos de idade sendo muitas vezes detectado aos 6 meses. Algumas linhas de pesquisa atestam que fatores genéticos, neurológicos, imunológicos, infecções virais pré-natais, contaminantes alimentares e ambientais poderiam ser a causa do mesmo. O presente trabalho propõe a experimentação animal como modelo de TEA para entender as causas e consequências das infecções pré-natais em ratas prenhas e consequências sobre o comportamento da prole. O modelo proposto visa mimetizar infecções durante a gestação, com a administração de lipopolissacarídeo (LPS) extraído da parede celular de bactérias gram-negativas, injetado intraperitonealmente (i.p.) nas doses de 100 µg/kg no 9<sup>o</sup>.5 ou 500 µg/kg nos dias de gestação 16<sup>o</sup> (GD9.5 e 16) ou solução salina (SAL) 1ml/kg, i.p., e posterior análise comportamental dos filhotes nascidos. Os dados obtidos nos testes de *USV's*, *Homing*, *hole-board*, *labirinto em cruz elevado* e *play behavior*, mostra que de filhotes machos provenientes de mãe tratadas com LPS na dose de 500 µg/kg no GD16 tiveram comportamento *autistic-like*, o mesmo comportamento não foi verificado nas fêmeas. Da mesma forma animais machos e fêmeas tratados com LPS na dose de 100 µg/kg GD9.5 não apresentaram diferença com relação aos animais que receberam SAL.

Palavras-chave: Transtorno do Espectro Autista. Autismo. Lipopolissacarídeo.



## ABSTRACT

Autistic Spectrum Disorder (ASD) is a psychiatric behavioral development disorder of unknown etiology that affects 1:88 children born, the ratio of boys to girls being 4:1. It is characterized by delay or absence of verbal communication, visual contact, social interaction, repetitive and/or stereotype movements among others. Detection usually occurs before 3 years of age and often detected at 6 months. Some lines of research attest that genetic, neurological, immunological factors, prenatal viral infections, food and environmental contaminants could be the cause of it. The present work proposes the animal experimentation as a model of ASD to understand the causes and consequences of prenatal infections in pregnant rats and consequence on offspring behavior. The proposed aims to mimic infections during gestation with the administration of lipopolysaccharide (LPS) extracted from the cell wall of gram-negative bacterial, injected intraperitoneally (i.p.) at doses of 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  at 9.5 or 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  in the gestation day 16 (GD9.5 and 16), or saline solution (SAL) 1ml/Kg i.p. and later behavioral analysis of the born pups. The data from the USV's, Homing, hole-board, elevated plus maze and play behavior tests show that of male offspring treated with LPS at a dose of 500  $\mu\text{g} / \text{kg}$  in GD16 had autistic-like behavior, the same behavior was not observed in females. Likewise, male and female animals treated with LPS at the dose 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  in GD9.5 did not present difference in relation to the animals that received SAL.

Key words: Autistic Spectrum Disorder. Autism. Lipopolysaccharide.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Alterações bioquímicas na mãe, placenta, feto e período pós-natal após exposição ao LPS.....	20
Figura 2	- Delineamento experimental.....	25
Fotografia 1	- Campo aberto.....	26
Fotografia 2	- Comportamento materno típico.....	27
Fotografia 3	- Estação de gravação de vocalizações.....	29
Fotografia 4	- <i>Homing</i> .....	30
Fotografia 5	- <i>Hole-board</i> .....	31
Fotografia 6	- Labirinto em cruz elevado.....	32
Fotografia 7	- Campo aberto.....	33
Fotografia 8	- <i>Play behavior</i> .....	34
Gráfico 1	- Consumo de ração durante 24h, após a aplicação de LPS (100 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.....	37
Gráfico 2	- Distância percorrida no campo aberto 2h após da aplicação de (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) em ratas no GD9.5.....	38
Gráfico 3	- Número de filhotes nascidos (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.....	39
Gráfico 4	- Peso da ninhada não padronizada (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.....	39
Gráfico 5	- Peso da ninhada pós padronização (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.....	40
Gráfico 6	- Vocalizações no PND5 (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.....	41
Gráfico 7	- Vocalizações no PND9 (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.....	41
Gráfico 8	- Vocalizações no PND13 (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.....	42
Gráfico 9	- Latência no teste de <i>homing</i> (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.....	43
Gráfico 10	- Número de mergulhos no <i>hole-board</i> (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.....	44

Gráfico 11	- Tempo gasto no braço aberto do labirinto em cruz elevado (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.....	44
Gráfico 12	- Parâmetros avaliados no teste de <i>play behavior</i> nos filhotes machos (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.....	46
Gráfico 13	- Parâmetros avaliados no teste de <i>play behavior</i> nos filhotes fêmeas (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.....	47
Gráfico 14	- Distância percorrida no campo aberto (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.....	48
Gráfico 15	- Avaliação de crescimento (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.....	49
Gráfico 16	- Consumo de ração durante 24h após aplicação de (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	50
Gráfico 17	- Distância percorrida no campo aberto 2h após da aplicação de (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	50
Gráfico 18	- Tempo de imobilidade no campo aberto 2h após da aplicação de (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	51
Gráfico 19	- Número de filhotes nascidos (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	52
Gráfico 20	- Peso da ninhada não padronizada (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	52
Gráfico 21	- Peso da ninhada pós padronização (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	53
Gráfico 22	- Porcentagem de eventos comportamento materno (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	54
Gráfico 23	- Vocalizações no PND5 (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	55
Gráfico 24	- Vocalizações no PND9 (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	56
Gráfico 25	- Vocalizações no PND13 (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	56
Gráfico 26	- Latência no teste de <i>homing</i> (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	57
Gráfico 27	- Número de mergulhos nos buracos do <i>hole-board</i> (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	58

Gráfico 28	- Tempo gasto no braço aberto do labirinto em cruz elevado (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	59
Gráfico 29	- Parâmetros avaliados no teste de <i>play behavior</i> nos filhotes machos (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	61
Gráfico 30	- Parâmetros avaliados no teste de <i>play behavior</i> nos filhotes fêmeas (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	62
Gráfico 31	- Distância percorrida no campo aberto (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	63
Gráfico 32	- Avaliação de crescimento (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	64
Gráfico 33	- Correlação entre as áreas cerebrais e o comportamento de <i>play Behavior</i> nos filhotes machos (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1ml/kg; i.p.) no GD16.....	76
Gráfico 34	- Correlação de Spearman referente a correlação direta entre as áreas imunativadas para c-fo.....	77
Gráfico 35	- Correlação de Spearman referente aos valores de (p).....	78
Prancha 1	- Fotomicrografia e gráfico do cortex cingulado (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	66
Prancha 2	- Fotomicrografia e gráfico do cortex pré-límbico (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	67
Prancha 3	- Fotomicrografia e gráfico do cortex piriforme (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	68
Prancha 4	- Fotomicrografia e gráfico da área insular agranular ventral (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	69
Prancha 5	- Fotomicrografia e gráfico da área insular agranular dorsal (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	70
Prancha 6	- Fotomicrografia e gráfico da área accubens core (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	71
Prancha 7	- Fotomicrografia e gráfico da área accubens shell (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	72
Prancha 8	- Fotomicrografia e gráfico da área das habênulas (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	73
Prancha 9	- Fotomicrografia e gráfico da área amígdala baso lateral (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	74

Prancha 10 - Fotomicrografia e gráfico da área amígdala baso medial (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.....	75
--	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1	TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA.....	14
1.2	MODELOS COMPORTAMENTAIS.....	16
1.3	LPS.....	17
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
3.1	OBJETIVO PRINCIPAL.....	22
3.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	22
<b>4</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
4.1	ANIMAIS.....	23
4.1.1	Número de animais.....	23
4.1.2	Acasalamento.....	23
4.2	DROGAS UTILIZADAS.....	23
4.3	DELINEAMENTO EXPERIEMNTAL.....	24
4.4	TESTES COMPORTAMENTAIS NAS RATAS PRENHAS.....	25
4.4.1	Campo aberto.....	25
4.4.2	Ingestão alimentar de 24 horas.....	26
4.4.3	Comportamento materno.....	26
4.5	TESTES COMPORTAMENTAIS NA PROLE.....	27
4.5.1	Vocalização.....	27
4.5.2	Motivação para encontrar o ninho ( <i>Homing</i> ).....	29
4.5.3	Tábua de buracos ( <i>Hole-board</i> ).....	30
4.5.4	Labirinto em cruz elevado.....	31
4.5.5	Campo aberto.....	32
4.5.6	Comportamento de brincar ( <i>play behaviour</i> ).....	33
4.5.7	Perfusão.....	34
4.5.8	Imunohistoquímica.....	35
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A seguir será descrita a introdução juntamente com a revisão bibliográfica.

### 1.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

O transtorno do espectro autista (TEA), descrito primeiramente por Leo Kanner (1943), têm sido objeto de intensa investigação desde sua primeira descrição no início da década de 1940 (GENTILE, 2015). É um transtorno do neurodesenvolvimento que afeta aproximadamente 1 em 88 crianças (ANOMAL et al., 2015). Sendo uma doença heterogênea com múltiplas causas, vários sintomas, distúrbios graves, e co-morbidades associadas conforme Amaral et al., (2008), incluindo convulsões, ansiedade, comportamento agressivo, problemas gastrointestinais, déficit motores, processamento sensorial anormal e distúrbios do sono (KUMAR; SHARMA, 2016b). Vários estudos relatam que as anormalidades da percepção sensorial são comuns em pessoas autistas e poderiam contribuir para o complexo comportamento e sintomas do distúrbio ( ANOMAL et al., 2015; LEEKAM et al., 2007). Além destes sintomas há várias manifestações emocionais associadas ao autismo, como depressão, aumento da ansiedade e medo (UMEDA et al., 2010).

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

O diagnóstico de autismo pode ocorrer antes dos três anos de idade, sendo que alguns sintomas são perceptíveis aos seis meses de idade (BARON-COHEN et al., 2000). Acometendo quatro vezes mais indivíduos do sexo masculino do que feminino. Embora pessoas do sexo



feminino tendam a apresentar maior deficiência intelectual ou atraso na linguagem (AMERICAN..., 2013).

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

Doenças auto-imunes como artrite reumatóide, doença celíaca e diabetes tipo 1, são mais comuns em mães de crianças com TEA. Isto sugere que um sistema imunológico anormal e deficiente é passado para a prole. Também é possível que reações autoimunes maternas durante a gestação possam ter efeitos nocivos sobre o cérebro fetal em desenvolvimento. Mães de crianças com TEA têm 12% a mais de anticorpos anti fetais no seu soro em comparação com mães de crianças típicas (PATTERSON, 2011). Estudos com indivíduos autistas encontraram elevada produção de auto anticorpos. A análise de dados de indivíduos com TEA demonstraram que 30-70% dos autistas tem auto anticorpos específicos anti cérebro incluindo dentre eles anticorpos para receptor de serotonina, proteína básica de mielina e, mais recentemente, ainda antígenos desconhecidos do extrato de tecido cerebral adulto (ASHWOOD, VAN DE WATER, 2004a).

Outros estudos encontraram baixos níveis de vitamina D em crianças com TEA em comparação com seus irmãos e pais. Baixos níveis de vitamina D também já estavam presentes ao nascimento em crianças mais tarde diagnosticadas com TEA, mas não em seus irmãos saudáveis. Baixos níveis de vitamina D durante a gravidez impactariam negativamente no estado cognitivo, desenvolvimento precoce e diagnóstico de TEA (DIETERT et al., 2011; KOCOVSKA et al., 2017).

Estudos experimentais em roedores mostram claramente que a deficiência de hormônio tireoidiano resulta em conexões temporárias ou permanentemente suprimidas, ou anormais, resultando assim em transtornos cerebrais e comportamentais na prole (BERBEL *et al.*, 2014).

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

A teoria neurodesenvolvimental do autismo propõe que o crescimento anormal, o desarranjo da padronização neuronal e déficit na conectividade cortical são as causas dos transtornos autistas (CHEN et al., 2017; DANTZER, KELLEY, 2008; PARDO, EBERHART,

2007;). Além disso, uma diminuição no número de células de purkinje no cerebelo parecem estar associado aos sintomas de autismo (COURCHESNE et al., 2007).

Estas aberrações apontam para vários períodos de início pré-natal, e em regiões particulares do cérebro que se desenvolveram mais tarde durante a neurogênese. Além disso as regiões do cérebro envolvidas no autismo tendem a se desenvolver mais lentamente e são mais vulneráveis a distúrbios (ASHWOOD et al., 2006).

Os mecanismos pelos quais as infecções pré-natais aumentam o risco para a doença neuropsiquiátrica ainda não são bem compreendidos (BAHARNOORI et al., 2012). No entanto, eventos imunomediados como infecção materna durante a gravidez são importantes a se considerar neste contexto, uma vez que eles têm o potencial para induzir mudanças de longa duração na estrutura e função do desenvolvimento cerebral (DANTZER, KELLEY, 2008; KOCOVSKA et al., 2017).

## 1.2 MODELOS COMPORTAMENTAIS

Diversos estudos utilizam modelos animais para melhor entender as causas e consequências do autismo. Estes modelos levam em conta os achados comportamentais (BERNARDI et al., 2012). Alterações comportamentais de algumas doenças psiquiátricas são geralmente estudadas em roedores utilizando diferentes testes, tais como, o labirinto em cruz elevado, caixa de claro-escuro, campo aberto e de gravações de emissões de vocalizações ultrassônicas (BASSI et al., 2012). Distúrbios relacionados ao TEA mostram função anormal na neurogênese, migração e maturação neural (BERBEL et al., 2014). A contribuição no entendimento da síndrome e possibilidades de procedimentos que não são possíveis em humanos por razões éticas, permite desvendar alguns aspectos dessa desordem (BERNARDI et al., 2012).

Modelos animais de infecções pré-natais propõem mimetizar tanto infecções bacterianas quanto virais durante a gestação, principalmente com a administração de lipopolissacarídeo (LPS), vírus influenza e ácido poliinosínico-policitidílico (PolyI:C), injetadas pelas vias intraperitoneal (i.p.), intravenosa (IV), subcutânea ou intranasal (IN) em roedores. O modelo animal fornece uma oportunidade para perguntar se a infecção pré-natal pode realmente causar alterações transitórias ou permanentes no SNC (BOKSA, 2010; PATTERSON, 2011).

Um modelo utilizado de tratamento sistêmico de PolyI:C em ratas prenhas aumentou os níveis de citocinas circulantes no soro materno, dentre elas as interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e fator de necrose tumoral (TNF), causando diminuição no número de filhotes nascidos e menor

peso da ninhada, prejuízo no reconhecimento de novos objetos e inibição pré-pulso (PPI) (BALLENDINE et al., 2015).

Modelos de infecção respiratória com vírus influenza em camundongos prenhas durante a gestação resulta em anomalias do hipocampo e córtex do sistema neonatal, assim como alterações na expressão do marcador pré-sináptico SNAP-25. Além disso, a prole de mães infectadas com influenza tiveram uma série de anormalidades comportamentais relevantes para esquizofrenia e autismo, incluindo déficits na interação social, PPI, campo aberto e reconhecimento de novos objetos (PATTERSON, 2009).

Em crianças que mães que fizeram uso de Ácido Valpróico (VPA) durante a gravidez, distúrbios do TEA foram aumentadas diversas vezes. A dose e o tempo de exposição pode ser a chave para a extensão do risco. Roedores que tiveram exposição in utero ao VPA foi verificado comportamento tipo autista na prole caracterizado por diminuição nas vocalizações, aumento do comportamento estereotipado e redução na solicitação do comportamento de brincar. A exposição ao VPA produz diminuição do comportamento social, alterações no crescimento e desenvolvimento pós-natal segundo Dietert et al., 2011, e portanto foi proposto como um modelo pré-clínico de TEA (SERVADIO et al., 2016).

Um modelo bem aceito e caracterizado de infecção bacteriana é a administração de LPS, um componente de parede celular de bactérias gram-negativas. A administração sistêmica do LPS leva à ativação da resposta imune inata, gerando inflamação, febre, ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e comportamento doentio (BOKSA, 2010).

### 1.3 LPS

O LPS é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas, utilizado como modelo e amplamente aceito de infecção bacteriana (BAHARNOORI et al., 2012; BOKSA, 2010; KIRSTEN; TARICANO; MAIORKA, et al., 2010; PENTEADO et al., 2014). O LPS logo após ser injetado é reconhecido por macrófagos e células do sistema imune e liga-se ao receptor tipo Toll-2 e 4 (TLR-2, TLR-4) conforme descrito por Baharnoori et al., (2012), desencadeando uma cascata de transdução de sinal levando à ativação de fatores de transcrição como fator kappa B (NFkB) e subsequente transcrição de genes que codificam mediadores pró e anti-inflamatórios. Tais como citocinas, quimiocinas e proteínas do sistema do complemento. A síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL) 1 e IL-6, e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ). IL-1 e TNF-  $\alpha$  são produzidos localmente e atuam sobre fibroblastos e endotélio para induzir a sua própria síntese bem como a de IL-6 e outras citocinas.

A IL-6 circulante interage então com alvos no cérebro para induzir síntese de prostaglandinas (PG's) no hipotálamo mediada pela ciclo-oxigenase-2 (COX-2). PGs atuam em neurônios termossensíveis na área pré-ótica do hipotálamo anterior mediando o aumento na temperatura corporal central conforme descrito por Boksa (2010), ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e sintomas de *sickness behavior* ( DANTZER, 2004; PECCHI et al., 2009; YIRMIYA et al., 1994;). Temperaturas mais altas alcançadas durante a febre estimula a proliferação de células do sistema imune e desfavorece o crescimento de bactérias e vírus. Há ainda uma redução nos níveis de Ferro e Zinco diminuindo a disponibilidade deste minerais vitais no crescimento e multiplicação destes organismos ( DANTZER, 2004; HART, 1988; KLUGER, 1986). Especificamente, parece que a citocína pró-inflamatória IL-6 parece assumir um papel crítico na mediação dos efeitos da ativação imunomaterna no desenvolvimento do cérebro fetal (MEYER et al., 2009; SMITH et al., 2007).

Além das respostas inflamatórias maternas, ocorre alterações das citocinas e outros mediadores na placenta. Em estudos realizados com LPS radiomarcados injetados em ratas prenhas, foi observado o que o mesmo encontrava-se nos tecidos maternos assim como na placenta, porém não foi detectado no cérebro fetal (ASHDOWN et al., 2006). No entanto o LPS administrado induziu o aumento de citocinas TNF, IL-1 ou IL-6 na placenta e IL-1 no plasma fetal conforme descrito por Kirsten et al., (2011); Urakubo et al., (2001), e cérebro fetal (OSKVIG et al., 2012). Citocinas têm importante papel no desenvolvimento do SNC. Estes mediadores parecem induzir possíveis alterações no desenvolvimento do cérebro fetal (BOKSA, 2010).

O mecanismo pelo qual o LPS pré-natal induz alterações no cérebro fetal envolve o estresse oxidativo. Foi observado aumento nos marcadores indicativos de estresse oxidativo no cérebro fetal de ratos horas após a injeção materna de LPS assim como no cérebro da prole em idade pós-natal (PAINTLIA et al., 2004; PAINTLIA, PAINTLIA, CONTRERAS, et al., 2008).

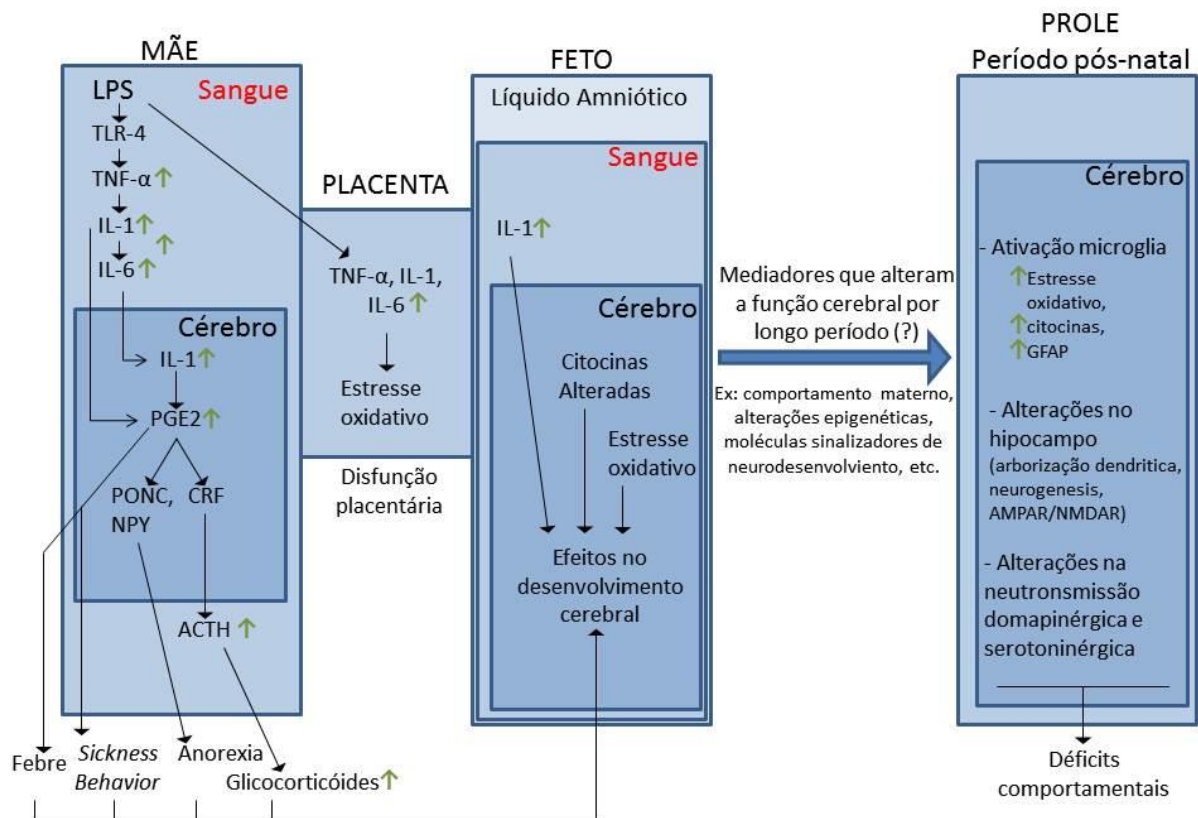
Da mesma forma, estresse materno durante a gravidez pode alterar o comportamento materno pós-parto levando a um eventual desenvolvimento anormal na prole. Roedores nascem com cérebro imaturo, sendo assim levam um significativo tempo para seu desenvolvimento, o que demonstra que um relacionamento deficiente entre mãe e filhote pode causar alterações permanentes na prole (FLEMING et al., 1999; MEYER et al., 2006).

Mudanças cerebrais a longo prazo na prole e durante a vida pós-natal foram observados após o desafio imunomaterno como, morte de matéria branca, hipomielinização, aumento de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e diminuição nos níveis de serotonina foram encontrados em várias regiões cerebrais. Alterações de vários marcadores dopaminérgicos foram por vezes

relatados, assim como o hipocampo parece ser afetado com o aumento dos receptores AMPAR/NMDA, além de alterações de transmissão sináptica e diminuição da neurogênese. Da mesma forma testes comportamentais mostraram prejuízo na inibição pré-pulso e inibição latente conforme demonstra Boksa (2010) e aumento de comportamentos repetitivos e estereotipados (SERVADIO et al., 2015).

A ativação imunológica pré-natal é, portanto altamente adequada para elucidar e contribuir para o entendimento de como infecções pré-natais podem afetar o desenvolvimento do cérebro durante a fase fetal e pós-natal. Assim bem como testes comportamentais relevantes visam validar o modelo translacional de autismo.

Figura 1 - Alterações bioquímicas na mãe, placenta, feto e período pós-natal após exposição ao LPS.



Fonte: Giusti-Paiva, 2016.

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

## **2 JUSTIFICATIVA**

O modelo animal fornece uma abordagem oportuna para perguntar se as infecções pré-natais realmente podem causar mudanças transitórias ou permanentes no SNC, e quais mecanismos são responsáveis por essas mudanças. Contribuindo assim para entendimento das correlações com os TEA permitindo desvendar alguns aspectos destas desordens, procedimentos estes impossíveis em humanos por razões éticas. O modelo proposto visa mimetizar infecções durante a gestação, com a administração de LPS, injetado intraperitoneal (IP) em ratas prenhas no 9<sup>o</sup>.5 e 16<sup>o</sup> dia de gestação (GD9.5 e 16) e na dose de 100 µg/Kg e 500 µg/Kg respectivamente, e posteriormente análise comportamental da prole.

### 3 OBJETIVOS

A seguir será descrito o objetivo geral e específicos do presente estudo.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações comportamentais da prole de ratas submetidas à administração de LPS durante a prenhez.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar por meio de testes comportamentais um modelo experimental translacional de autismo;
- b) Caracterizar a expressão de c-Fos em encéfalos de ratos submetidos ao teste de comportamento de brincar (*Play Behavior*) identificando possível diferença na ativação de áreas cerebrais entre os grupos experimentais.



## 4 MÉTODOS

A seguir será descrita metodologia e análise estatística utilizadas no presente estudo.

### 4.1 ANIMAIS

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

#### 4.1.2 Número de animais

O número de animais que receberam tratamento no GD9.5 foi de 36 e no GD16 foi de 23, perfazendo um total de 59 animais que tiveram ninhadas com 8 filhotes (com 4 machos e 4 fêmeas), totalizando 472 filhotes, destes sendo 236 filhotes machos e 236 filhotes fêmeas que foram submetidos aos diferentes procedimentos experimentais descritos adiante.

#### 4.1.3 Acasalamento

Ao final do dia as ratas foram colocadas em gaiolas com machos sexualmente experientes para o acasalamento na proporção de duas fêmeas para um macho, e deixados juntos por quatro dias. Pela manhã do dia seguinte foi realizado o lavado vaginal e logo após análise. O dia em cuja manhã foi constatada a presença de espermatozoides no lavado vaginal foi considerado como sendo o dia zero de gestação, denominado (GD0). As ratas prenhas foram separadas individualmente em uma caixa até o nascimento dos filhotes.

O dia de nascimento dos filhotes foi considerado como dia zero (PND0).

### 4.2 DROGAS UTILIZADAS

LPS obtido a partir de *Escherichia coli*, Sigma, sorotipo 026: B6, marca Sigma-Aldrich, foi dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) e estocado em alíquotas de 10 mg/ml e posteriormente diluídos para administração nas ratas prenhas nas doses de 100 µg/kg no GD9.5

ou 500 µg/kg no GD16, aplicado por via intraperitoneal (i.p). Estas doses foram escolhidas com base em estudos prévios que demonstraram induzir alterações comportamentais, endócrinas e aumentar as concentrações de citocinas na placenta decorrentes da administração de LPS. O GD9.5 e GD16 foram escolhidos pois em ratos estes períodos compreendem o 1º e 2º trimestre de gestação em humanos respectivamente (CLANCY et al., 2007). O grupo controle recebeu solução salina (1ml/kg, i.p.).

#### 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado em duas etapas sendo, a primeira etapa nas ratas prenhas e segunda nos filhotes durante a infância e adolescência.

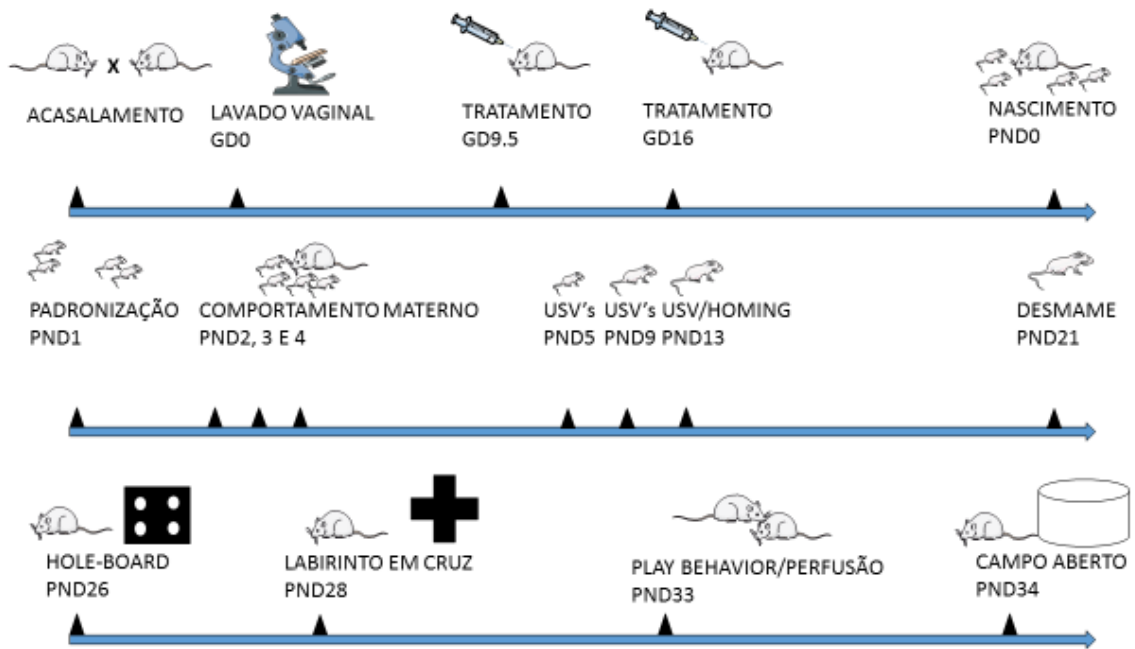
No GD9,5 ou no GD16 as fêmeas foram tratadas com LPS ou SAL. A seguir foi avaliado o comportamento doentio (*Sickness behavior*) das ratas, com avaliação no teste de campo aberto e ingestão alimentar e ganho de peso durante 24 horas.

O dia de nascimento dos filhotes foi considerado PND0. Um dia após o nascimento PND1, as ninhadas foram verificadas quanto peso e ao número de filhotes nascidos, e logo após padronizados em 8 filhotes, sendo 4 machos e 4 fêmeas. O comportamento materno (CM) foi avaliado nos PND2, 3 e 4.

De cada ninhada, 1 filhote macho e 1 fêmea foram utilizados para avaliar a vocalização (realizados nos PND5, 9 e 13) e submetidos ao teste de *homing* no PND13); 1 filhote macho e 1 fêmea para o teste de *hole-board* no PND26, 1 filhote macho e 1 fêmea para teste de labirinto em cruz elevado no PND28 e no campo aberto no PND34, e 1 filhote macho e 1 fêmea para o teste de *play behaviour* no PND33 e 90 minutos após o referido teste os animais foram perfundidos com paraformaldeído a 4% (PFA 4%) para fixação dos tecidos encefálicos para realização de imunistoquímica para c-fos. Os animais que passaram pelos testes de vocalização e *homing* foram pesados nos PND5, 9, 13, 21, 26, 28, 33 e 34, para avaliação do crescimento.

Todos os testes comportamentais da prole foram realizados entre 7h e 13h. A figura a seguir ilustra os procedimentos ou testes comportamentais realizados ao longo do período experimental.

Figura 2 – Delineamento experimental.



Fonte: Do autor.

Nota: A figura 2 mostra o delineamento experimental ilustrando os procedimentos ou testes comportamentais realizados ao longo do período experimental.

#### 4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS NAS RATAS PRENHAS

A seguir será descrito os testes comportamentais aplicados nas ratas prenhas.

##### 4.4.1 Campo aberto

No GD9.5 ou no GD16, 2h após de receberem LPS ou SAL, as ratas prenhas foram submetidas ao teste de campo aberto para avaliação da atividade motora, evidenciados pela distância percorrida e tempo de imobilidade para caracterizar o comportamento doenteio. As ratas foram colocadas individualmente em uma arena circular de acrílico com diâmetro de 60 cm e paredes com 50 cm de altura. Cada animal foi colocado no centro da arena e filmado por 5 min para posterior análise e em seguida o aparato foi limpo com solução de etanol a 5%. Foi realizado análise automática utilizando o software Ethovision XT versão 9.0.

Fotografia 1 – Campo aberto.



Fonte: Do autor.

Nota: A fotografia 1 mostra do aparato de *campo aberto* utilizado para avaliação da distância percorrida e tempo de imobilidade dos animais 2h após a aplicação do LPS ou SAL.

#### 4.4.2 Ingestão alimentar e ganho de peso

No momento da aplicação de LPS ou SAL, os animais foram pesados e a ração foi retirada. Duas horas após a aplicação, uma porção de ração previamente pesada foi disponibilizada aos animais. No dia seguinte, 24h após os tratamentos, a ração foi pesada para verificação da quantidade de ração consumida e os animais pesados. Este teste foi realizado para avaliação da anorexia e perda de peso provocada pelo LPS (DANTZER, 2004).

#### 4.4.3 Comportamento materno (CM)

No dia da padronização as ratas e sua prole foram alojadas em caixas de acrílico transparentes para facilitar a observação. Nos PND2, 3 e 4 foi analisado o CM. O CM foi

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

Foram avaliados os parâmetros de comportamentos maternos (cifose amamentando os filhotes, deitada sobre os filhotes, lambendo os filhotes, em posição passiva alimentando os filhotes, *self-grooming* materno e construindo o ninho), e não maternos (alimentando sem os filhotes, explorando fora do ninho e não explorando fora do ninho).

Fotografia 2 – Comportamento materno típico.



Fonte: Vilela, 2011.

Nota: A fotografia 2 mostras uma rata em comportamento materno típico cuidando dos filhotes.

#### 4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS NA PROLE

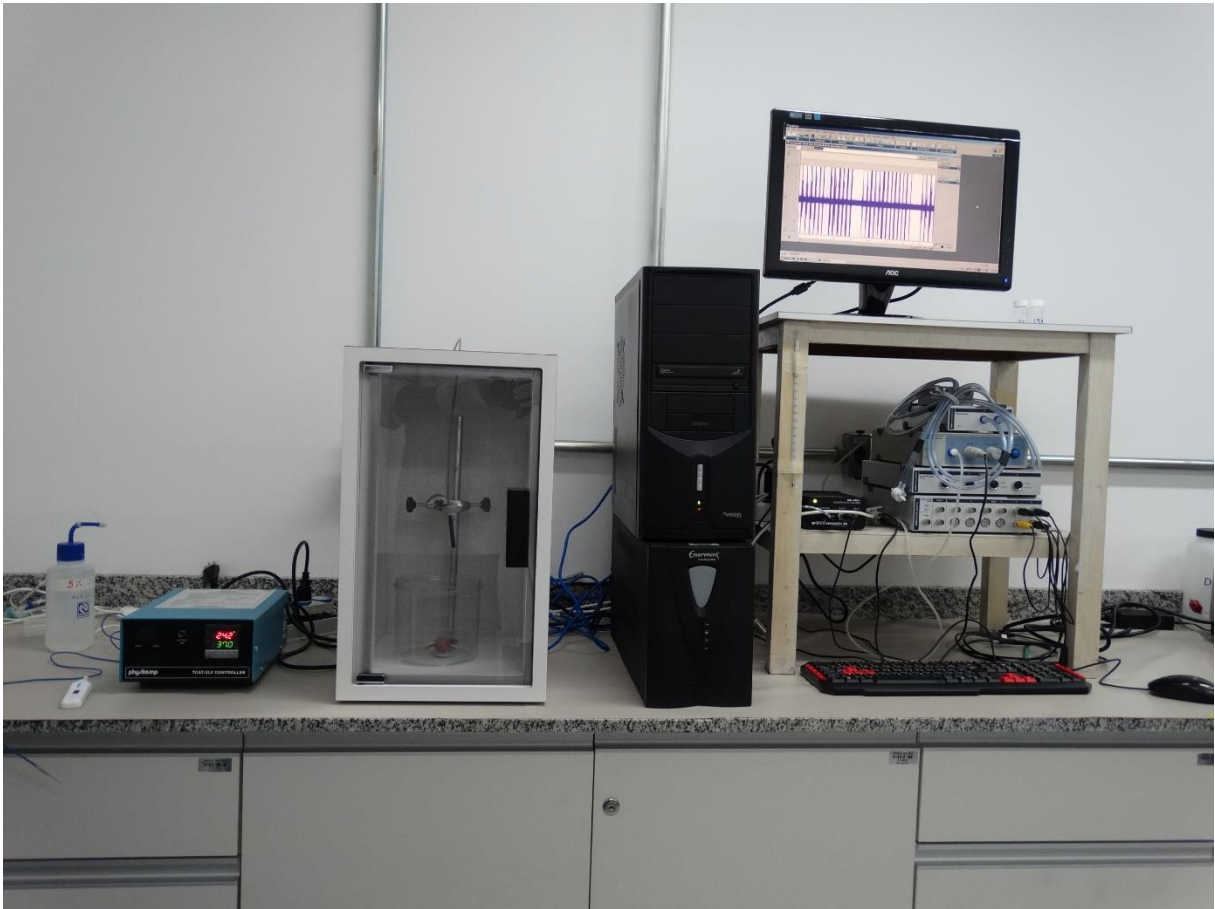
A seguir será descrito os testes comportamentais aplicados na prole.

##### 4.5.1 Vocalização ultrassônica (USV)

O teste de USV foi aplicado nos filhotes nos PND5, 9 e 13. Os filhotes foram isolados por 10 minutos, em sala com temperatura mantida a 25°C e posteriormente submetidos ao teste durante 3 min. O teste consiste em colocar o filhote dentro de uma caixa com isolamento acústico, com um microfone de captação ultrassônica montado de forma suspensa, conectado a um amplificador (*Microphone Amplifier Med Associates inc*, modelo ANL-940-1) e através do Software LabChart as gravações foram apresentadas em um computador e armazenadas como espectrogramas, onde foram posteriormente analisadas.

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

Fotografia 3 – Estação de gravação de vocalizações.



Fonte: Do autor.

Nota: A fotografia 3 mostra a estação montada para gravação das emissões de USV's dos filhotes.

#### 4.5.2 Motivação para encontrar o ninho (*Homing*)

O teste de *homing* foi aplicado no PND13, onde o filhote foi isolado por 30 min. antes do teste.

O teste consiste em colocar o filhote em uma caixa de polipropileno a qual foi dividida em quatro partes iguais de maravalha, sendo  $\frac{3}{4}$  com maravalha limpa, e  $\frac{1}{4}$  com maravalha proveniente do ninho materno. O filhote foi colocado na porção com maravalha limpa e virado com a cabeça para a parede contrária à porção com maravalha do ninho, na extremidade oposta da mesma.

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



O teste teve duração de 3 min onde foi avaliado o tempo de latência para o filhote para entrar na porção com maravalha do ninho (MELANCIA et al., 2017).

Fotografia 4 – *Homing*.



Fonte: Do autor.

Nota: A fotografia 4 mostra uma caixa preparada para o teste de *homing* com  $\frac{3}{4}$  de maravalha limpa e  $\frac{1}{4}$  de maravalha proveniente do ninho.

#### 4.5.3 Tábua de buracos (*Hole-board*)

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

Um dia antes do teste todos os animais (inclusive os que não passariam pelo teste), foram levados a sala de comportamento para ambientação e lá permaneceram por 24h, no mesmo dia o filhote que passaria pelo teste foi ambientado ao aparato sem a tábua de buracos por 10 min. No dia seguinte à ambientação o filhote já ambientado passou pelo teste, o qual foi gravado para posterior análise. O teste foi realizado no PND26 e teve duração de 15 min.



Foi avaliada a frequência com que os animais colocaram a cabeça até a altura das orelhas dentro dos buracos. Este teste está associado a atividade exploratória (KUMAR; SHARMA, 2016b) e comportamento estereotipado e repetitivo (SERVADIO et al., 2016). Cada animal foi colocado no centro do aparato e filmado por 15 min para posterior análise e em seguida o aparato foi limpo com solução de etanol a 5%.

Fotografia 5 – *Hole-board*.



Fonte: Do autor.

Nota: A fotografia 5 mostra o aparato de *hole-board* montado para o teste.

#### 4.5.4 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado consiste em um aparato com dois braços abertos e dois braços fechados, cada braço medindo 50 cm de comprimento e 10 cm de largura e elevados a 50 cm do solo. Filhotes no PND28 foram isolados individualmente por 10 minutos e logo em seguida foram colocados no aparato com o focinho voltado para um dos braços fechados. Foi avaliado o percentual do tempo dispendido no braço aberto. Cada animal foi filmado por 5

minutos para posterior análise utilizando o software Ethovision XT versão 9.0 e em seguida o aparato foi limpo com solução de etanol a 5%.

Fotografia 6 – Labirinto em cruz elevado.



Fonte: Do autor.

Nota: A fotografia 6 mostra o aparato de labirinto em cruz elevado preparado para o teste.

#### 4.5.5 Campo aberto

Filhotes no PND34 foram submetidos ao teste de Campo Aberto. Os animais foram colocados individualmente em uma arena circular de acrílico com diâmetro de 60 cm e paredes com 50 cm de altura. Cada animal foi colocado no centro da arena e filmado por 5 minutos para posterior análise utilizando o software Ethovision XT versão 9.0 e em seguida o aparato foi limpo com solução de etanol a 5%.

Fotografia 7 – Campo aberto.



Fonte: Do autor.

Nota: A fotografia 7 mostra o aparato de *campo aberto* utilizado para verificar a mobilidade dos filhotes.

#### 4.5.6 Comportamento de brincar (*Play behavior*)

O teste de *play behavior* foi aplicado no PND33 e consistiu em colocar dois animais da mesma idade em uma caixa de vidro de 40 cm largura x 40 cm comprimento x 40 cm altura forrada com maravalha e verificar a interação entre eles.

Da mesma forma que o *hole-board*, um dia antes do teste todos os animais (inclusive os que não passariam pelo teste), foram levados a sala de comportamento para ambientação e lá permaneceram por 24h, no mesmo dia o filhote que passaria pelo teste foi ambientado ao aparato individualmente por 10 min. No dia do teste, os animais previamente ambientados foram isolados por 3,5h. Cada dupla de animal isolado e com mesmo tratamento (animais LPS foram confrontados com animais LPS e animais SAL foram confrontados com animais SAL) foram filmados por 15 min no dia do teste em uma arena quadrada de vidro de 40 largura x 40



comprimento x 40 de altura forrada com maravalha. O teste foi conforme descrito por (MELANCIA et al., 2017).

Foram avaliadas as duplas e os seguintes parâmetros foram analisados: 1) frequência de *pinning*; 2) frequência de *pouncing*; 3) tempo de exploração anogenital; 4) tempo de perseguição.

Fotografia 8 – *Play behavior*.



Fonte: Do autor.

Nota: A fotografia 8 mostra o aparato montado para teste de *play behavior*.

#### 4.5.7 Perfusão

90 min após o teste de comportamento de brincar os animais foram anestesiados com tribromoetanol (TBE), na dose de 250 mg/kg de peso corporal e perfundidos através de uma punção intracardíaca com solução SAL heparinizada (1ml/L) seguida de fixador paraformaldeído 4% (PFA 4%) em solução de tampão fosfato (PBS 0,1M). Os encéfalos foram então removidos e armazenados em fixador PFA 4% PBS 0,1M durante 4 horas e em seguida

transferidos para uma solução de sacarose 30% em PBS 0,1M e armazenados à 4°C. Posteriormente os encéfalos foram seccionados em cortes de 30µm de espessura e em duplicatas utilizando-se um Criostato, e coletados em PBS 0,01M, logo após passaram por imunistoquímica (VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2014). Nestes cortes de tecidos foram realizadas marcações de áreas específicas. Os cortes não utilizados foram armazenados em solução *anti-freezing*.

#### 4.5.8 Imunoistoquímica

A imunistoquímica foi iniciada imediatamente após os encéfalos serem cortados. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1%) por 30 minutos e os cortes foram lavados com PBS 0,01M por 3 vezes a 5 minutos. Posteriormente, foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas em solução de albumina bovina 5% em PBS 0,1M durante uma hora.

Os cortes foram processados para imunorreatividade para c-Fos, ficando incubados durante a noite com o anticorpo primário anti-fos de coelho (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA) diluído 1:10.000 em PBS 0,1 M contendo 2% de Normal Goat Serum e 0.3% Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Após lavagem, os cortes foram incubados com segundo anticorpo biotilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), diluído 1:200 em 1.5% de Normal Goat Serum – PBS 0,1M seguido pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Elite) 1:200 em PBS 0,1M ambos por 1 hora a temperatura ambiente. Para coloração, foi empregado diaminobenzidina (DAB, Sigma -Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) intensificado com cloreto de cobalto 1% (CoCl<sub>2</sub> 1%) e sulfato de níquel 1% (NiSO<sub>4</sub> 1%). O produto da reação conferiu uma coloração violeta escuro – preto ao núcleo (VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2014).

Por último, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas. Para solução de gelatina foi utilizado 0,625% gelatina (Gelatina Albrecht), azida de sódio a 0,04% (NaN<sub>3</sub> 0,04%) e água destilada 500ml. As lâminas depois de montadas com os cortes foram secas a temperatura ambiente, desidratadas com xileno e cobertas com Entellan e lamínulas.

As áreas encefálicas estudadas, córtex cingulado (Cing) +3,24mm anterior ao Bregma, área pré-límbica (Prl) +3,24mm anterior ao Bregma, córtex piriforme (Pir) +3,24mm anterior ao Bregma, córtex insular agranular ventral (AIV) 3,24mm anterior ao Bregma, córtex insular agranular dorsal (AID) +3,24mm anterior ao Bregma, núcleo accubens core (AcbC) +0,72mm anterior ao Bregma, núcleo accubens shell (AcbSh) +0,72mm anterior ao Bregma, habênulas (HB) -2,72mm posterior ao Bregma, amígdala baso-lateral (BLA) -2,72mm posterior ao

Bregma e amígdala baso-medial (BMA) -2,72mm posterior ao Bregma, todas as áreas foram identificadas e delimitadas de acordo com o atlas (PAXINOS; WATSON, 2007). As células imunorreativas para c-Fos foram contadas manualmente com auxílio de um microscópio Nikon modelo H55L no aumento de 10 vezes (10 x). As imagens foram capturadas e o número de cortes representativos para cada grupo experimental foi de 6.

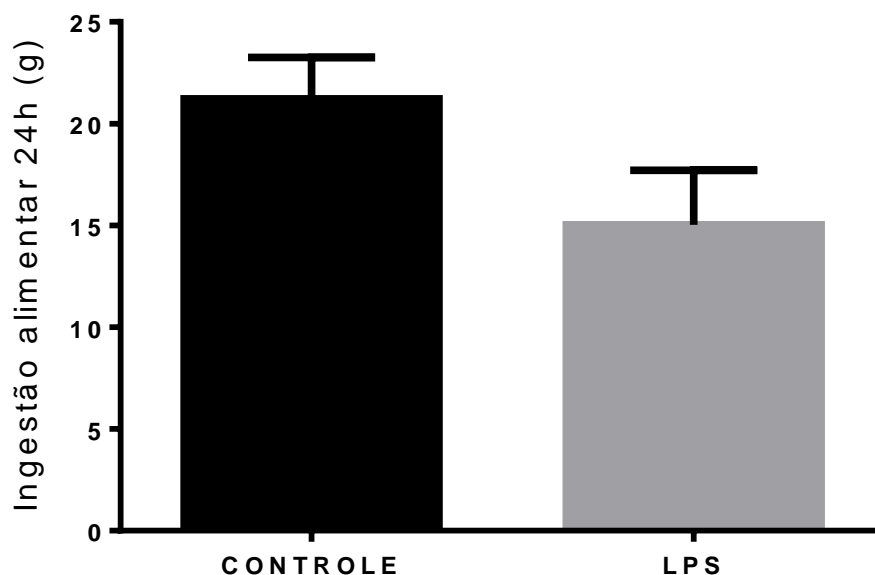
#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o *Software GraphPad Prisma versão 6.0* e expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Para comparação entre os grupos foi utilizado *t-student test*, e o teste de correlação entre os parâmetros do *play behavior* e as áreas imunoativadas por c-fos. Os resultados obtidos com valores inferiores 0,05 ( $P < 0.05$ ) foram considerados significativos.

## 5 RESULTADOS

No gráfico 1 observa-se que os animais que receberam LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  no GD9.5;  $n = 7$ ) tenderam a ingerir menor quantidade de ração durante às 24h após o tratamento em comparação com os animais que receberam SAL ( $n = 5$ ), porém não houve diferença significativa entre os grupos ( $p=0,1191$ ). Da mesma forma no gráfico 2 observamos uma tendência dos animais que receberam LPS a percorrer menor distância no campo aberto em comparação com os animais que receberam SAL, porém não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p=0,1288$ ). Tais resultados indicam que a dose de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  aplicado no GD9.5 não foi efetiva em induzir *sickness behavior* em ratas prenhas.

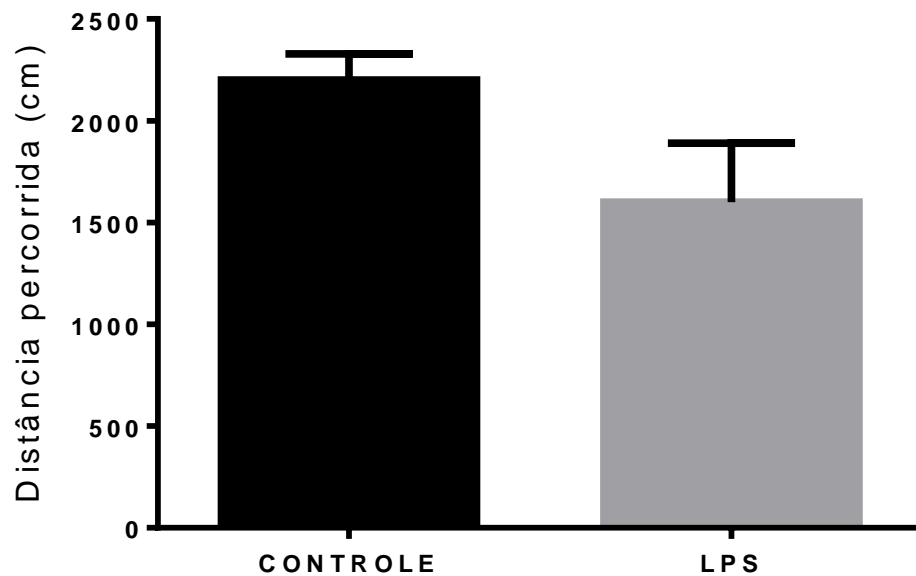
Gráfico 1 – Consumo de ração durante 24h após aplicação de (LPS 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 1 mostra o consumo de ração em gramas durante 24h após a aplicação de LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no GD9.5. Valores expressos em média  $\pm$  SEM.

Gráfico 2 – Distância percorrida no campo aberto 2h após aplicação de (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.



Fonte: Do autor.

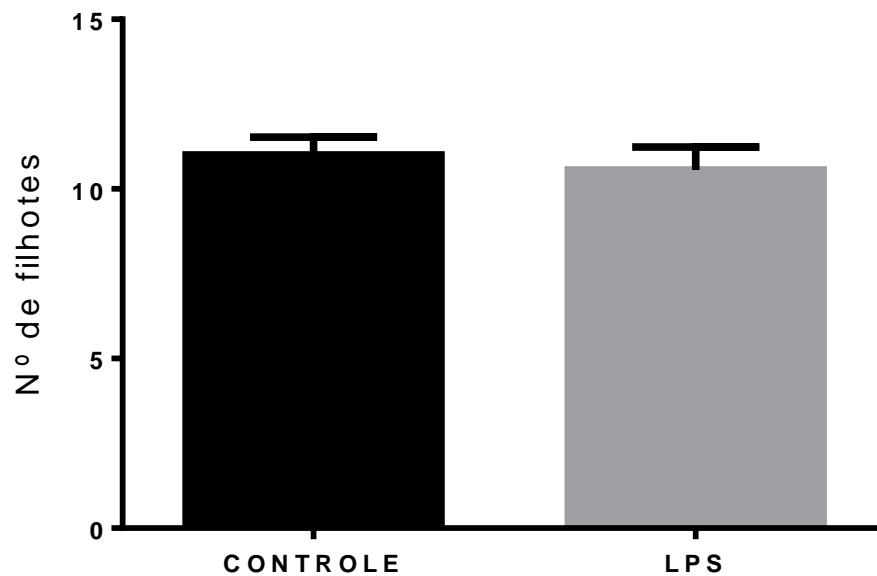
Nota: O gráfico 2 mostra a distância percorrida pelos animais no campo aberto 2h após da aplicação de LPS (100 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) em ratas no GD9.5 de prenhez. Valores expressos em média ± SEM.

Resultados quanto ao número de filhotes nascidos, peso das ninhadas não padronizadas e padronizadas no PND1 filhos de mães que receberam 100 µg de LPS ou 1 ml/kg de SAL no GD9.5 (N=7 e N=5) são observados nos gráficos 3, 4 e 5 respectivamente.

Os gráficos 3, 4 e 5, mostram que não houve diferença quanto ao número de filhotes nascidos ( $p=0,6087$ ), quanto ao peso da ninhada não padronizada no PND1 ( $p=0,5312$ ) e quanto ao peso da ninhada padronizada N=8 no PND1 ( $p=0,7921$ ) dentre os grupos de filhotes de ratas que receberam LPS em comparação com grupo SAL.



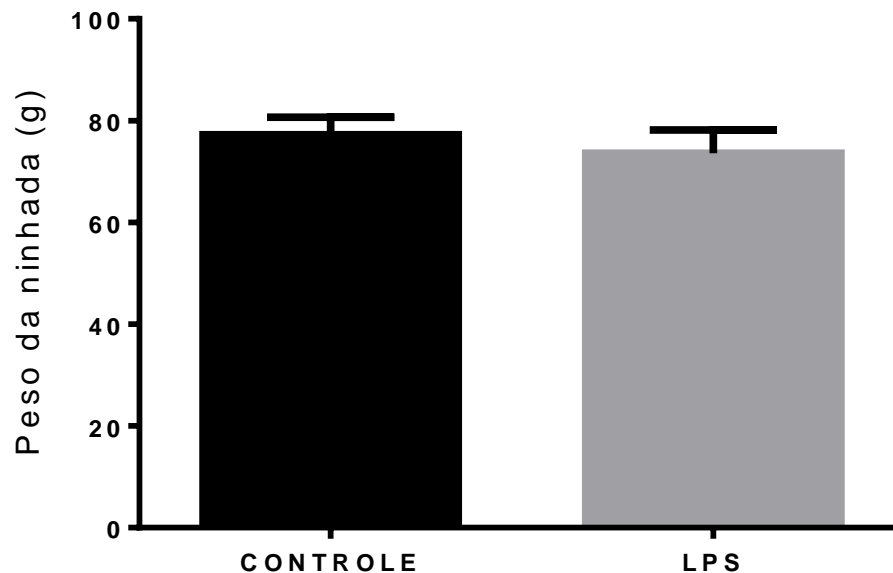
Gráfico 3 – Número de filhotes nascidos (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 3 mostra o número de filhotes nascidos de mães que receberam LPS (100 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no GD9.5. Valores expressos em média ± SEM.

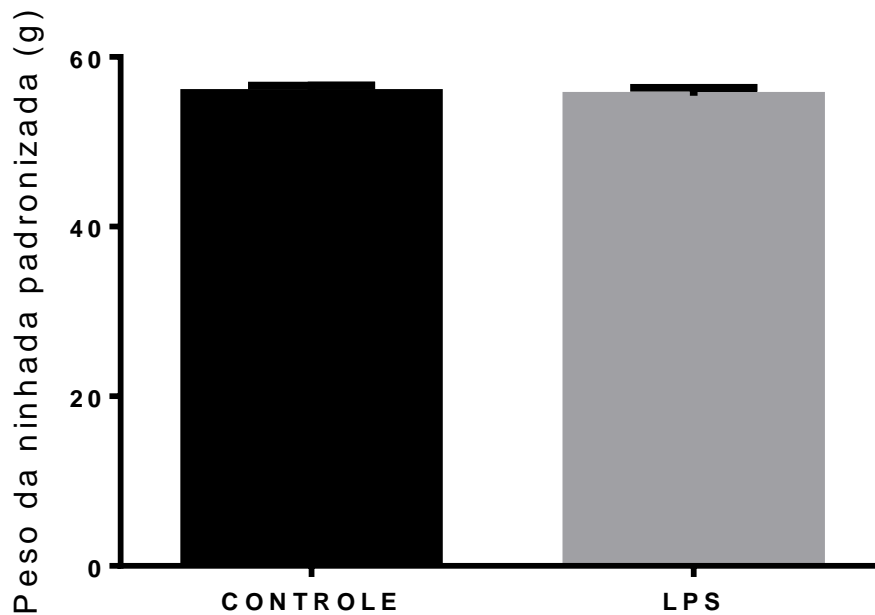
Gráfico 4 – Peso da ninhada não padronizada (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 4 mostra o peso da ninhada não padronizada no PND1 filhotes de mães que receberam LPS (100 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no GD9.5. Valores expressos em média ± SEM.

Gráfico 5 – Peso da ninhada padronizada (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 5 mostra o peso da ninhada pós padronização em N=8 no PND1 filhotes nascidos de mães que receberam LPS (100 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no GD9.5. Valores expressos em média ± SEM.

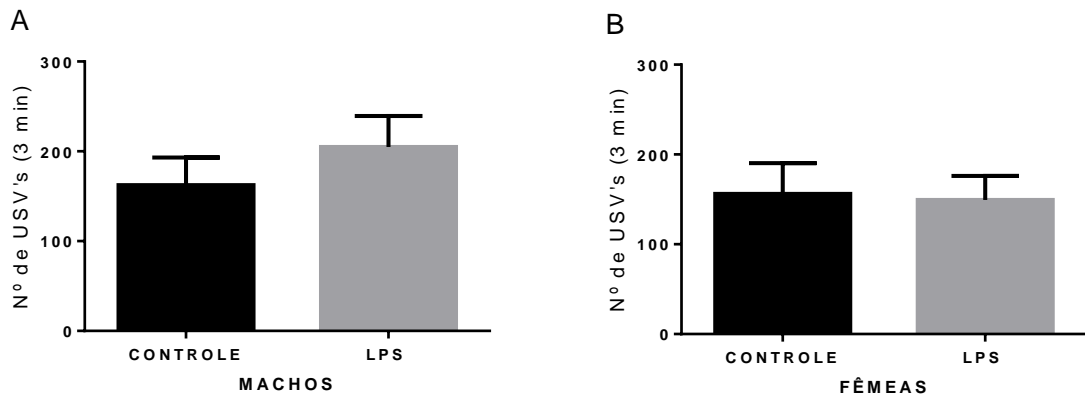
O número de UVS's nos PND5, 9 e 13 dos filhotes machos e fêmeas de mães que receberam LPS ou SAL no GD9.5 (N=18/grupo) são mostrados nos gráficos 6, 7 e 8 respectivamente.

O gráfico 6 (A) mostra que não houve diferença entre os grupos ( $p=0,3646$ ) dos filhotes machos filhos de mães que receberam tratamento com LPS ou SAL no PND5. Da mesma forma O gráfico 6 (B) mostra que também não houve diferença quanto ao número de vocalizações nos filhotes fêmeas ( $p=0,8776$ ).

O gráfico 7 (A) mostra uma que não houve diferença entre os grupos ( $p=0,6192$ ) de filhotes machos filhos de mães tratadas com LPS ou SAL no PND9. Da mesma forma o gráfico 7 (B) mostra que não houve diferença quanto ao número de vocalizações dos filhotes fêmeas ( $p=0,9699$ ).

O gráfico 8 (A) mostra que não houve diferença quanto ao número de vocalizações nos filhotes machos filhos de mães tratadas com LPS ou SAL ( $p=0,5088$ ) no PND13. Da mesma forma o gráfico 8 (B) mostra que não houve diferença entre os filhotes fêmeas de mães que receberam LPS ou SAL ( $p=0,4944$ ).

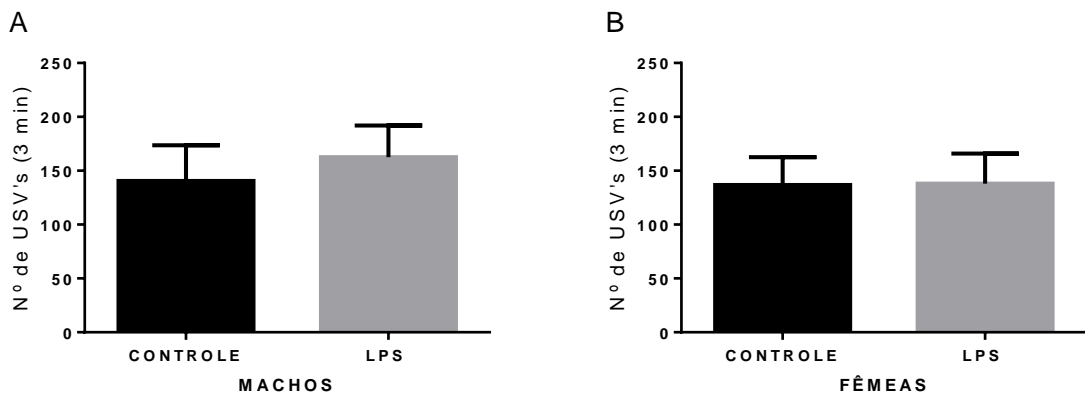
Gráfico 6 – Vocalizações no PND5 (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 6 mostra o número de vocalizações ultrassônicas (USV's) emitidas durante 3 min dos filhotes (A) machos e (B) fêmeas filhos de mães tratadas com LPS (100 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) avaliado no PND5. Valores expressos em média ± SEM.

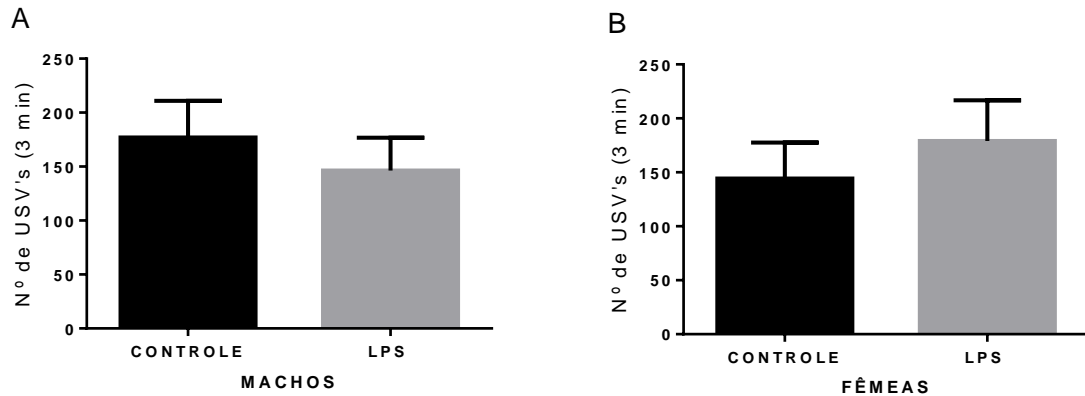
Gráfico 7 – Vocalizações no PND9 (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 7 mostra o número de vocalizações ultrassônicas (USV's) emitidas durante 3 min pelos filhotes (A) machos e (B) fêmeas filhos de mães tratadas com LPS (100 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) avaliado no PND9. Valores expressos em média ± SEM.

Gráfico 8 – Vocalizações no PND13 (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.



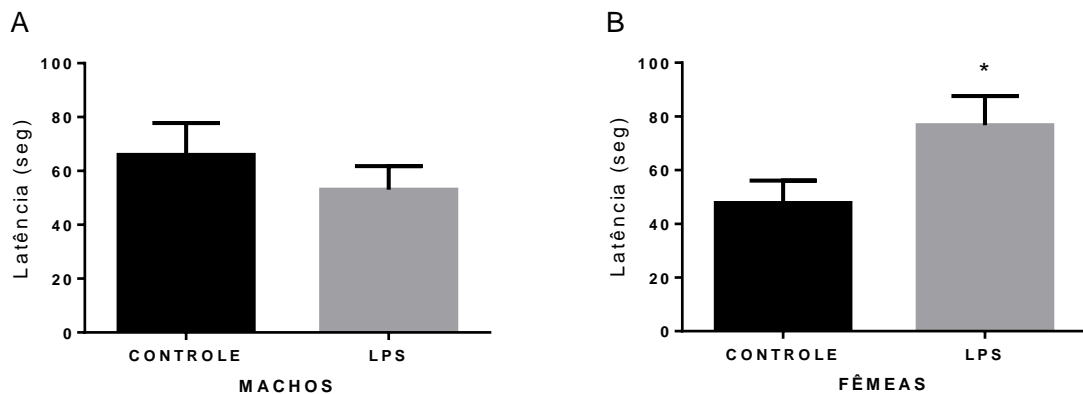
Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 8 mostra o número de vocalizações ultrassônicas (USV's) emitidas durante 3 min pelos filhotes (A) machos e (B) fêmeas filhos de mães tratadas com LPS (100 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) avaliado no PND13. Valores expressos em média  $\pm$  SEM.

No gráfico 9 observa-se o desempenho dos filhotes no teste de *homing*, no qual é avaliado a latência para entrada na porção com maravalha do ninho dos filhotes machos e fêmeas de mães que receberam LPS ou SAL no GD9.5 (N=18/grupo).

O gráfico 9 (A) mostra que não houve diferença entre os filhotes machos de ratas tratadas com SAL ou LPS ( $p=0,3874$ ). Já o gráfico 9 (B) mostra que com relação aos filhotes fêmeas houve um maior tempo de latência para entrada na porção com a maravalha do ninho para os filhotes de mães tratadas com LPS em comparação aos filhotes de mães SAL, apresentando diferença significativa entre os grupos ( $*p=0,0422$ ).

Gráfico 9 – Latência no teste de *homing* (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.

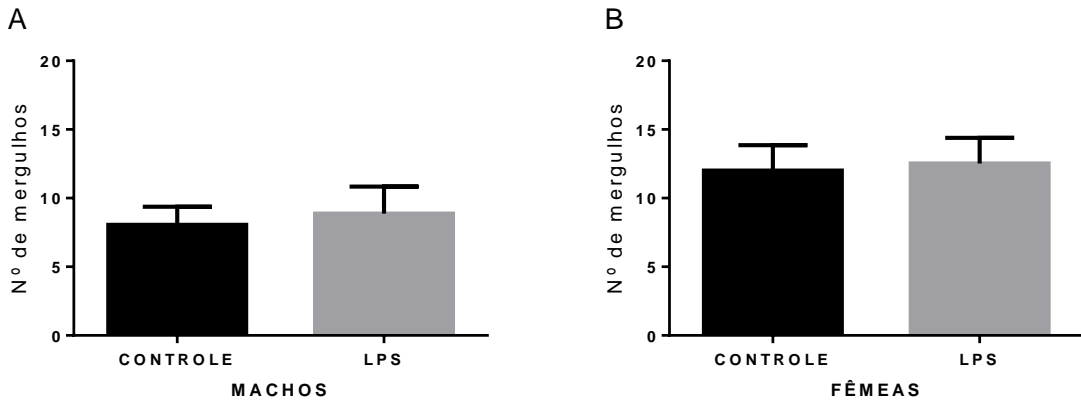


Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 9 mostra o tempo de latência em segundos para entrada na porção com maravalha do ninho dos filhotes (A) machos e (B) fêmeas filhos de mães tratadas com LPS (100 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.), avaliado no PND13. Valores expressos em média ± SEM. \* $p < 0,05$ .

O gráfico 10 mostra o número de mergulhos (*head dipping*) dos filhotes machos e fêmeas de mães que receberam LPS ou SAL no GD9.5 (N=18/grupo) no teste *hole-board*. O gráfico 10 (A) mostra que não houve diferença quanto ao número de mergulhos dos filhotes machos de ratas tratadas com LPS em comparação com os filhotes de ratas tratadas com SAL ( $p=0,7335$ ). Da mesma forma o gráfico 10 (B) mostra que não houve diferença quanto ao número de vezes em que os filhotes fêmeas filhotes de mães tratadas com LPS colocaram a cabeça nos buracos em comparação com filhotes de mães SAL ( $p=0,8419$ ).

Gráfico 10 – Número de mergulhos no *hole-board* (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.

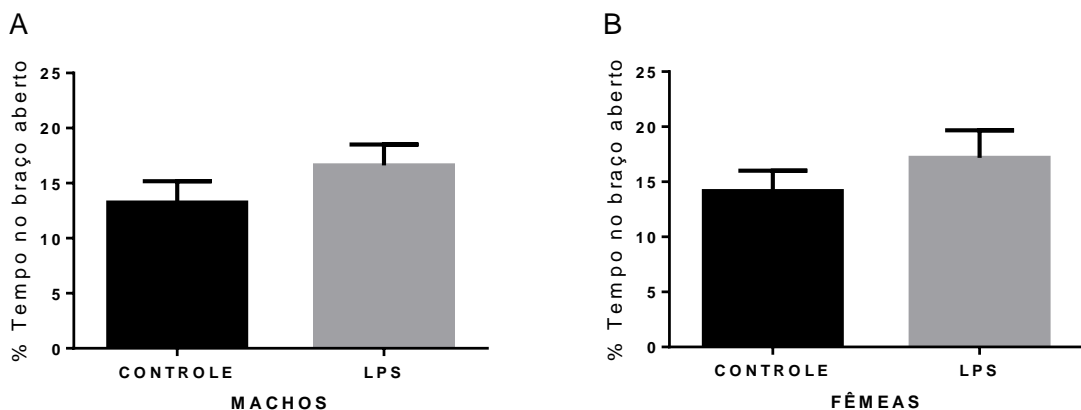


Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 10 mostra o número de mergulhos nos buracos do *hole-board* durante 15 min dos filhotes (A) machos e (B) fêmeas filhos de mães tratadas com LPS (100 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) avaliado no PND26. Valores expressos em média ± SEM.

O gráfico 11 (A) mostra o percentual de tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado dos filhotes machos de mães que receberam LPS ou SAL no GD9.5 (N=18/grupo). Não havendo diferença entre os grupos ( $p=0,2215$ ). O gráfico 11 (B) mostra que da mesma forma, não houve diferença no tempo de exploração do braço aberto pelos filhotes fêmeas de ratas tratadas com LPS ou SAL no labirinto em cruz elevado ( $p=0,3414$ ).

Gráfico 11 – Tempo gasto no braço aberto do labirinto em cruz elevado (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 11 mostra o Percentual de tempo gasto no braço aberto do labirinto em cruz elevado durante 5 min dos filhotes (A) machos e (B) fêmeas filhos de mães tratadas com LPS (100 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no PND28. Valores expressos em média ± SEM.

Os parâmetros observados no *play behavior* foram: número de *pouncings*, número de *pinnings*, número de *partial rotations*, tempo gasto perseguindo o oponente e tempo de exploração anogenital dos filhotes machos (gráficos 12 A-E) e fêmeas (gráficos 13 A-E) de ratas que receberam LPS ou SAL no GD9.5 (N=18/grupo).

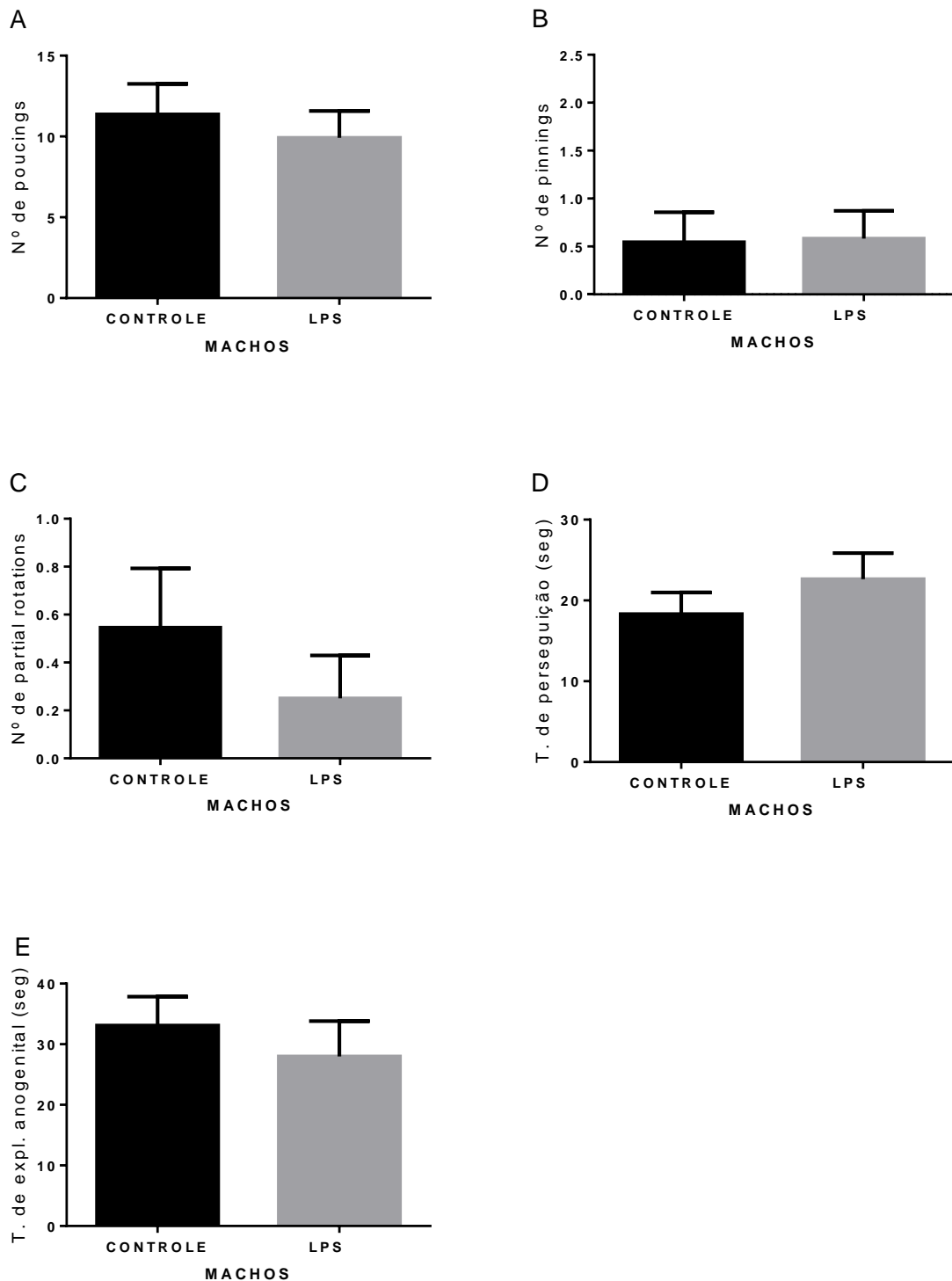
O gráfico 13 (A) mostra que ao buscar pelas brincadeiras (*pouncings*) dos filhotes machos de ratas tratadas com LPS não foi alterada quando comparado aos animais SAL ( $p=0,5705$ ). Da mesma forma o gráfico 13 (A) mostra que os filhotes fêmeas de ratas tratadas com LPS não alteram o número de *pouncings* em comparação aos filhotes fêmeas de mães que receberam SAL ( $p=0,2688$ ). O gráfico 12 (B) mostra que não houve diferença em aceitar as brincadeiras (*pinnings*) entre os grupos de filhotes machos de mães tratadas com LPS ou SAL ( $p=0,9296$ ). Da mesma forma o gráfico 13 (B) mostra que não houve diferença entre os grupos de filhotes fêmeas de mães tratadas com LPS ou SAL ( $P=0,7776$ ).

O gráfico 12 (C) mostra que não houve diferença entre os animais machos filhotes de ratas tratadas com LPS em praticar o *partial rotation* em comparação com os animais filhotes de ratas tratadas com SAL ( $p=0,3387$ ). Da mesma forma o gráfico 13 (C) mostra que entre os filhotes fêmeas não houve diferença entre os grupos filhotes de mães LPS ou SAL ( $p=0,8018$ ).

O gráfico 12 (D) mostra que não houve diferença entre os grupos de animais machos filhotes de ratas tratadas com LPS ou SAL em perseguir mais o parceiro ( $p=0,3197$ ). O gráfico 13 (D) mostra que da mesma forma não houve diferença entre os grupos de animais fêmeas filhotes de mães tratadas com LPS ou SAL ( $p=0,5417$ ).

O gráfico 12 (E) mostra que não houve diferença na exploração da região anogenital do parceiro entre os filhotes machos de mães tratadas com LPS em comparação com os filhotes de mães SAL ( $p=0,5111$ ). Da mesma forma o gráfico 13 (E) mostra que não houve diferença entre os filhotes fêmeas de mães tratadas com LPS em explorar a região anogenital do parceiro em comparação com os filhotes de mães SAL ( $p=0,2289$ ).

Gráfico 12 – Parâmetros avaliados no teste de *play behavior* nos filhotes machos (LPS 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.

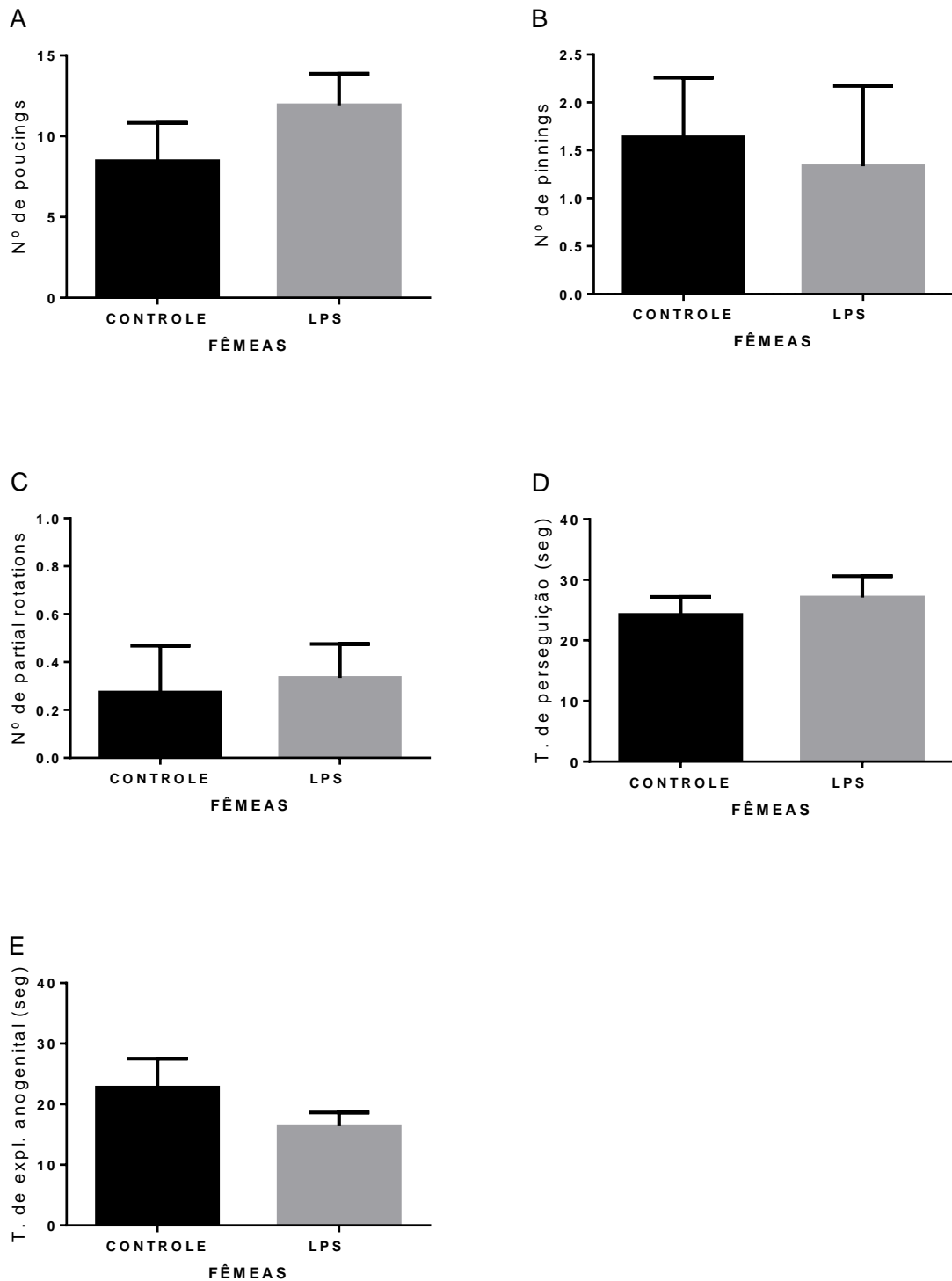


Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 12 mostra os parâmetros avaliados no teste de *play behavior* nos filhotes machos de mães tratadas com LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no PND33. N=9 e N=14: (A) N° de poucings; (B) N° de pinnings; (C) N° de partial rotations; (D) tempo de perseguição; tempo de exploração anogenital. Valores expressos em média  $\pm$  SEM.



Gráfico 13 – Parâmetros avaliados no teste de *play behavior* nos filhotes fêmeas (LPS 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.

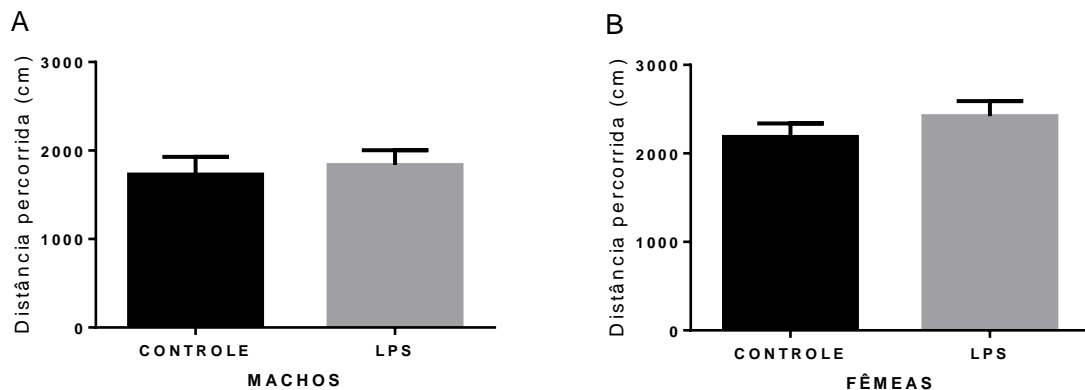


Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 13 mostra os parâmetros avaliados no teste de *play behavior* nos filhotes fêmeas de mães tratadas com LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no PND33. N=9 e N=14: (A) N° de *poucings*; (B) N° de *pinnings*; (C) N° de *partial rotations*; (D) tempo de perseguição; tempo de exploração anogenital. Valores expressos em média  $\pm$  SEM.

O gráfico 14 (A) mostra que não houve diferença ( $p=0,6823$ ) quanto a distância percorrida no campo aberto pelos filhotes machos de mães que receberam LPS ou SAL no GD9.5 ( $N = 18/\text{grupo}$ ), ( $p=0,6823$ ). Da mesma forma o gráfico 14 (B) mostra que não houve diferença entre os grupos de filhotes (B) fêmeas de mães tratadas com LPS ou SAL ( $p=0,3139$ ).

Gráfico 14 – Distância percorrida no campo aberto (LPS 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5

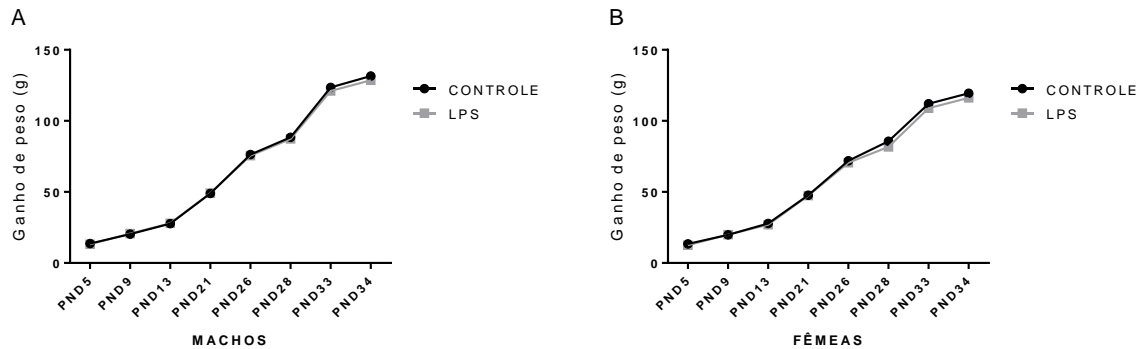


Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 14 mostra a distância percorrida em cm no campo aberto durante 5 min dos filhotes (A) machos e (B) fêmeas filhos de mães tratadas com LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) avaliado no PND34. Valores expressos em média  $\pm$  SEM.

O gráfico 15 (A) mostra o quanto crescimento dos filhotes nos PND5, 9, 13, 21, 26, 28, 33 e 34 machos e fêmeas de ratas que receberam LPS ou SAL. Não houve diferença quanto ao ganho de peso dos filhotes machos de ratas tratadas com LPS ou SAL ( $p=0,4327$ ), assim como não houve diferença entre os grupos 15 (B) fêmeas filhotes de ratas tratadas com LPS ou SAL ( $p=0,2434$ ).

Gráfico 15 – Avaliação de crescimento (LPS 100 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD9.5.



Fonte: Do autor.

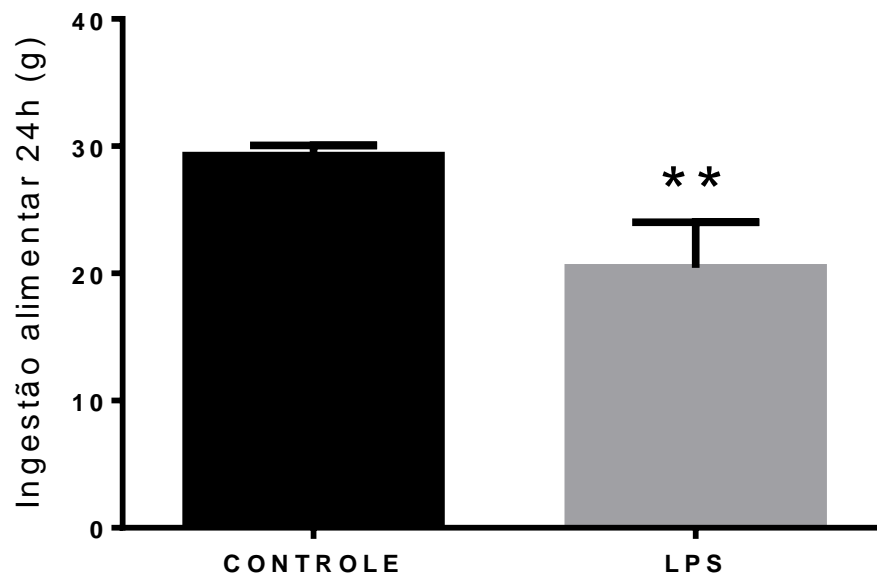
Nota: O gráfico 15 mostra a avaliação de crescimento nos PND5, 9, 13, 21, 26, 28, 33 e 34 dos filhotes machos (A) e fêmeas (B) de ratas tratadas com LPS (100 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no GD9.5. Valores expressos em média ± SEM.

Resultados do *Sickness Behavior* observados nas ratas tratadas com LPS na dose de (500 µg/kg; i.p. N=10) ou SAL (1 ml/kg, i.p. n=14) no GD16.

No gráfico 16 observamos que os animais que receberam LPS ingeriram menor quantidade de ração durante às 24h após o tratamento em comparação com os animais que receberam SAL, havendo diferença significativa entre os grupos (\*\*p= 0,0082).

Da mesma forma no gráfico 17, observamos que os animais que receberam LPS percorreram menor distância (\*p=0,0221) e como mostrado no gráfico 18 tiveram maior tempo de imobilidade (\*p=0,0386) no campo aberto em comparação com os animais que receberam SAL.

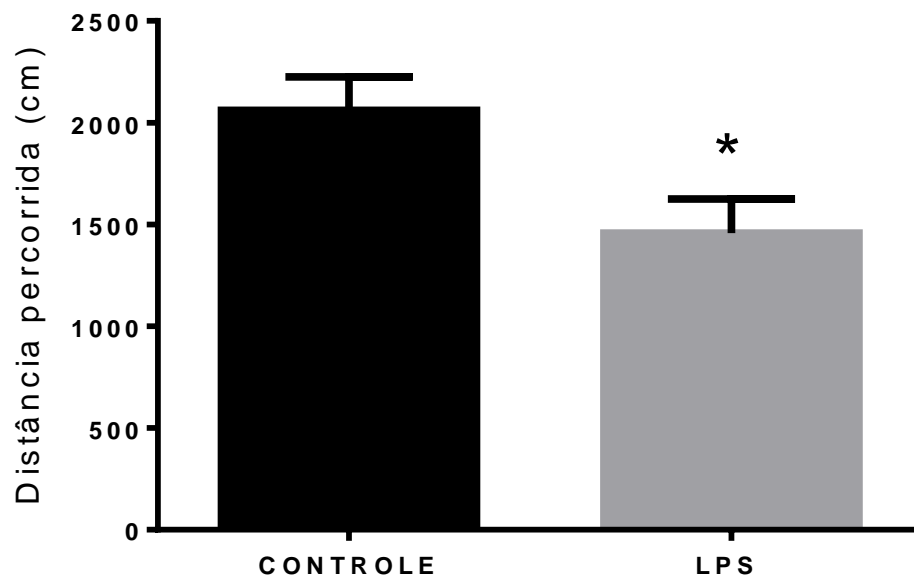
Gráfico 16 – Consumo de ração durante 24h aplicação de (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 16 mostra o consumo de ração em gramas durante 24h após aplicação de LPS (500 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) em ratas prenhas no GD16. Valores expressos em média ± SEM. \*\* p<0,01.

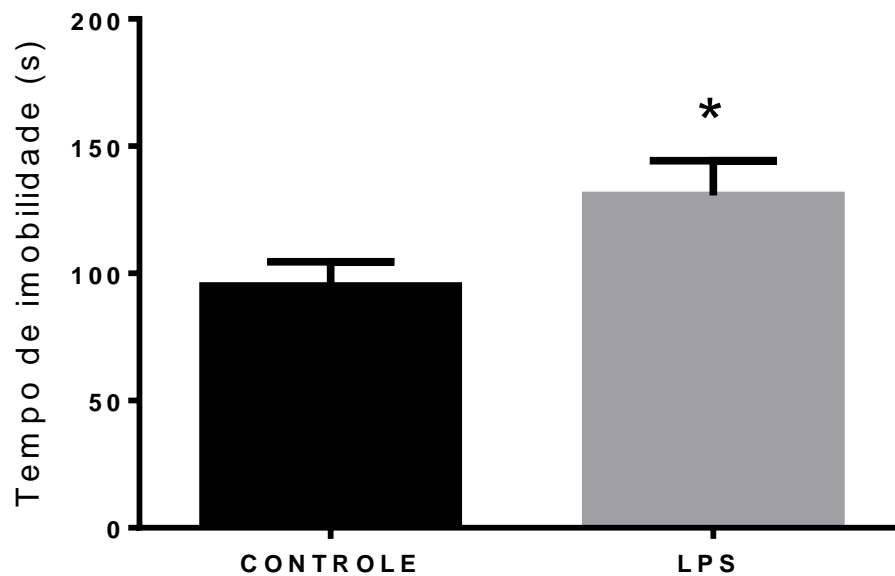
Gráfico 17 – Distância percorrida no campo aberto 2h após a aplicação de (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) em no GD16



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 17 mostra a distância percorrida pelas ratas prenhas no campo aberto 2h após da aplicação de LPS (500 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) em no GD16. Valores expressos em média ± SEM. \*P<0,05.

Gráfico 18 – Tempo de imobilidade no campo aberto 2h após da aplicação de (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



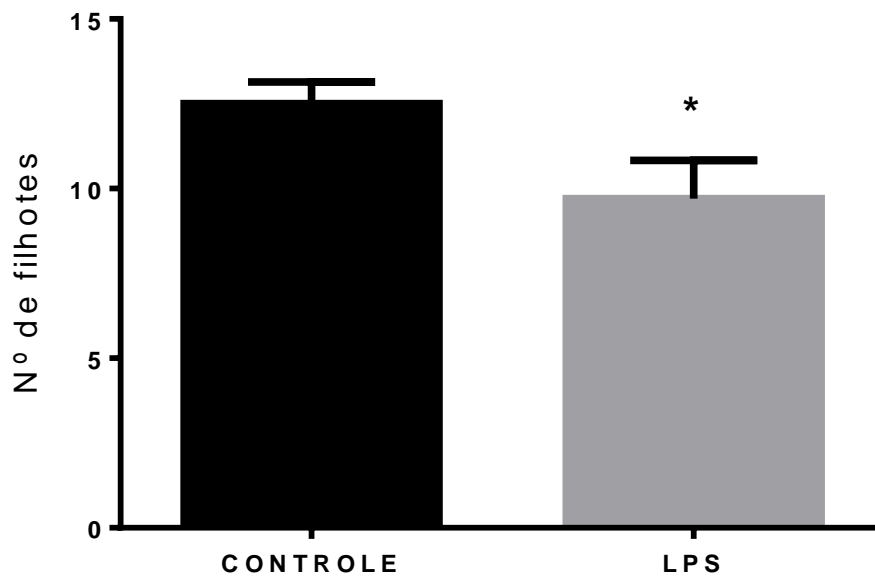
Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 18 mostra o tempo de imobilidade das ratas prenhas no campo aberto 2h após da aplicação de LPS (500 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) em ratas prenhas no GD16. Valores expressos em média ± SEM. \*P<0,05.

Quanto ao número de filhotes nascidos, peso das ninhadas não padronizadas e padronizadas de mães que receberam LPS (500 µg/kg; i.p. N=10) ou SAL (1 ml/kg, i.p. n=14) no GD16, são mostrados nos gráficos 19, 20 e 21 respectivamente.

O gráfico 19 mostra que ratas que receberam LPS no GD16 tiveram menor número de filhotes quando comparado ao grupo SAL (\*p=0,0319). O gráfico 20 mostra que ninhadas nascidas de mães que receberam LPS tiveram redução significativo no peso ao nascimento em comparação com as que receberam SAL (\*p=0,0115). No gráfico 21 observa-se que não houve diferença no peso das ninhadas de mães tratadas com LPS ou SAL pós padronização em N=8 filhotes/mãe (\*p=0,2227).

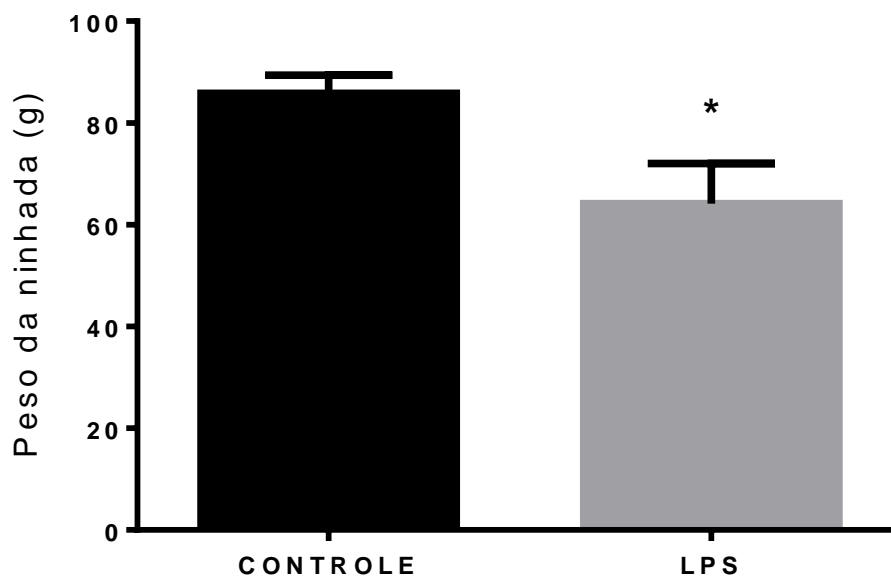
Gráfico 19 – Número de filhotes nascidos (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 19 mostra o número de filhotes nascidos de ratas que receberam LPS (500 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no GD16. Valores expressos em média ± SEM. \*p<0,05.

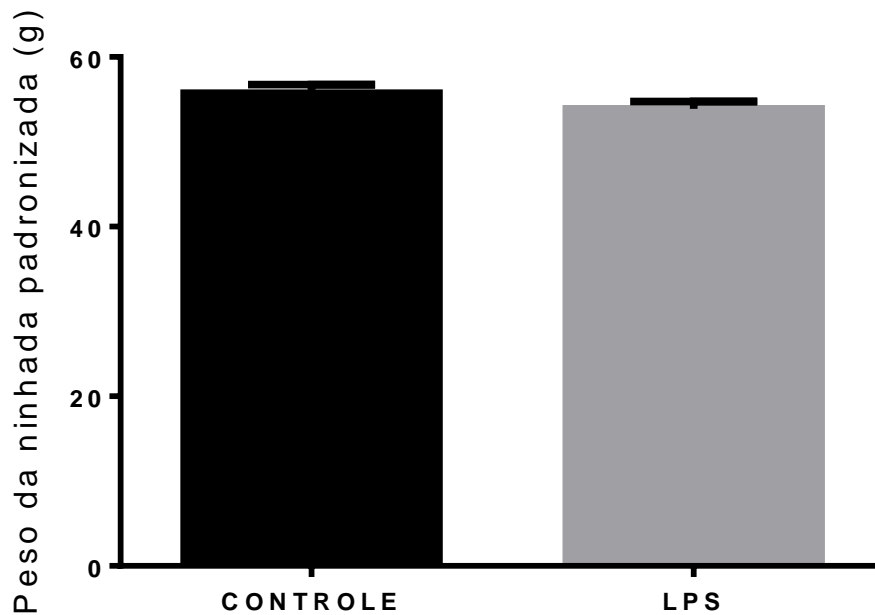
Gráfico 20 – Peso da ninhada não padronizada (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 20 mostra o peso da ninhada não padronizada no PND1 filhotes de mães que receberam LPS (500 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no GD16. Valores expressos em média ± SEM. \*p<0,05.

Gráfico 21 – Peso da ninhada pós padronização (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16

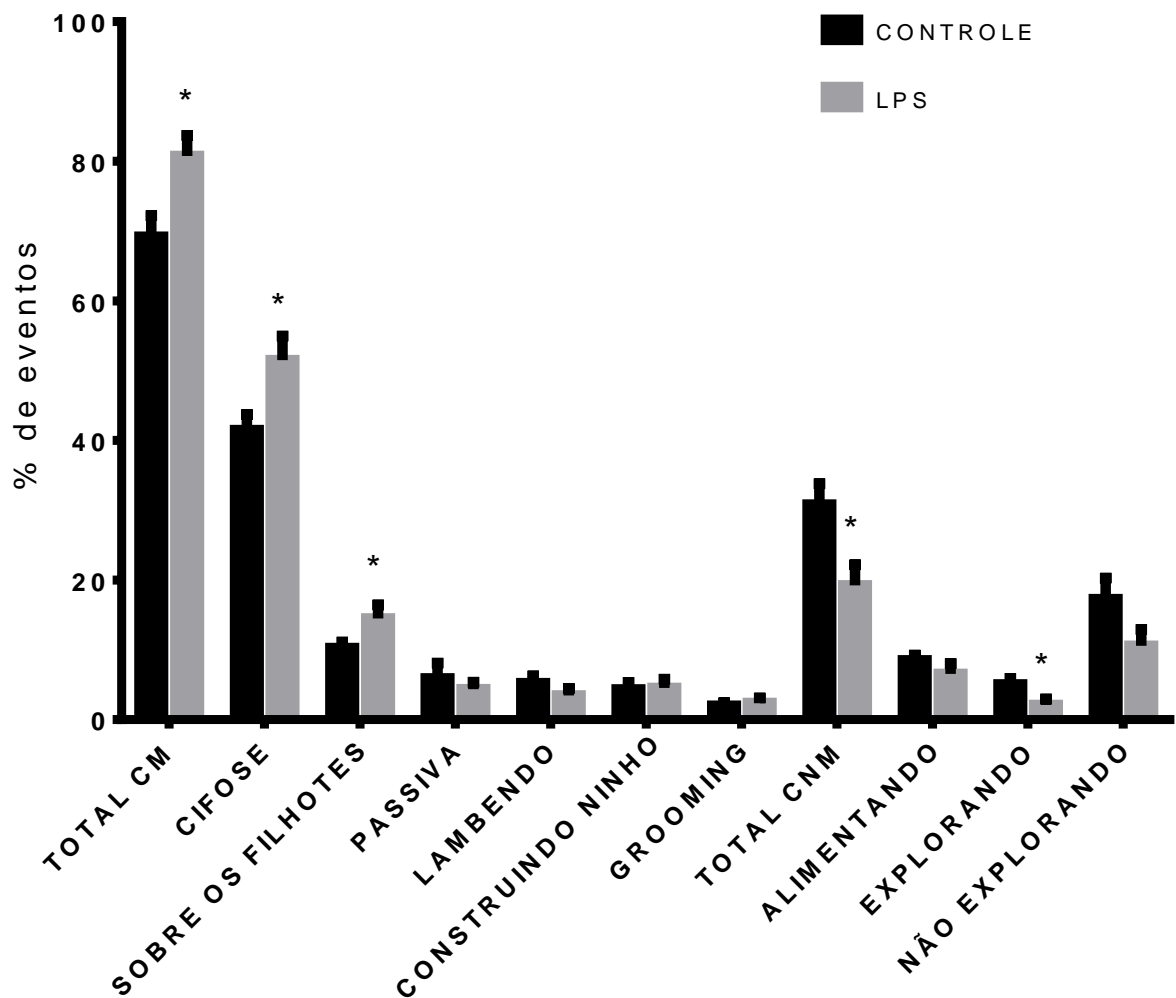


Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 21 mostra o peso da ninhada pós padronização em N=8 no PND1 filhotes nascidos de mães que receberam LPS (500 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no GD16. Valores expressos em média ± SEM.

Quanto aos parâmetros de cuidado materno observados durante os PND2, 3 e 4, avaliando comportamentos maternos (cifose amamentando os filhotes, deitada sobre os filhotes, lambendo os filhotes, em posição passiva alimentando os filhotes, *self-grooming* materno e construindo o ninho), e não maternos (alimentando sem os filhotes, explorando fora do ninho e não explorando fora do ninho), de mães receberam LPS (500 µg/kg; i.p. N=9) ou SAL (1 ml/kg, i.p. n=14) no GD16, são mostrados no gráfico 22. Ratas que receberam LPS tiveram maior comprometimento quanto aos cuidados maternos em comparação com as mães que receberam SAL, aumentando os parâmetros de comportamento materno total (\*p=0,0168), cifose amamentando os filhotes (\*p=0,0188), deitada sobre os filhotes (\*p=0,0316), e redução nos parâmetros de comportamento não materno total (\*p=0,0168) e explorando fora do ninho (\*p=0,0354).

Gráfico 22 – Porcentagem de eventos comportamento materno (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 22 mostra a porcentagem de eventos CM das mães que receberam LPS (500 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no GD16 durante os PND2, 3 e 4, nos parâmetros avaliados: total de comportamento materno (CM), em cifo amamentando os filhotes, deitada sobre os filhotes, em posição passiva alimentando os filhotes, lambendo os filhotes, construindo ninho, *self grooming* materno, total de comportamento não materno (CNM), alimentando sem os filhotes, explorando fora do ninho e não explorando fora do ninho. Valores expressos em média ± SEM \*p<0,05.

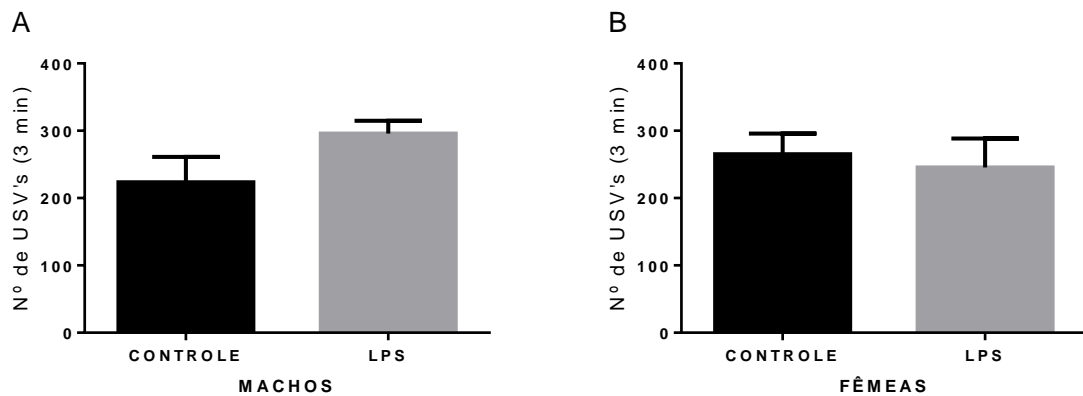
O número de UVS's nos PND5, 9 e 13 dos filhotes machos e fêmeas de mães que receberam LPS (500 µg/kg; i.p. N=9) ou SAL (1 ml/kg, i.p. n=14), são mostrados nos gráficos 23, 24 e 25 respectivamente.

O gráfico 23 (A) mostra que no PND5 os filhotes machos filhos de mães tratadas com LPS houve uma tendência em emitir mais USV's em comparação com os filhotes filhos de mães tratadas com SAL (p=0,1615). Em contrapartida o gráfico 23 (B) mostra que não houve diferença entre os filhotes fêmeas de mães tratadas com LPS ou SAL (p=0,7033).



O gráfico 24 (A) mostra que no PND9 que não houve diferença de emissões de USV's entre os grupos de filhotes machos de mães tratadas com LPS ou SAL ( $p=0,9675$ ). Da mesma o gráfico 24 (B) mostra que não houve diferença entre os filhotes fêmeas filhotes de mães tratadas com LPS ou SAL ( $p=0,8522$ ). Da mesma forma, o gráfico 25 (A) mostra que no PND13 não houve diferença de emissões de USV's entre os grupos de filhotes machos de mães tratadas com LPS ou SAL ( $p=0,9016$ ). Já o gráfico 25 (B) mostra que em relação aos filhotes fêmeas de mães tratadas com LPS houve uma leve tendência a emitirem menos USV's e comparação com filhotes de mães que receberam SAL ( $p=0,2952$ ).

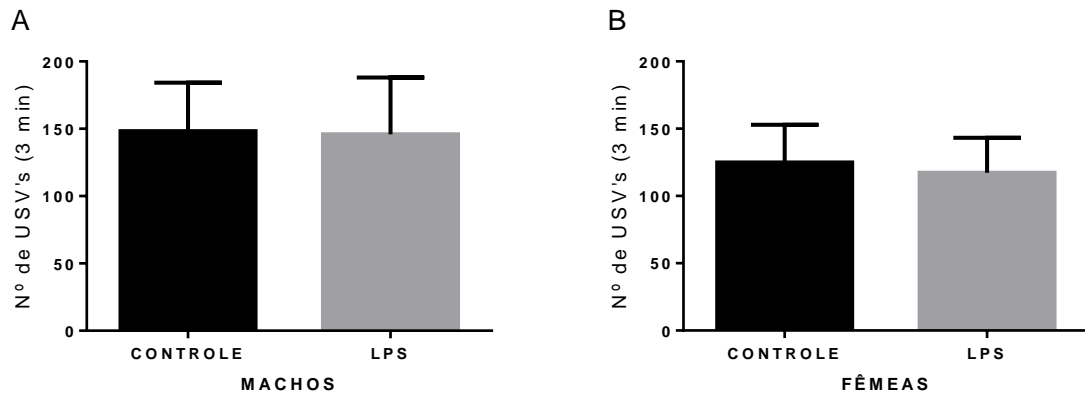
Gráfico 23 – Vocalizações no PND5 (LPS 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 23 mostra o número de vocalizações ultrassônicas (USV's) emitidas durante 3 min pelos filhotes A. machos e B. fêmeas filhos de mães tratadas com LPS (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) avaliado no PND5. Valores expressos em média  $\pm$  SEM.

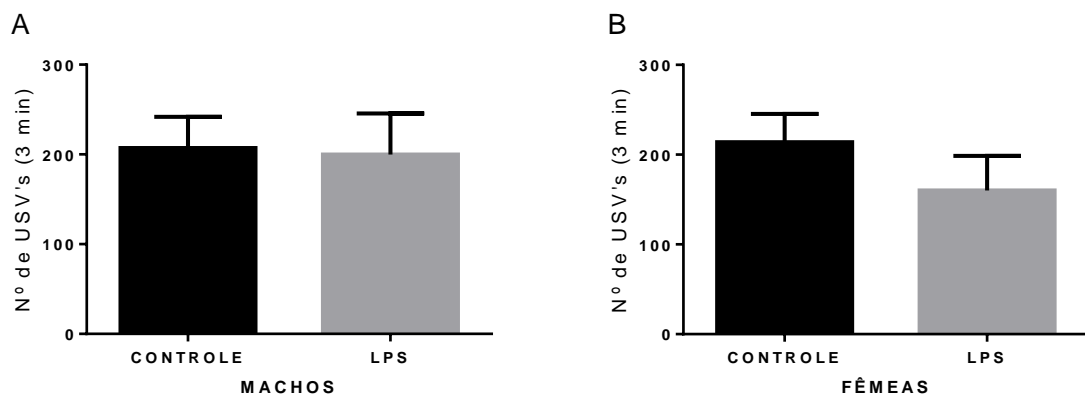
Gráfico 24 – Vocalizações no PND9 (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 24 mostra o número de vocalizações ultrassônicas (USV's) emitidas durante 3 min pelos filhotes A. machos e B. fêmeas filhos de mães tratadas com LPS (500 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) avaliado no PND9. Valores expressos em média ± SEM.

Gráfico 25 – Vocalizações no PND13 (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

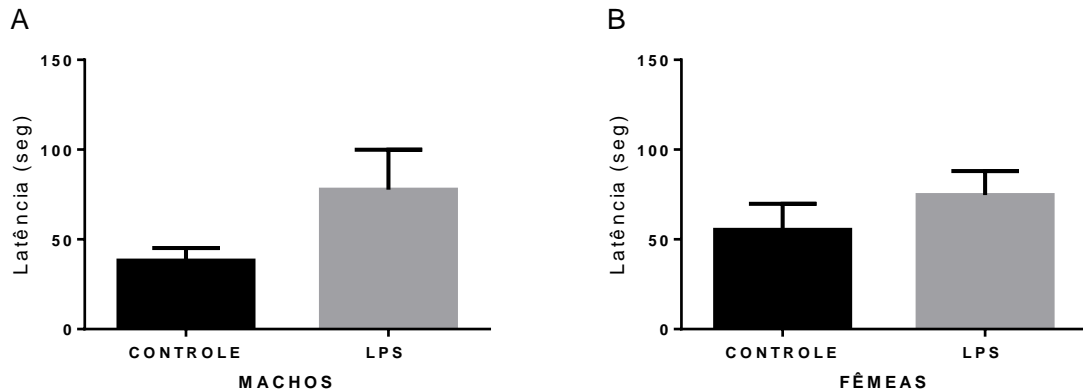
Nota: O gráfico 25 mostra o número de vocalizações ultrassônicas (USV's) emitidas durante 3 min pelos filhotes A. machos e B. fêmeas filhos de mães tratadas com LPS (500 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) avaliado no PND13. Valores expressos em média ± SEM.

No gráfico 26 observa-se o desempenho dos filhotes no teste de *homing*, no qual é avaliado a latência para entrada na porção com maravalha do ninho dos filhotes machos e fêmeas de mães que receberam LPS ou SAL no GD16 (N=9 e N=14, respectivamente).

No gráfico 26 (A) observa-se que os filhotes machos de ratas tratadas com LPS tenderam a demorar mais tempo para chegar a porção com maravalha do ninho materno em comparação com os filhotes de mães tratadas com SAL ( $p=0,0655$ ). E como mostrado no gráfico 26 (B) não

houve diferença no tempo de latência entre os filhotes fêmeas de mães tratadas com LPS em relação ao grupo de filhotes de mães SAL ( $p=0,3710$ ).

Gráfico 26 – Latência no teste de *homing* (LPS 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



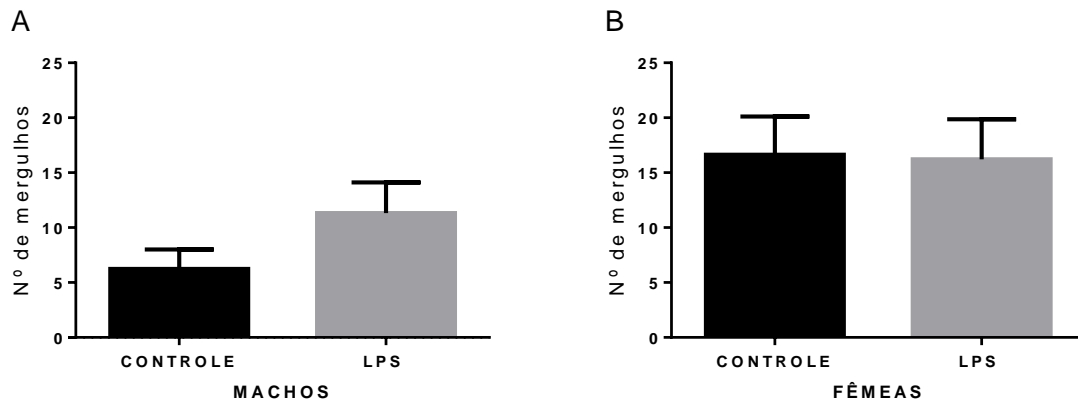
Fonte: Do autor.

Nota: Mostra o tempo de latência em segundos para entrada na porção com maravilha do ninho dos filhotes (A) machos e (B) fêmeas no PND13 filhos de mães tratadas com LPS (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no GD16. Valores expressos em média  $\pm$  SEM.

O número de mergulhos com a cabeça nos buracos no teste *hole-board* realizado no PND26 dos filhotes machos e fêmeas de mães que receberam LPS (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p. N=9) ou SAL (1 ml/kg, i.p. n=14) no GD16 é mostrado na figura 38.

O gráfico 27 (A) mostra que os animais machos filhotes de mães tratadas com LPS tenderam a mergulhar mais a cabeça nos buracos em relação aos animais filhotes de mães que receberam SAL ( $p=0,1211$ ), no entanto como mostrado no gráfico 27 (B) em relação aos filhotes fêmeas não houve diferença no número de mergulhos entre os grupos de filhotes de mães LPS ou SAL ( $p=0,9368$ ).

Gráfico 27 – Número de mergulhos no *hole-board* (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg i.p.) no GD16.



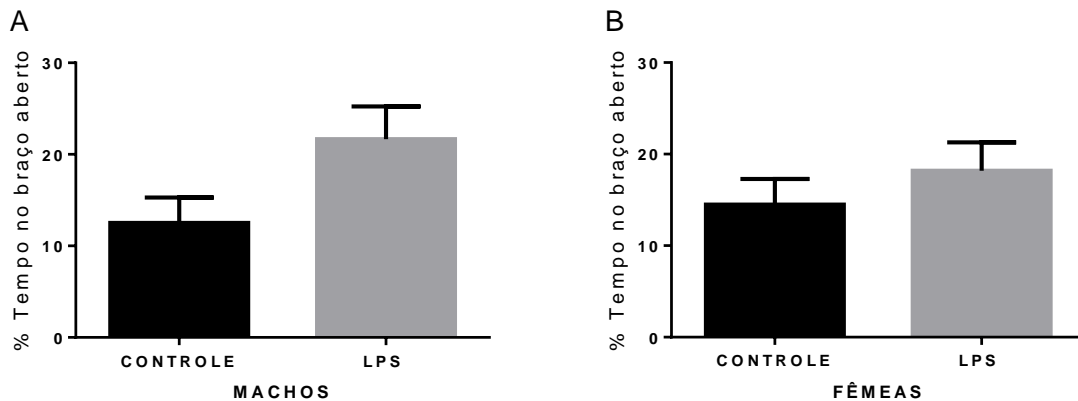
Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 27 mostra o número de mergulhos nos buracos do teste *hole-board* dos filhotes (A) machos e (B) fêmeas filhos de mães tratadas com LPS (500 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) realizado no PND26. Valores expressos em média ± SEM.

Quanto ao percentual de tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado no PND28 dos filhotes machos e fêmeas de mães que receberam LPS (500 µg/kg; i.p. N=9) ou SAL (1 ml/kg, i.p. n=14), é mostrado na figura 28.

O gráfico 28 (A) mostra que os filhotes machos de ratas tratadas com LPS tenderam a explorar por mais tempo o braço aberto do labirinto em cruz elevado em comparação com os filhotes de mães tratadas com SAL ( $p=0,550$ ). No entanto como mostrada no gráfico 28 (B) não houve diferença no tempo no braço aberto do labirinto em cruz elevado filhotes fêmeas de ratas tratadas com LPS em comparação com os filhotes de mães SAL ( $p=0,3983$ ).

Gráfico 28 – Tempo gasto no braço aberto do labirinto em cruz elevado (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 28 mostra o percentual de tempo gasto no braço aberto do labirinto em cruz elevado durante 5 min dos filhotes (A) machos e (B) fêmeas filhos de mães tratadas com LPS (500 µg/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no PND28. Valores expressos em média ± SEM.

Quanto aos parâmetros observados no *play behavior*: número de *pouncings*, número de *pinnings*, número de *partial rotations*, tempo gasto perseguindo o oponente e tempo de exploração anogenital dos filhotes machos (gráficos 29 A-E) e fêmeas (gráficos 30 A-E) de ratas que receberam LPS (500 µg/kg; i.p. N=9) ou SAL (1 ml/kg, i.p. n=14) no GD16.

O gráfico 29(A) mostra que o padrão de buscar pelas brincadeiras dos filhotes machos de mães tratadas com LPS foi alterado tendendo estes animais a buscar menos as brincadeiras (*pouncings*) em comparação aos animais SAL ( $p=0,0855$ ). Já em relação aos filhotes fêmeas não houve diferença entre os grupos de filhotes de mães com tratadas com LPS ou SAL ( $p=0,9742$ ) como mostrado no gráfico 30 (A).

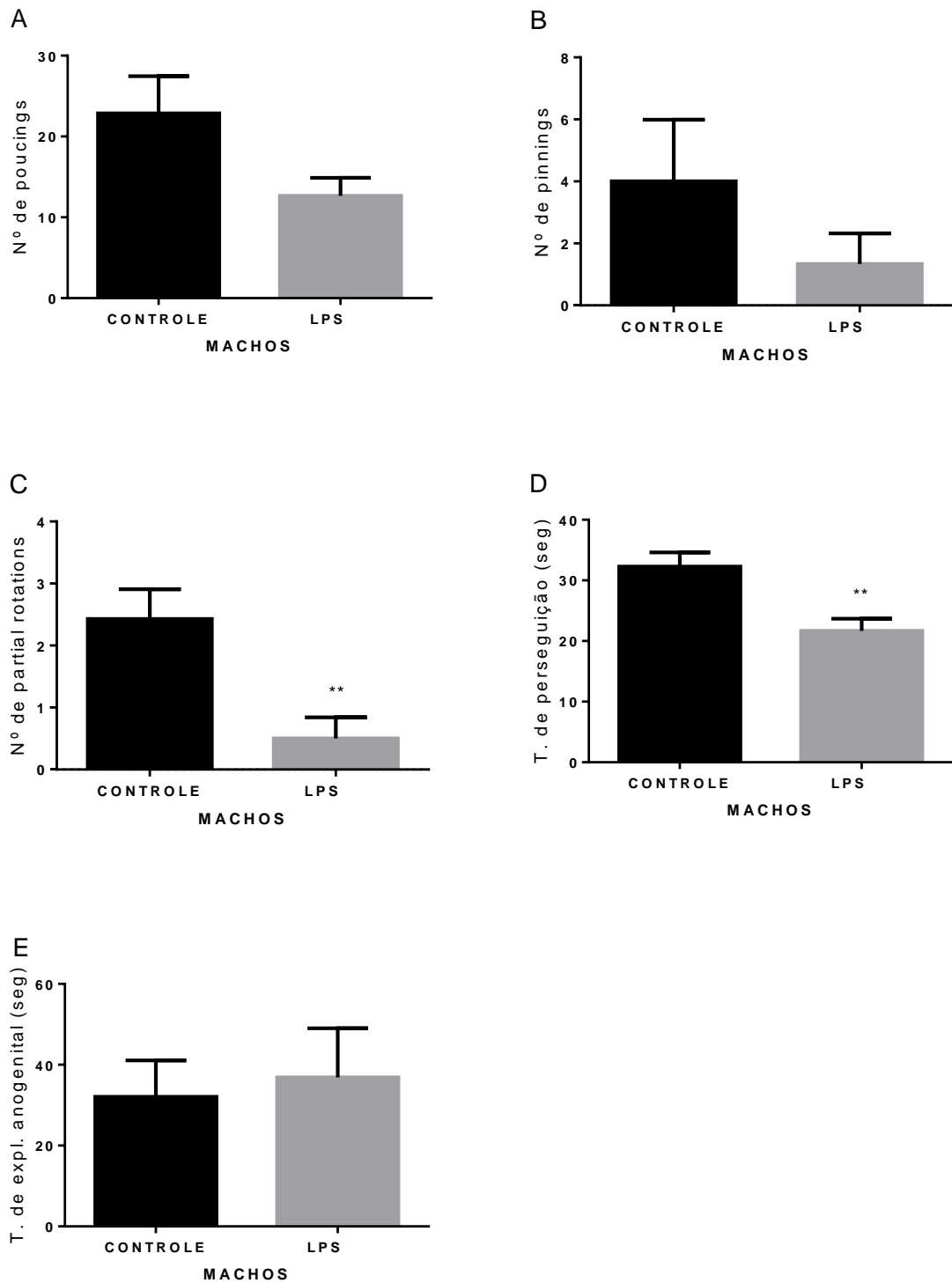
O gráfico 29 (B) mostra que os animais machos filhotes de mães tratadas com LPS tenderam a aceitar menos as brincadeiras (*pinnings*) em comparação ao grupo de animais filhotes de mães que receberam SAL ( $p=0,2795$ ). Como visto no gráfico 30 (B) não houve diferença nos grupos de animais fêmeas filhotes de mães tratadas com LPS em comparação ao grupo de filhotes de mães SAL ( $p=0,7589$ ).

O gráfico 29 (C) mostra que os animais machos de filhotes de ratas tratadas com LPS de praticaram menos o *partial rotation* em comparação com os animais filhotes de ratas SAL (\*\* $p=0,0090$ ). O gráfico 30 (C) mostra que não houve diferença quanto ao número de *partial rotation* praticado pelos filhotes fêmeas de ratas que receberam LPS ou SAL ( $p=0,4419$ ).

O gráfico 29 (D) mostra que os animais machos filhotes de mães tratadas com LPS perseguiram menos o oponente em comparação aos animais filhotes de ratas tratadas com SAL (\*\* $p=0,0063$ ). Já entre os filhotes fêmeas não houve diferença entre os grupos filhotes de ratas que receberam LPS ou SAL ( $p=0,4780$ ) como mostrado no gráfico 30 (D).

O gráfico (E) mostra que não houve diferença entre grupos de animais machos filhotes de ratas tratadas com LPS ou SAL na motivação para explorar a região anogenital do oponente ( $p=0,7512$ ). Em contrapartida o gráfico (E) mostra que houve tendência dos filhotes fêmeas filhotes de ratas tratadas com LPS em explorar mais a região anogenital do oponente em comparação com os filhotes de mães SAL ( $p=0,0621$ ).

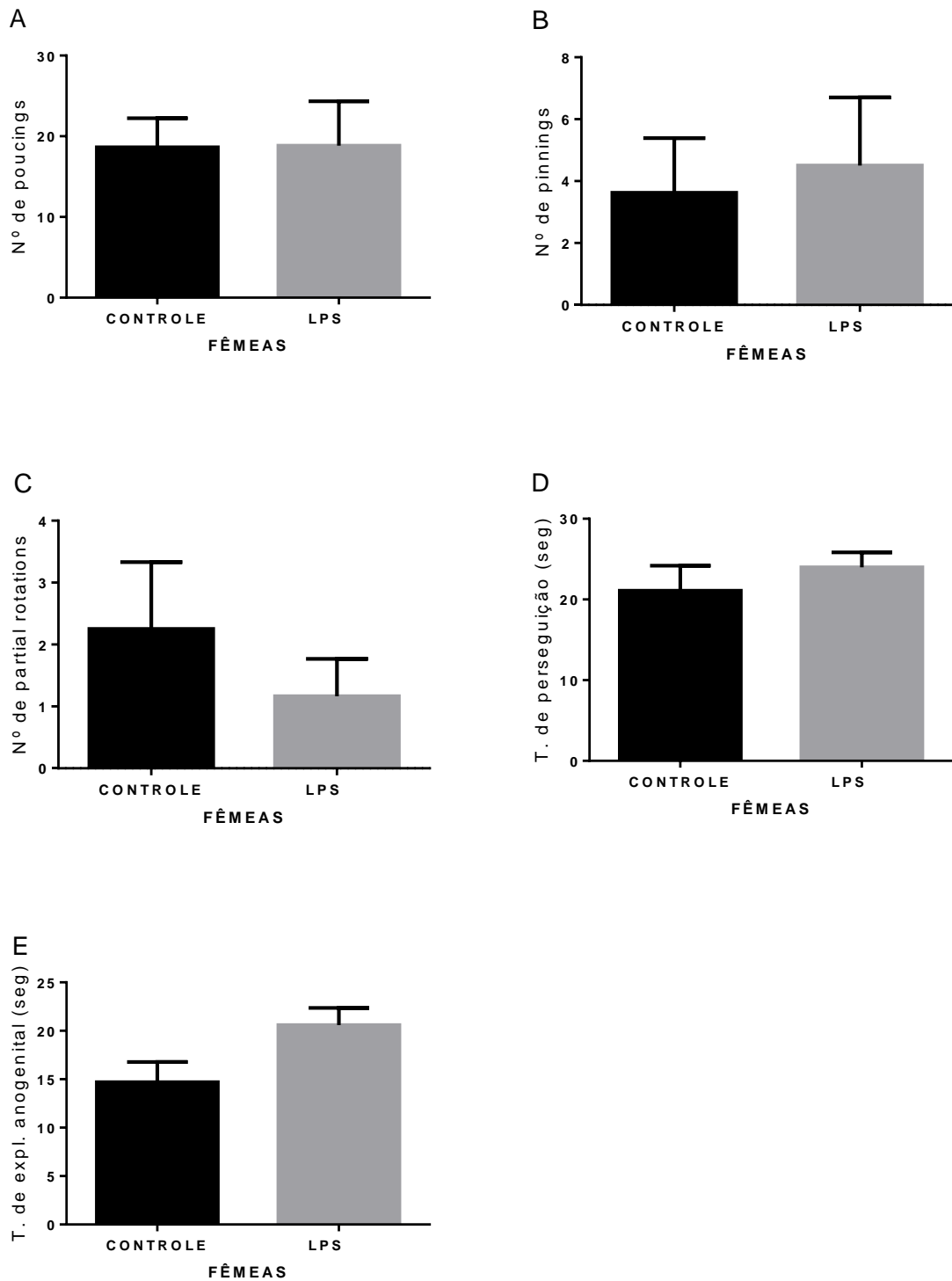
Gráfico 29 – Parâmetros avaliados no teste de *play behavior* nos filhotes machos (LPS 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 29 mostra os parâmetros avaliados no teste de *play behavior* nos filhotes machos de mães tratadas com LPS (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no PND33. N=9 e N=14: (A) N° de *poucings*; (B) N° de *pinnings*; (C) N° de *partial rotations*; (D) tempo de perseguição; tempo de exploração anogenital. Valores expressos em média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ .

Gráfico 30 – Parâmetros avaliados no teste de *play behavior* nos filhotes fêmeas (LPS 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

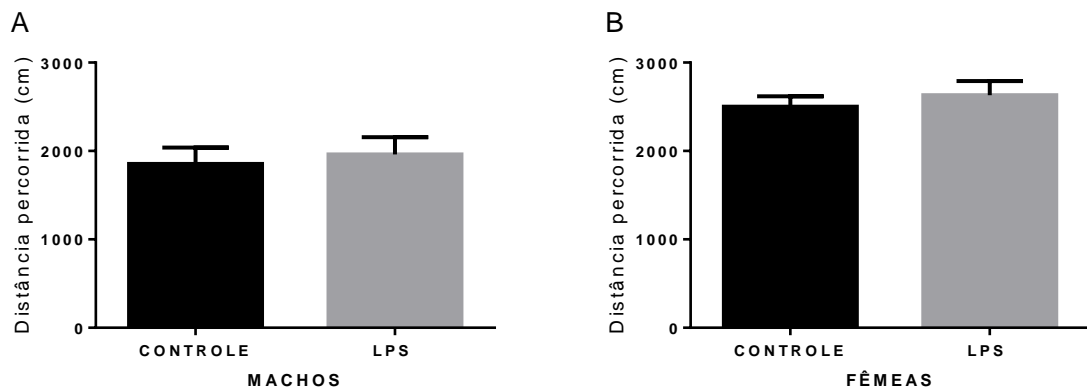
Nota: O gráfico 30 mostra os parâmetros avaliados no teste de *play behavior* nos filhotes fêmeas de mães tratadas com LPS (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no PND33. N=9 e N=14: (A) N° de *poucings*; (B) N° de *pinnings*; (C) N° de *partial rotations*; (D) tempo de perseguição; tempo de exploração anogenital. Valores expressos em média  $\pm$  SEM.



Resultado quanto a distância percorrida pelos filhotes machos e fêmeas de mães que receberam LPS (500  $\mu$ g/kg; i.p. N=9) ou SAL (1 ml/kg, i.p. n=14) ou SAL no GD16 (N=9 ou N=14).

O gráfico 31 (A) mostra que não houve diferença quanto a distância percorrida pelos filhotes machos de mães tratadas com LPS ou SAL ( $p=0,7116$ ). Da mesma forma o gráfico 31 (B) mostra que não houve diferença entre os grupos de filhotes fêmeas de mães tratadas com LPS ou SAL ( $p=0,5128$ ).

Gráfico 31 – Distância percorrida no campo aberto (LPS 500  $\mu$ g/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



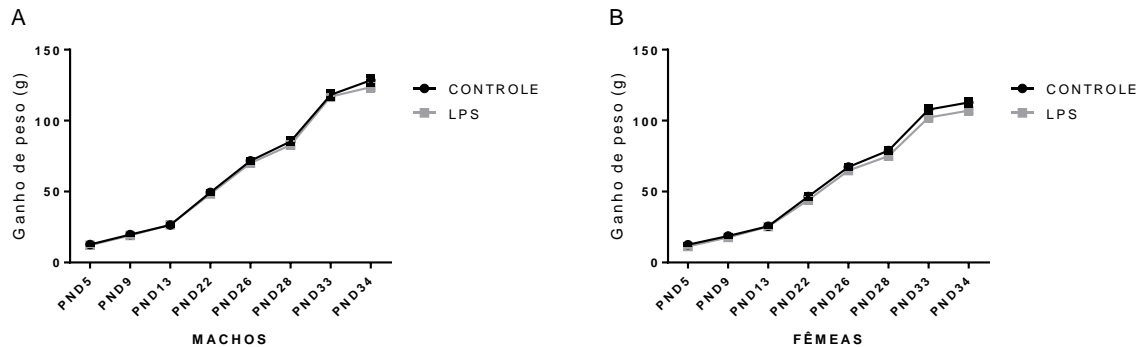
Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 31 mostra a distância percorrida em cm no campo aberto durante 5 min dos filhotes (A) machos e (B) fêmeas filhos de mães tratadas com LPS (500  $\mu$ g/kg; i.p.) ou SAL (1 ml/kg, i.p.) no PND34. Valores expressos em média  $\pm$  SEM.

Resultado quanto ao crescimento dos filhotes nos PND5, 9, 13, 21, 26, 28, 33 e 34 machos e fêmeas de mães que receberam 500  $\mu$ g de LPS (500  $\mu$ g/kg; i.p. N=9) ou SAL (1 ml/kg, i.p. n=14) no GD16.

O gráfico 32 (A) mostra que não houve diferença quanto ao ganho de peso dos filhotes machos de ratas tratadas com LPS ou SAL ( $p=0,9335$ ). Já o gráfico 32 (B) mostra que filhotes fêmeas de ratas tratadas com LPS tiveram uma leve diminuição no ganho de peso corporal em comparação aos animais filhotes de mães SAL ( $p=0,2120$ ).

Gráfico 32 – Avaliação de crescimento (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: Mostra a avaliação de crescimento nos PND5, 9, 13, 21, 26, 28, 33 e 34 dos animais machos (A) e fêmeas (B) dos animais filhos de mães tratadas com LPS (500 µg/kg; i.p. N=9) ou SAL (1 ml/kg, i.p. n=14) no GD16. Valores expressos em média ± SEM.

Resultados observados na imunohistoquímica para c-fos nas áreas: Cing +3,24mm anterior ao Bregma, Prl 3,24mm anterior ao Bregma, Pir +3,24mm anterior ao Bregma, AIV +3,24mm anterior ao Bregma, AID +3,24mm anterior ao Bregma, AcbC +0,72mm anterior ao Bregma, AcbSh +0,72mm anterior ao Bregma, HAB -2,72mm posterior ao Bregma, BLA -2,72mm posterior ao Bregma, BMA -2,72mm posterior ao Bregma, nos filhotes machos que receberam LPS na dose de (500 µg/kg; i.p. N=6) ou (SAL 1ml/kg =6) no GD16. Todas as áreas foram identificadas e delimitadas de acordo com o atlas (PAXINOS, WATSON 1997).

Observamos na prancha 1 que houve uma menor tendência dos filhotes de mães que receberam LPS para imunotativação para c-fos no Cing ( $p=0,2449$ ) em comparação aos filhotes de mães que receberam SAL.

Como mostrado na prancha 2 não houve diferença quanto imunotativação para c-fos na região Prl dos filhotes de mães LPS ou SAL ( $p=0,9429$ ).

A prancha 3 mostra que filhotes de mães que receberam LPS tiveram uma expressão para c-fos um pouco menor na região Pir em comparação aos filhotes SAL ( $p=0,5353$ ).

A prancha 4 mostra que não houve diferença na imunoreatividade para c-fos na região AIV entre os filhotes LPS ou SAL ( $p=0,8460$ ). No entanto os animais LPS tiveram menor tendência para imunotativação de c-fos em comparação com os filhotes SAL na região AID ( $p=0,0919$ ) conforme mostrado na prancha 5.

As pranchas 6 e 7 mostram tendência de menor imunotativação para c-fos das regiões AcbC ( $p=0,2909$ ) e AcbSh ( $p=0,2443$ ) respectivamente nos animais filhotes de mães LPS em comparação aos SAL.

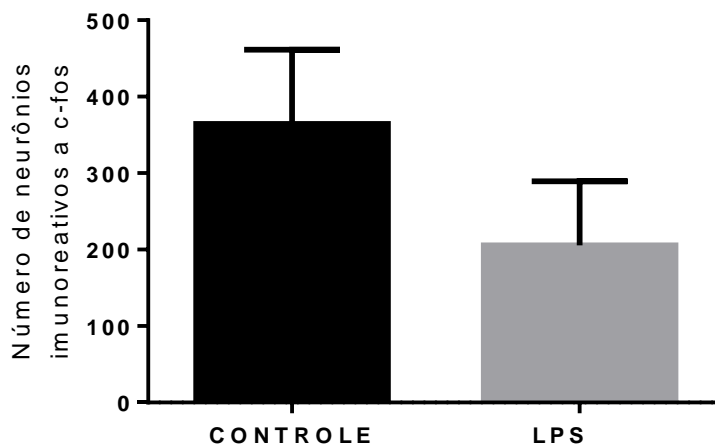
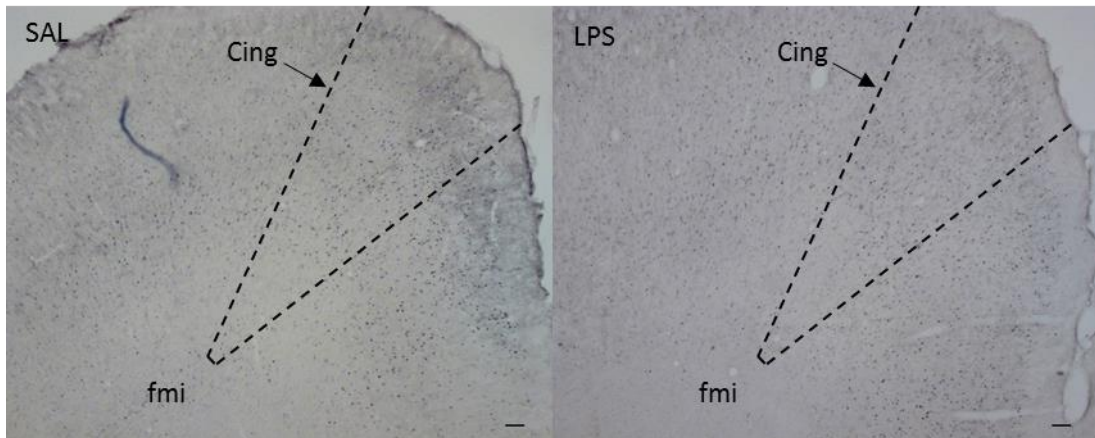
A prancha 8 mostra que não houve diferença quanto a expressão de c-fos na HB ( $p=5988$ ) entre os grupos de animais LPS ou SAL.

As pranchas 9 e 10 mostram que houve uma tendência maior para expressão de c-fos nas regiões BLA ( $p=0,3713$ ) e BMA ( $p=0,0615$ ) respectivamente nos animais LPS em comparação aos animais SAL.

O gráfico 33 mostra a correlação entre as áreas imunoativadas para c-fos em comparação ao número de *pouncings* + *pinnings* observados no *play behavior* nos filhotes de mães tratadas com SAL 1ml/kg; i.p. ou LPS 500  $\mu$ g/kg; i.p. Percebemos que houve uma correlação inversamente proporcional dos números de *pouncings* + *pinnings* nas áreas Cing (\* $p=0,056$ ), Pir (\*\* $p=0,004$ ), AIV (\*\* $p=0,008$ ), HB (\* $p=0,032$ ) e BLA (\* $p=0,04$ ); onde quanto maior a expressão do comportamento menor a imunoativação de c-fos. Houve também uma tendência de correlação inversamente proporcional do AcbC ( $p=0,058$ ), enquanto mesmo não foi observado nas áreas Pr1 ( $p=0,36$ ), AID ( $p=0,22$ ), AcbSh ( $p=0,21$ ) e BMA ( $p=0,10$ ).

O gráfico 32 mostra a matriz referente a correlação direta entre as áreas imunativadas para c-fos, onde o gradiente de cores representa a variação do coeficiente de correlação de Spearman (de +1 a -1), onde uma correlação positiva é identificada na cor azul e correlação negativa na cor vermelha. Observa-se correlação direta positiva entre as áreas avaliadas. Já o gráfico 35 mostra a matriz referente aos valores de p para as correlações entre as áreas imunoativadas. Sendo a cor da matriz vermelha quando  $p<0,05$ .

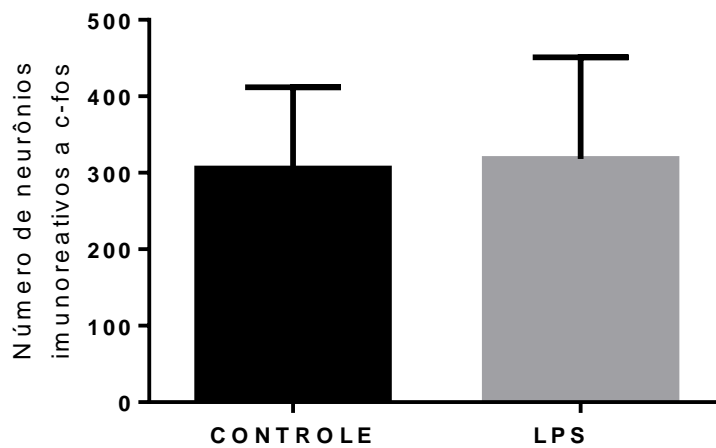
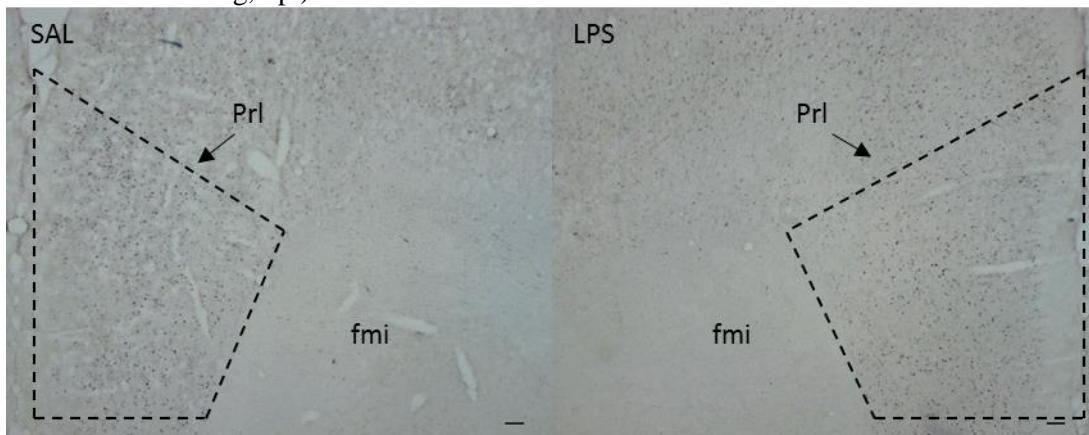
Prancha 1 – Fotomicrografia e gráfico do córtex cingulado (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: A prancha 1 mostra fotomicrografias representativas do córtex cingulado (Cing) no (aumento de 4x) e gráfico mostrando o número de neurônios imunoreativos a c-fos 90 min após o teste de *play behavior*. Filhotes machos de mães que receberam SAL 1 ml/kg; i.p. ou LPS na dose de 500 µg/kg; i.p. no GD16.

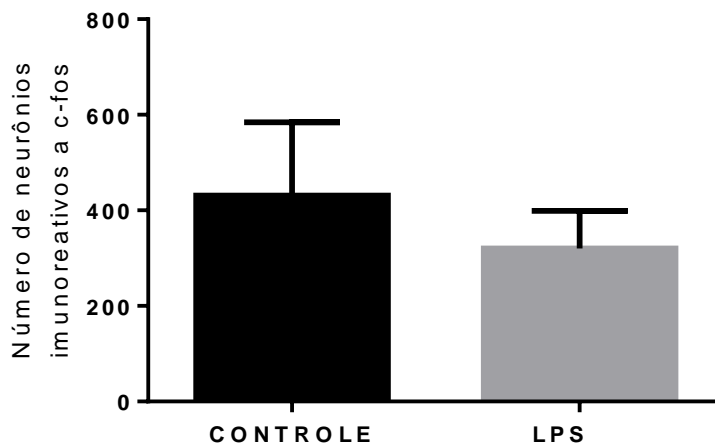
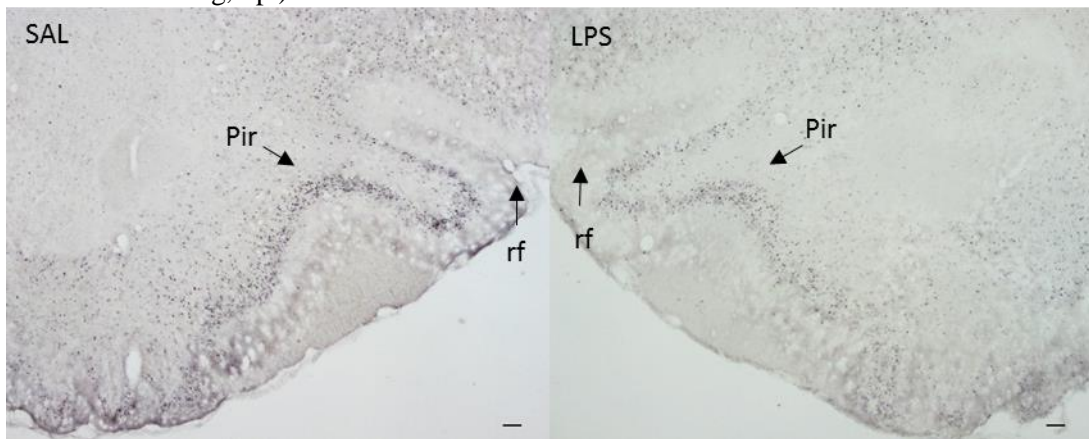
Prancha 2 – Fotomicrografia e gráfico do córtex pré-límbico (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: A prancha 2 mostra fotomicrografias representativas do córtex pré-límbico (Pr1) no (aumento de 4x) e gráfico mostrando o número de neurônios imunoreativos a c-fos 90 min após o teste de *play behavior*. Filhotes machos de mães que receberam SAL 1 ml/kg; i.p. ou LPS na dose de 500 µg/kg; i.p. no GD16.

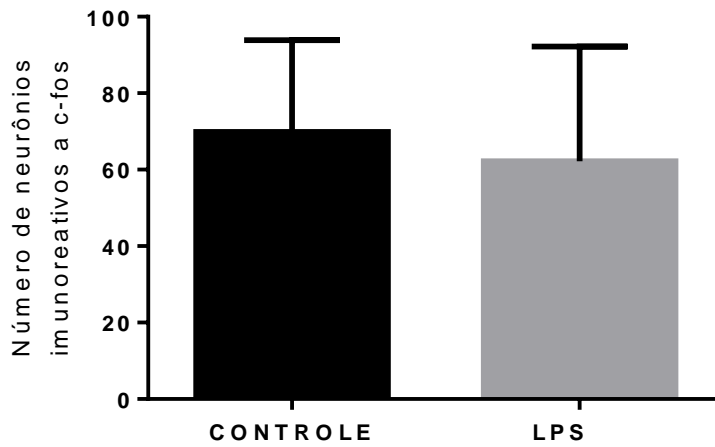
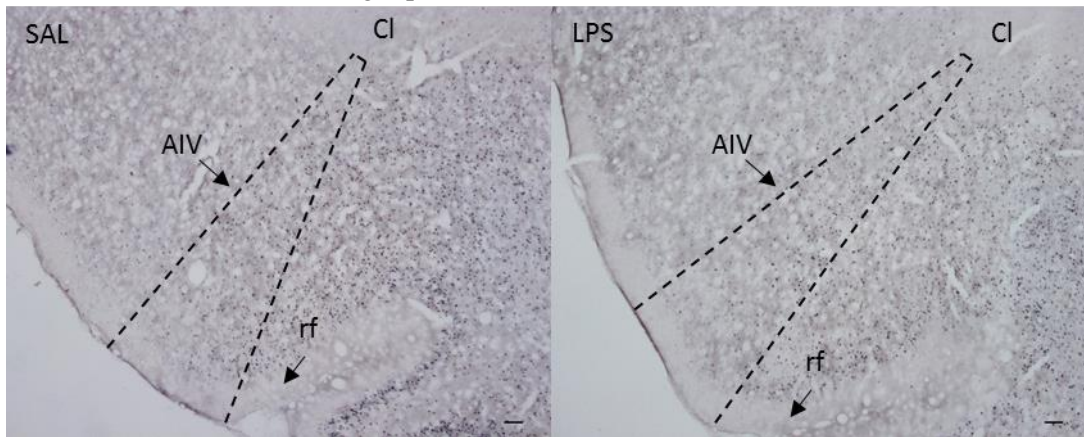
Prancha 3 – Fotomicrografia e gráfico do córtex piriforme (LPS 500  $\mu$ g/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: Mostra fotomicrografias representativas do córtex piriforme (Pir) no (aumento de 4x) e gráfico mostrando o número de neurônios imunoreativos a c-fos 90 min após o teste de *play behavior*. Filhotes machos de mães que receberam SAL 1ml/kg; i.p. ou LPS na dose de 500  $\mu$ g/kg; i.p. no GD16.

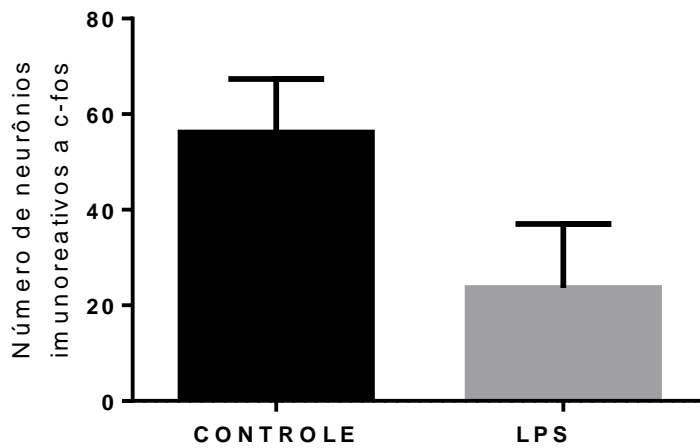
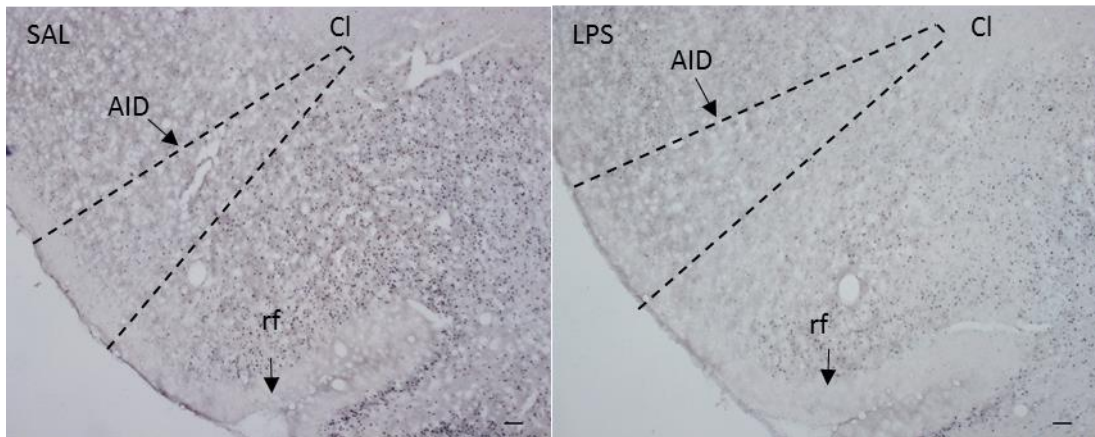
Prancha 4 – Fotomicrografia e gráfico da área insular agranular ventral (LPS 500  $\mu$ g/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: A prancha 4 mostra fotomicrografias representativas da área insular agranular ventral (AIV) no (aumento de 4x) e gráfico mostrando o número de neurônios imuno-reativos a c-fos 90 min após o teste de *play behavior*. Filhotes machos de mães que receberam SAL 1ml/kg; i.p. ou LPS na dose de 500  $\mu$ g/kg; i.p. no GD16.

Prancha 5 – Fotomicrografia e gráfico da área insular agranular dorsal (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.

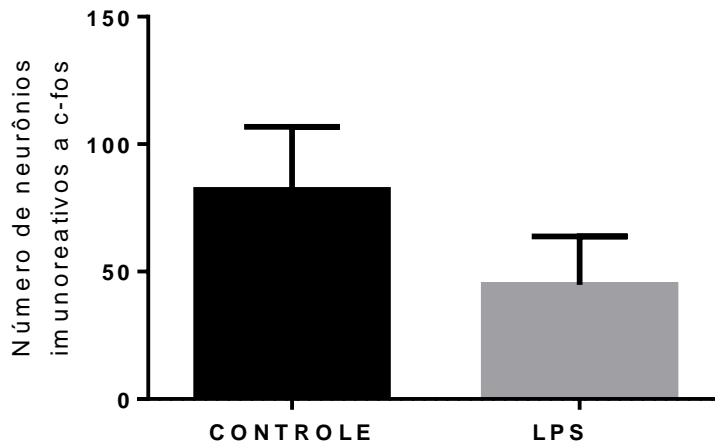
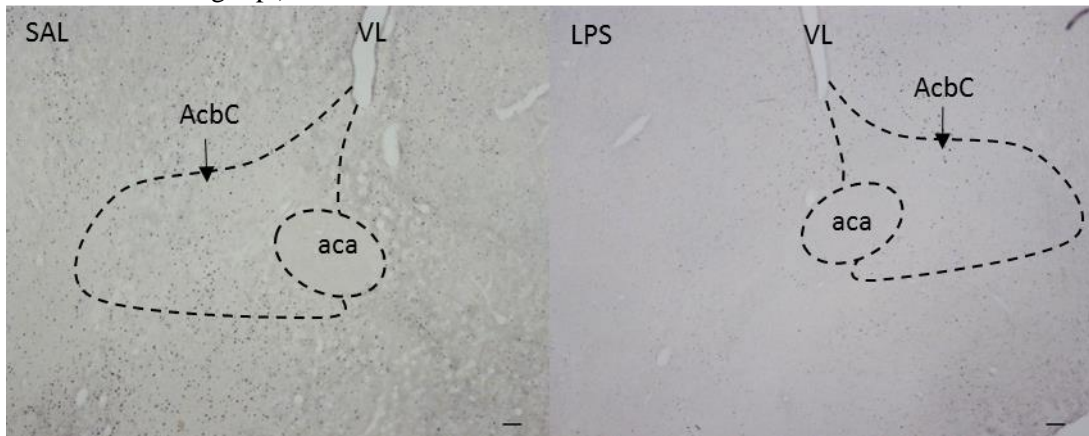


Fonte: Do autor.

Nota: A prancha 5 mostras fotomicrografias representativas da área insular agranular dorsal (AVD) no (aumento de 4x) e gráfico mostrando o número de neurônios imunorreativos a c-fos 90 min após o teste de *play behavior*. Filhotes machos de mães que receberam SAL 1ml/kg; i.p. ou LPS na dose de 500 µg/kg; i.p. no GD16.



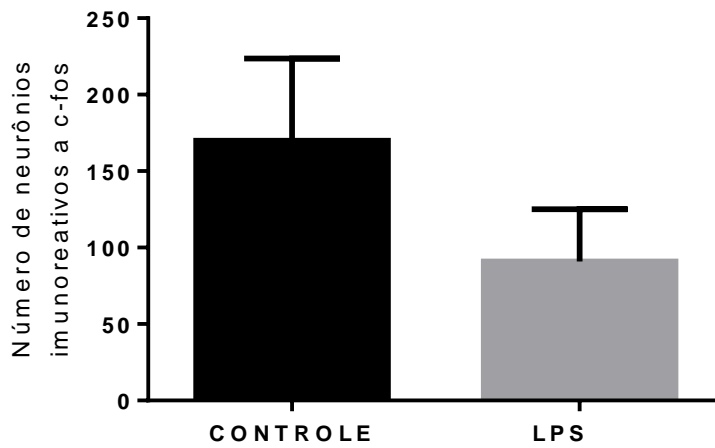
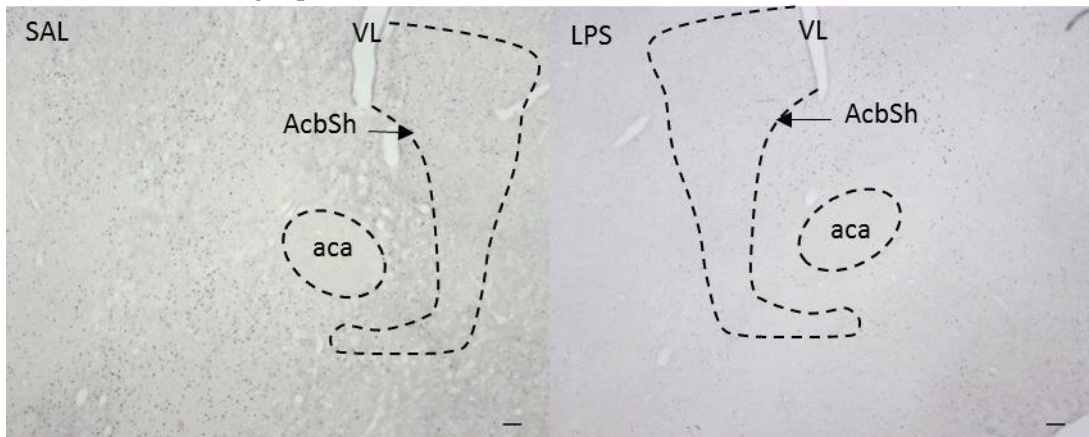
Prancha 6 – Fotomicrografia e gráfico área accubens core (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: A prancha 6 mostra fotomicrografias representativas da área accubens core (AcbC) no (aumento de 4x) e gráfico mostrando o número de neurônios imuno reativos a c-fos 90 min após o teste de *play behavior*. Filhotes machos de mães que receberam SAL 1 ml/kg; i.p. ou LPS na dose de 500 µg/kg; i.p. no GD16.

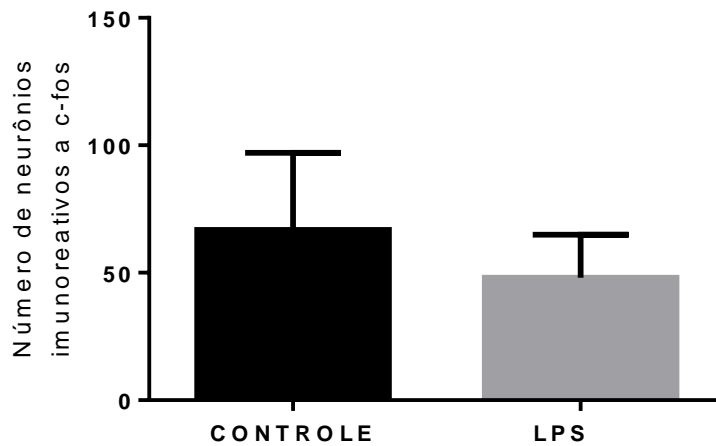
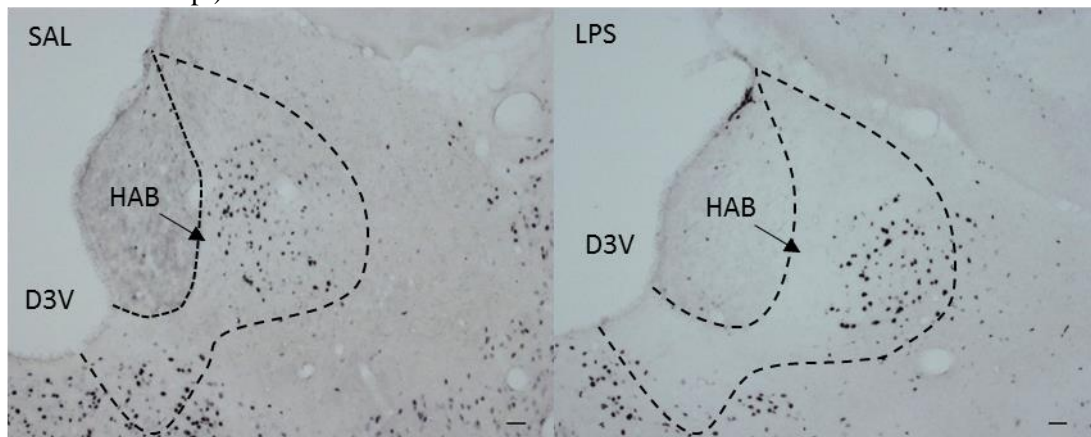
Prancha 7 – Fotomicrografia e gráfico da área accubens shell (LPS 500  $\mu$ g/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: A prancha 7 mostra fotomicrografias representativas da área accubens shell (AcbSh) no (aumento de 4x) e gráfico mostrando o número de neurônios imunoreativos a c-fos 90 min após o teste de *play behavior*. Filhotes machos de mães que receberam SAL 1ml/kg; i.p. ou LPS na dose de 500  $\mu$ g/kg; i.p. no GD16.

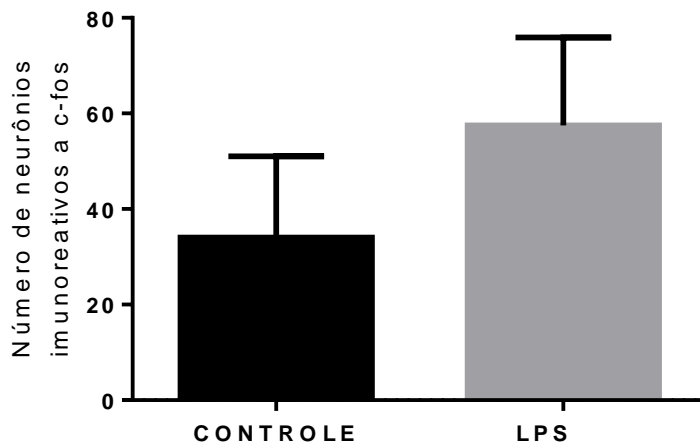
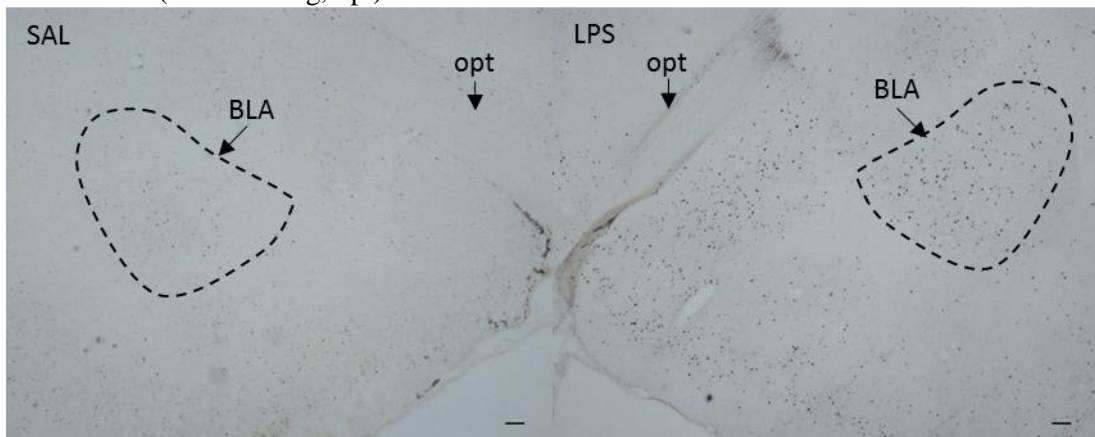
Prancha 8 – Fotomicrografia e gráfico das habênulas (LPS 500  $\mu$ g/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: A prancha 8 mostra fotomicrografias representativas da área das habênulas (HB) no (aumento de 10x) e gráfico mostrando o número de neurônios imunorreativos a c-fos 90 min após o teste de *play behavior*. Filhotes machos de mães que receberam SAL 1ml/kg; i.p. ou LPS na dose de 500  $\mu$ g/kg; i.p. no GD16.

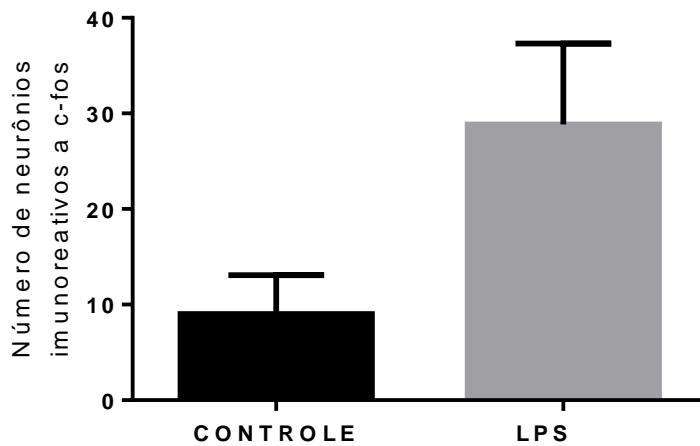
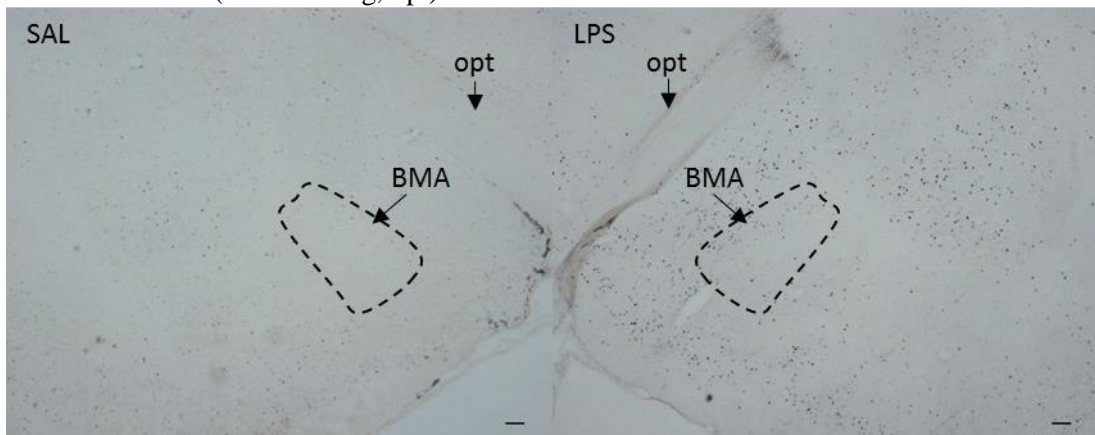
Prancha 9 – Fotomicrografia e gráfico da área amígdala baso lateral (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: A prancha 9 mostra fotomicrografias representativas da área amígdala baso lateral (BLA) no (aumento de 4x) e gráfico mostrando o número de neurônios imunoreativos a c-fos 90 min após o teste de *play behavior*. Filhotes machos de mães que receberam SAL 1ml/kg; i.p. ou LPS na dose de 500 µg/kg; i.p. no GD16.

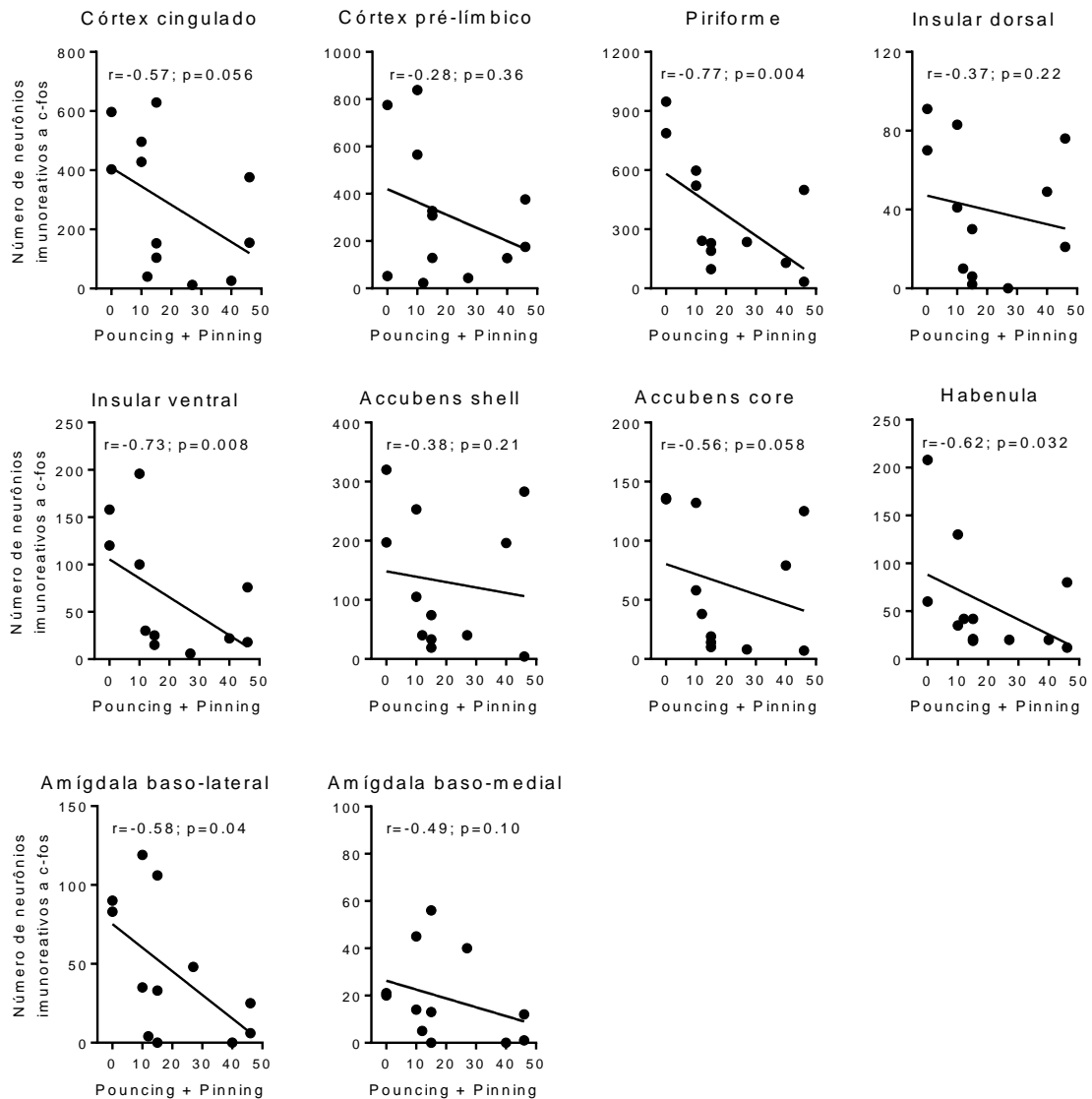
Prancha 10 – Fotomicrografia e gráfico da área amígdala baso medial (LPS 500  $\mu$ g/kg; i.p.) ou (SAL 1 ml/kg, i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: A prancha 10 mostra fotomicrografias representativas da área amígdala baso medial (BMA) no (aumento de 4x) e gráfico mostrando o número de neurônios imunoreativos a c-fos 90 min após o teste de *play behavior*. Filhotes machos de mães que receberam SAL 1ml/kg; i.p. ou LPS na dose de 500  $\mu$ g/kg; i.p. no GD16.

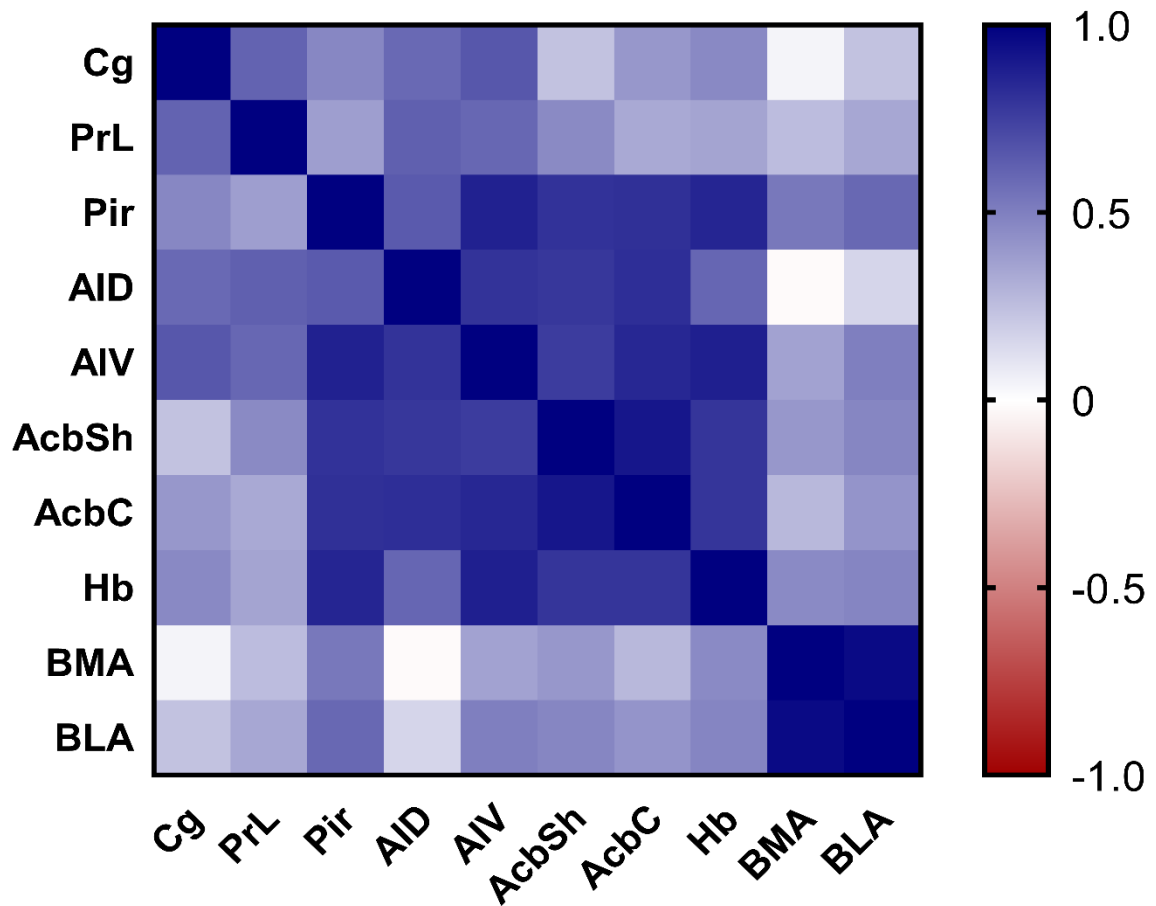
Gráfico 33 – Correlação entre as áreas cerebrais e o comportamento de *play behavior* nos filhotes machos (LPS 500 µg/kg; i.p.) ou (SAL 1ml/kg; i.p.) no GD16.



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 33 mostra a correlação entre as áreas cerebrais em comparação ao número de *poucing*s + *pinnings* no comportamento de *play behavior* nos filhotes machos de mães que receberam SAL 1ml/kg; i.p. ou LPS na dose de 500 µg/kg; i.p. no GD16. \* $P < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

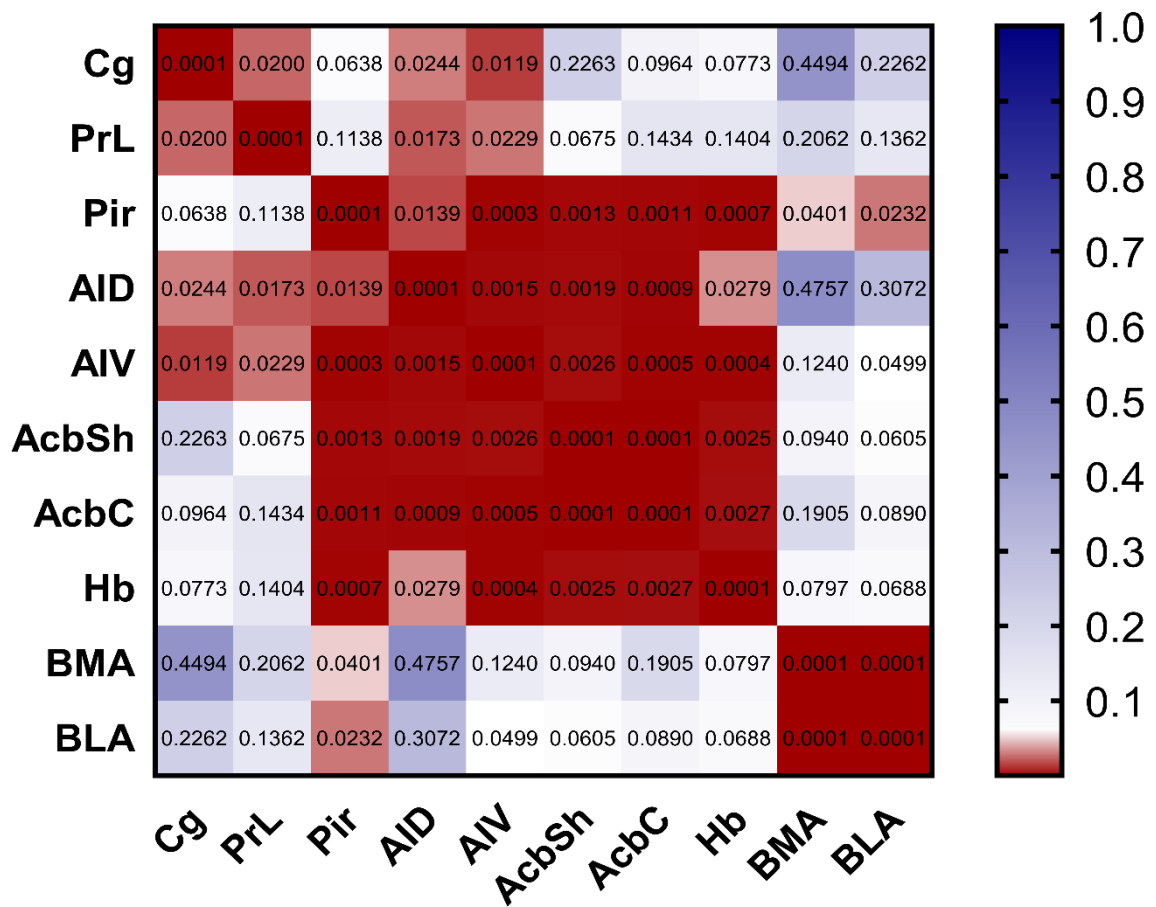
Gráfico 34 – Correlação de Spearman referente a correlação direta entre as áreas imunativadas para c-fos



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 34 mostra a matriz referente a correlação direta entre as áreas imunativadas para c-fos, onde o gradiente de cores representa a variação do coeficiente de correlação de Spearman (de +1 a -1), onde uma correlação positiva é identificada na cor azul e correlação negativa na cor vermelha.

Gráfico 35 – Correlação de Spearman referente aos valores de (p).



Fonte: Do autor.

Nota: O gráfico 35 mostra a matriz referente aos valores de (p) para as correlações entre as áreas imunoativadas para c-fos. O gradiente de cores representa a variação do valor de p, sendo a cor vermelha quando  $p < 0,05$  e azul para  $p > 0,05$ .



## 6 DISCUSSÃO

Os dados aqui apresentados mostraram que as mães que receberam LPS na dose de 500 µg/kg no GD16 apresentaram *sickness behavior* assim como diminuição no número de filhotes nascidos e no peso da ninhada ao nascimento, bem como aumento nos parâmetros de cuidados maternos.

*Sickness behavior* é um conjunto de sintomas que incluem entre eles: febre segundo Kluger (1986), diminuição da atividade exploratória, interação social, atividade sexual, anorexia, anedonia, ativação do eixo HHA e sistema imune (DANTZER, 2004; PECCHI et al., 2009; YIRMIYA et al., 1994). O *sickness behavior* causa ativação imunomaterna, e esta ativação durante a gravidez é responsável pelo aumento nos níveis de citocinas circulantes, dentre elas IL-1, IL6 e TNF- $\alpha$  (ORNOY et al., 2015). Estas citocinas parecem estar envolvidas em possíveis alterações no desenvolvimento cerebral fetal (PATTERSON, 2009; SMITH et al., 2007).

No presente estudo notamos que a aplicação de LPS na dose de 100 µg/kg no GD9.5 não resultou em *sickness*, conforme observado por Kirsten; Taricano; Maiorka, et al., (2010), todavia na dose de 500 µg/kg no GD16 notamos que os animais apresentaram *sickness*, evidenciado pela diminuição da distância percorrida e tempo de imobilidade no campo aberto, assim como diminuição da ingestão alimentar mensurada durante 24h.

A mensuração do *sickness* é importante por conta da ativação imunomaterna de acordo com Bernardi et al., (2010); Patterson, (2009); Patterson (2011); Urakubo et al., (2001), uma vez que altera as concentrações de citocinas não somente na mãe, mas também na placenta e no feto (ASHDOWN et al., 2006; BOKSA, 2010; OSKVIG et al., 2012; PAINTLIA et al., 2004; PAINTLIA; PAINTLIA; CONTRERAS, et al., 2008; PAINTLIA; PAINTLIA; SINGH, et al., 2008). O aumento de citocinas circulantes no feto pode resultar em comportamentos anormais e disfunções cerebrais na prole segundo Depino (2015) e desenvolvimento de TEA (FOLEY; OSSENKOPP, et al., 2014; KIRSTEN; TARICANO; FLORIO, et al., 2010; PATTERSON, 2011).

A ativação imunomaterna também causou diminuição no número de filhotes nascidos e no peso da prole, evidenciando assim prejuízos no crescimento fetal na dose de 500 µg/kg no GD16, porém o mesmo não foi encontrado na dose de 100 µg/kg no GD9.5.

Esta diferença entre nossos achados e de outros laboratórios evidenciam que talvez a diferença de reprodutibilidade seja por conta da cepa de LPS. Uma vez que várias cepas existem no mercado e variam muito entre elas.

O comportamento materno é provavelmente o evento mais importante dentre todos comportamentos das mães de mamíferos, garantido a sobrevivência, desenvolvimento e bem-estar de sua prole ( BRIDGES, 2015; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2011). Há evidências que ambientes adversos no início da vida podem ter uma profunda influência sobre respostas ao estresse através da programação epigenética ao longo da vida, podendo modificar permanentemente as principais vias reguladoras, como eixo HHA (BERNARDI et al., 2010).

No presente estudo observamos que houve um aumento nos parâmetros de comportamento materno e diminuição dos parâmetros não maternos nas mães que receberam LPS na dose de 500 µg/kg no GD16. Filhotes de mães expostas a desafio imunológico tendem a recolher os filhotes mais rapidamente (KIRSTEN et al., 2011). Estes dados sugerem que mães que passaram por desafio imunológico tendem a cuidar melhor de suas crias.

As USV's têm sido sistematicamente utilizadas como meio de investigação em modelos de autismo em ratos, e esta parece ser uma forma confiável para a detecção de deficiências de comunicação em roedores (KAS et al., 2014).

No presente estudo percebemos que não houve diferença quantos aos animais filhotes de mães que receberam LPS na dose de 100 µg/kg no GD9.5 de vocalizarem menos ou mais nos PND5, 9 e 13. Já com relação aos filhotes machos de mães tratadas com LPS na dose de 500 µg/kg no GD16, notamos uma tendência de vocalizarem mais no PND5 em comparação com os filhotes de mães SAL, porém não observamos diferença nos filhotes fêmeas, e da mesma forma tanto em filhotes machos ou fêmeas nos PND9 e 13. Diferentemente de alguns estudos e em outros modelos que mostraram que estes animais vocalizam menos com LPS na dose de 100 µg/kg no GD9.5 conforme Kirsten et al., (2012) ou VPA (SERVADIO et al., 2016).

O prejuízo na comunicação dos filhotes com a mãe parece ser um sintoma típico do autismo (KIRSTEN *et al.*, 2012). Porém filhotes de ratos nascem com cérebro imaturo segundo Fleming et al., (1999); Meyer et al., (2006), filhotes isolados podem ser ouvidos por outros animais que não sejam a própria mãe, e tendem a reduzir a taxa de vocalizações na presença de um potencial predador (SPENCE et al., 2016).

Percebemos que houve um aumento nos parâmetros maternos das mães que receberam LPS, da mesma forma os filhotes destas mães receberam maior cuidado, sendo assim é natural que estes filhotes vocalizem mais chamando pela mãe. No entanto parece que estes animais quando isolados não tendem a temer a presença predadores, não avaliando um potencial risco e vocalizando de forma constante.

Com relação ao teste de *homing*, este visa a exploração e a motivação do filhote por alcançar seu ninho e manter contato com a ninhada e sua mãe (MIKULECKA et al., 2014).

Notamos no presente estudo que os machos filhotes de mães tratadas com LPS na dose de 100 µg/kg no GD9.5 levaram o mesmo tempo para chegar na porção com maravalha do ninho. Em contrapartida os filhotes fêmeas gastaram mais tempo \* $p < 0,05$ . Já com relação aos filhotes de mães que receberam LPS na dose de 500 µg/kg no GD16, os machos mostraram tendência a levar mais tempo para atingir a maravalha do ninho materno) o que não foi observado nos filhotes fêmeas. A separação materna tem consequências adversas para filhote de ratos, assim é de suma importância que os filhotes reconheçam e sigam as pistas olfativas deixadas pela mãe ou reconheçam o cheiro do ninho materno (FOLEY, MACFABE, et al., 2014).

Os dados do teste de *homing* na dose de 500 µg/kg no GD16 corroboram com o modelo de autismo induzido por VPA com que encontraram maior tempo de latência para a entrada na porção com maravalha materna (SERVADIO et al., 2016). A exposição ao LPS parece diminuir a capacidade dos filhotes de reconhecer o odor do ninho, em outras palavras o LPS parece causar prejuízo a função olfativa dos filhotes (KIRSTEN et al., 2011). Da mesma forma este pesquisadores somente utilizaram animais machos, sendo difícil fazer um parâmetro entre machos e fêmeas, pois sabemos que a ocorrência de TEA é de 4:1 entre machos e fêmeas.

Comportamentos repetitivos e estereotipados tem sido associado a comportamento típico de TEA (MARKRAM et al., 2008; SERVADIO et al., 2015). O teste de *hole-board* descrito primeiramente por Boissier e Simon (1962), visa justamente testar a motivação do filhote por explorar novos ambiente conforme afirma, Kumar e Sharma (2016b); Takeda et al., (1998), assim como analisar movimentos repetitivos e estereotipados (MARTIN et al., 2010; SERVADIO et al., 2016).

Percebemos um aumento no número de mergulhos nos buracos do *hole-board* somente nos filhotes machos de mães que receberam LPS na dose de 500 µg/kg no GD16. Assim como encontrado em modelo com VPA (SERVADIO et al., 2015). Porém outros pesquisadores utilizando também modelo de VPA encontraram dados contrários como diminuição no número de mergulhos como mostrado por Kumar et al., (2015); Kumar e Sharma, (2016a; b), no entanto estes associaram o teste somente a atividade exploratória. Estes dados demonstram que animais filhos de mães LPS na dose 500 µg/kg no GD16 tiveram comportamento repetitivos e estereotipados assim como resistência a mudanças e interesse irrestrito, confirmando um comportamento *autismo-like*. Mais uma vez somente animais machos foram utilizados por estes pesquisadores.

O teste de labirinto em cruz elevado explora a adversidade do rato por lugares altos e abertos, evocando medo e conflito em relação ao explorar um novo ambiente ou esconder-se (PELLOW et al., 1985).

Dados aqui apresentados com relação aos animais machos filhotes de mães que receberam LPS na dose de 500 µg/kg no GD16 mostra que estes animais claramente exploram mais os braços abertos do labirinto em cruz elevado que animais fêmeas ou que receberam dose de 100 µg/kg no GD9.5. Apesar de outros pesquisadores encontrarem dados diferentes em modelos com VPA como Kumar e Sharma (2016a; b); Servadio et al., (2016) ou LPS em doses de 100 µg/kg no GD9.5 como Kirsten, Taricano, Maiorka, et al., (2010), ou até mesmo camundongos como Depino (2015) e acreditarem que estes animais são mais ansiosos sendo este um sintoma de TEA. Os dados aqui obtidos mostram claramente que estes animais não são mais ansiosos e sim parecem ter uma deficiência de avaliação de risco ao se expor por mais tempo ao braço aberto do labirinto em cruz elevado.

No teste de campo aberto não observamos diferença quanto a distância percorrida pelos filhotes machos ou fêmeas de mães que receberam LPS nas doses de 500 µg/kg ou 100 µg/kg nos GD9.5 ou 16 respectivamente em relação aos filhotes de mães que receberam SAL 1ml/kg. Estes dados mostram o LPS não alterou a motivação por explorar o campo. Assim como encontrado por outros pesquisadores (FOLEY, OSSENKOPP, et al., 2014).

O *play behavior* é um teste de interação social na infância, onde é observado a motivação dos filhotes por interagirem com outros filhotes da mesma espécie e idade. O *play behavior* inicia-se quando um animal solicita brincadeira praticando o “*pouncing*” e continua quando o outro filhote aceita a solicitação ficando em posição supina “*pinning*”, outros parâmetros também são avaliados como “*partial rotation*” que seria um *pinning* incompleto, “*boxing*” quando os dois animais ficam sobre as patas traseiras simulando luta, tempo de perseguição, tempo de evasão e tempo de exploração social, dentre tantos outros parâmetros (VANDERSCHUREN; TREZZA, 2014). *Play behavior* é de grande aceitação como modelo translacional de interação social em modelos de TEA.

Crianças com TEA apresentam déficits de interação social, incluindo dificuldades em iniciar e aceitar brincadeiras. Estas crianças podem envolver-se em brincadeiras, mas de forma passiva e muitas vezes estereotipadas. Brincadeiras durante a infância são de extrema importância para adquirir habilidades sociais e cognitivas adequadas (VANDERSCHUREN; TREZZA, 2014; MELANCIA et al., 2017).

Desta forma podemos observar que não houve diferença entre os animais machos e fêmeas filhotes de mães que receberam LPS na dose de 100 µg/kg ou SAL 1ml/kg no GD9.5. Em contrapartida filhotes machos de mães que receberam LPS na dose de 500 µg/kg no GD16 interagiram menos em comparação com os filhotes SAL. Porém o mesmo não foi observado nos filhotes fêmeas de mesmo tratamento. Outros pesquisadores utilizando outros modelos

encontraram diminuição na solicitação das brincadeiras como Servadio et al., (2016) e diminuição da interação social (MARKRAM et al., 2008; CHOMIAK et al., 2010; TAYLOR et al., 2012).

No que diz respeito ao comportamento social em ratos, evidências mostram que o *play behavior* facilita o desenvolvimento de habilidades sociais, cognitivas, motoras e tem forte componente emocional (VANDERSCHUREN et al., 2016).

Quanto a expressão de c-fos em determinadas áreas do cérebro dos filhotes machos de mães que receberam LPS na dose de 500 µg/kg ou SAL 1ml/kg no GD16 após o teste de *play behavior*, percebemos que quanto mais os animais interagiram durante o teste menor foi a expressão de c-fos em determinadas áreas Cing (\*p=0,056), Pir (\*\*p=0,004), AIV (\*\*p=0,008), AcbC (p=0,058), HB (\*p=0,032) e BLA (\*p=0,04).

A BLA e áreas frontais incluindo o Cing, aumentaram a expressão de c-fos de animais que passaram pelo teste de play behavior, Estudos sobre mecanismos neurais identificaram o núcleo accumbens (NAc) como uma região importante através da qual o sistema dopaminérgico pode mediar a motivação para o play behavior. As HB parecem mediar aspectos emocionais negativos como descritos por Baker et al., (2015), bem como a motivação por iniciar e aceitar as brincadeira (VAN KERKHOF et al., 2013; VANDERSCHUREN et al., 2016). Áreas insulares agranulares são responsáveis por respostas emocionais e recebem aferências das áreas límbicas e amígdalas (GU et al., 2013).

Crianças com TEA demonstraram relevante redução da atividade no córtex cingulado e crescimento excessivo das amígdalas além de anormalidades histológicas causando disfunção da ativação (MINSHEW; KELLER, 2010). Exames pós morte de indivíduos autista encontraram uma taxa aumentada de neurônios, porém estes em menor tamanho (SOSA-DIAZ et al., 2014).

Estudos demonstraram que codificação de intensidade de odor corre não somente ao nível do epitélio olfativo, mas também no córtex piriforme, estes parecem ter axônios serotoninérgicos distróficos em indivíduos com TEA, isto explicaria a julgamento alterado destes indivíduos quanto a intensidade de odor (WICKER et al., 2016).

Os dados por nós encontrados no presente trabalho, mostra que houve alterações em todos os parâmetros observados no comportamento dos filhotes machos de mães que receberam LPS na dose de 500 µg/kg no GD16, o que não foi observado com os filhotes de fêmeas e nos filhotes de mães na dose de 100 µg/kg no GD9.5.

Os dados obtidos nas vocalizações no PND5, é condizente com sintoma de TEA, sendo que estes filhotes vocalizaram mais. Filhotes de roedores tendem a vocalizar menos quando

isolados e na presença de predadores, porém quando na presença da mãe vocalizam mais, e da mesma forma quando percebem o odor do ninho. Percebemos ainda que houve um aumento significativo no cuidado materno nestes animais, sendo que animais que vocalizam mais recebem mais cuidados da mãe. E da mesma forma estes filhotes demoraram mais tempo para chegarem a porção com a maravalha do ninho, demonstrando possível comprometimento do córtex piriforme. Da mesma forma indivíduos com TEA tendem a ter alteração no sistema olfatório.

No teste de *Hole-board* notamos um aumento no número de mergulhos nos buracos da tábua de furos, demonstrando comportamento estereotipado e repetitivo. Já em relação ao teste do labirinto em cruz elevado percebemos que estes filhotes ficaram mais tempo nos braços abertos em relação aos controles. Roedores tem aversão por ambientes altos e abertos por conta da exposição a predadores, no entanto estes filhotes não avaliaram o risco ao se exporem em um ambiente novo e aversivo.

Com relação ao *play behavior* este teste é de grande validade pois visa explorar a motivação do filhote em interagir com outros roedores na infância. Percebemos claramente que estes filhotes procuram e aceitam menos as brincadeiras dos oponentes, e da mesma forma passaram menor tempo perseguindo o oponente. Da mesma forma houve diminuição na expressão de c-fos no córtex cingulado, accumbens core e shell, insular agranular dorsal e habênulas, áreas estas diretamente ligadas a estes comportamentos. A dificuldade de interação social na infância e na vida adulta é um sintoma típico de TEA.

Com relação ao teste de campo aberto não observamos diferenças na mobilidade e na distância percorrida por estes animais. Este é um dado importante pois mostra que os filhotes realmente não tiveram motivação por interagir com o oponente durante o teste de *play behavior*.

## **7 CONCLUSÃO**

De acordo com os dados obtidos no presente estudo, os filhotes machos de mães tratadas com LPS na dose 500 µg/kg no GD16, tiveram comportamentos similares ao observados em indivíduos com TEA como: comportamentos repetitivos e estereotipados, diminuição da interação social e dificuldade de avaliação de risco, entre outros. Estas alterações comportamentais não foram observadas nos filhotes fêmeas na mesma dose e nem nos filhotes de dose de 100 µg/kg no GD9.5. Assim, pode-se concluir que a exposição pré-natal ao LPS na dose de 500 µg/kg no GD16 pode ser utilizada como modelo translacional para estudo do TEA.

## REFERÊNCIAS

AMARAL, D. G.; SCHUMANN, C. M.; NORDAHL, C. W. Neuroanatomy of autism. **Trends Neurosci**, Davis, v. 31, n. 3, p. 137-45, Mar 2008. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18258309> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM-5**. Tradução: Nascimento, M. I. C. et al. Revisão Técnica: Cordioli, A. V. et al. 5. ed. Porto Alegre. Artmed. 2014. p. 50-58. ISBN 978-85-8271-089-0 Acessado em: 15 abr. 2017.

ANOMAL, R. F. et al. Impaired Processing in the Primary Auditory Cortex of an Animal Model of Autism. **Front Syst Neurosci**, Natal, v. 9, p. 158, 2015. ISSN 1662-5137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26635548> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

ASHDOWN, H. et al. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. **Mol Psychiatry**, Davis, v. 11, n. 1, p. 47-55, Jan 2006. ISSN 1359-4184 (Print) 1359-4184 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16189509> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

ASHWOOD, P.; VAN DE WATER, J. Is autism an autoimmune disease? **Autoimmun Rev**, Davis, v. 3, n. 7-8, p. 557-62, Nov 2004a. ISSN 1568-9972 (Print) 1568-9972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546805> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

ASHWOOD, P.; VAN DE WATER, J. A review of autism and the immune response. **Clin Dev Immunol**, Davis, v. 11, n. 2, p. 165-74, Jun 2004b. ISSN 1740-2522 (Print) 1740-2522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15330453> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

ASHWOOD, P.; WILLS, S.; VAN DE WATER, J. The immune response in autism: a new frontier for autism research. **J Leukoc Biol**, Davis, v. 80, n. 1, p. 1-15, Jul 2006. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16698940> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

BAHARNOORI, M.; BHARDWAJ, S. K.; SRIVASTAVA, L. K. Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: a prenatal infection model for developmental neuropsychiatric disorders. **Schizophr Bull**, Quebec, v. 38, n. 3, p. 444-56, May 2012. ISSN 1745-1701 (Electronic) 0586-7614 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805287> >. Acessado em: 15 abr. 2017.



BAHARNOORI, M.; BHARDWAJ, S.K.; SRIVASTAVA, L.K. Effect of maternal lipopolysaccharide administration on the development of dopaminergic receptors and transporter in the rat offspring. **PLoS One**, Quebec, v. 8, n. 1, p. e54439, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23349891> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

BAKER, P. M. et al. Ongoing behavioral state information signaled in the lateral habenula guides choice flexibility in freely moving rats. **Front Behav Neurosci**, Seattle, v. 9, p. 295, 2015. ISSN 1662-5153 (Print)

1662-5153 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26582981> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

BALLENDINE, S. A. et al. Behavioral alterations in rat offspring following maternal immune activation and ELR-CXC chemokine receptor antagonism during pregnancy: implications for neurodevelopmental psychiatric disorders. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, Saskatoon, v. 57, p. 155-65, Mar 03 2015. ISSN 1878-4216 (Electronic)

0278-5846 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25445065> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

BARON-COHEN, S. et al. The amygdala theory of autism. **Neurosci Biobehav Rev**, Cambridge, v. 24, n. 3, p. 355-64, May 2000. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781695> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

BASSI, G. S. et al. Lipopolysaccharide-induced sickness behaviour evaluated in different models of anxiety and innate fear in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, Ribeirão Preto, v. 110, n. 4, p. 359-69, Apr 2012. ISSN 1742-7843 (Electronic)

1742-7835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22059515> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

BERBEL, P.; NAVARRO, D.; ROMAN, G. C. An evo-devo approach to thyroid hormones in cerebral and cerebellar cortical development: etiological implications for autism. **Front Endocrinol (Lausanne)**, Alicante, v. 5, p. 146, 2014. ISSN 1664-2392 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25250016> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

BERNARDI, M. M. et al. Prenatal lipopolysaccharide exposure affects maternal behavior and male offspring sexual behavior in adulthood. **Neuroimmunomodulation**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 47-55, 2010. ISSN 1423-0216 (Electronic)

1021-7401 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19816057> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

BERNARDI, M.M.; KIRSTEN, T.B.; TRINDADE, M.O. Sobre o Autismo, Neuroinflamação e Modelos Animais para o Estudo de Autismo: Uma Revisão. **Revista Neurociências**. São Paulo. v. 20, p. 117-127, 2012;

BOISSIER, J. R.; SIMON, P. [The exploration reaction in the mouse. Preliminary note]. **Therapie**, [S.l.]: v. 17, p. 1225-32, Nov-Dec 1962. ISSN 0040-5957 (Print)

0040-5957 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13968530> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. **Brain Behav Immun**, Quebec, v. 24, n. 6, p. 881-97, Aug 2010. ISSN 1090-2139 (Electronic) 0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20230889> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

BRIDGES, R. S. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. **Front Neuroendocrinol**, Massachusetts, v. 36, p. 178-96, Jan 2015. ISSN 1095-6808 (Electronic) 0091-3022 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25500107> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

CHEN, S.; XING, Y.; KANG, J. Latent and Abnormal Functional Connectivity Circuits in Autism Spectrum Disorder. **Front Neurosci**, Maryland, v. 11, p. 125, 2017. ISSN 1662-4548 (Print) 1662-453X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28377688> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

CHOMIAK, T. et al. Altering the trajectory of early postnatal cortical development can lead to structural and behavioural features of autism. **BMC Neurosci**, Alberta, v. 11, p. 102, Aug 19 2010. ISSN 1471-2202 (Electronic) 1471-2202 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20723245> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

CLANCY, B. et al. Extrapolating brain development from experimental species to humans. **Neurotoxicology**, Arkansas, v. 28, n. 5, p. 931-7, Sep 2007. ISSN 0161-813X (Print) 0161-813X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368774> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

COURCHESNE, E. et al. Mapping early brain development in autism. **Neuron**, San Diego, v. 56, n. 2, p. 399-413, Oct 25 2007. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964254> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. **Eur J Pharmacol**, Urbana, v. 500, n. 1-3, p. 399-411, Oct 01 2004. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464048> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Autistic children: a neuroimmune perspective. **Brain Behav Immun**, Urbana, v. 22, n. 6, p. 804-5, Aug 2008. ISSN 1090-2139 (Electronic) 0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18420377> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

DEPINO, A. M. Early prenatal exposure to LPS results in anxiety- and depression-related behaviors in adulthood. **Neuroscience**, Buenos Aires, v. 299, p. 56-65, Jul 23 2015. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25943476> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

DIETERT, R. R.; DIETERT, J. M.; DEWITT, J. C. Environmental risk factors for autism. **Emerg Health Threats J**, Ithaca, v. 4, p. 7111, Apr 20 2011. ISSN 1752-8550 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24149029> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

FLEMING, A. S.; O'DAY, D. H.; KRAEMER, G. W. Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. **Neurosci Biobehav Rev**, Toronto, v. 23, n. 5, p. 673-85, May 1999. ISSN 0149-7634 (Print) 0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10392659> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

FOLEY, K. A. et al. Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to propionic acid and lipopolysaccharide on social behavior in neonatal, adolescent, and adult rats: implications for autism spectrum disorders. **Int J Dev Neurosci**, Ontario, v. 39, p. 68-78, Dec 2014. ISSN 1873-474X (Electronic) 0736-5748 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24747144> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

FOLEY, K. A. et al. Pre- and neonatal exposure to lipopolysaccharide or the enteric metabolite, propionic acid, alters development and behavior in adolescent rats in a sexually dimorphic manner. **PLoS One**, Ontario, v. 9, n. 1, p. e87072, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24466331> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

GENTILE, S. Prenatal antidepressant exposure and the risk of autism spectrum disorders in children. Are we looking at the fall of Gods? **J Affect Disord**, Salerno, v. 182, p. 132-7, Aug 15 2015. ISSN 1573-2517 (Electronic) 0165-0327 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25985383> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

GILMORE, J. H.; JARSKOG, L. F.; VADLAMUDI, S. Maternal infection regulates BDNF and NGF expression in fetal and neonatal brain and maternal-fetal unit of the rat. **J Neuroimmunol**, North Carolina, v. 138, n. 1-2, p. 49-55, May 2003. ISSN 0165-5728 (Print) 0165-5728 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742653> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

GU, X. et al. Anterior insular cortex and emotional awareness. **J Comp Neurol**, London, v. 521, n. 15, p. 3371-88, Oct 15 2013. ISSN 1096-9861 (Electronic) 0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749500> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neurosci Biobehav Rev**, Davis, v. 12, n. 2, p. 123-37, Summer 1988. ISSN 0149-7634 (Print) 0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3050629> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

KANNER, L. Autistic disturbance of affective contact. **Nervous Child**, [S.l.]: v. 2, p. 217-250, 1943.

KAS, M. J. et al. Assessing behavioural and cognitive domains of autism spectrum disorders in rodents: current status and future perspectives. **Psychopharmacology (Berl)**, Utrecht, v. 231, n. 6, p. 1125-46, Mar 2014. ISSN 1432-2072 (Electronic) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048469> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

KIRSTEN, T. B. et al. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. **J Neurosci Res**, São Paulo, v. 90, n. 10, p. 1903-12, Oct 2012. ISSN 1097-4547 (Electronic) 0360-4012 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22714803> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

KIRSTEN, T. B. et al. Prenatal LPS exposure reduces olfactory perception in neonatal and adult rats. **Physiol Behav**, São Paulo, v. 104, n. 3, p. 417-22, Sep 01 2011. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570993> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

KIRSTEN, T. B. et al. Prenatal lipopolysaccharide reduces motor activity after an immune challenge in adult male offspring. **Behav Brain Res**, São Paulo, v. 211, n. 1, p. 77-82, Jul 29 2010. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226214> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

KIRSTEN, T. B. et al. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. **Neuroimmunomodulation**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 240-51, 2010. ISSN 1423-0216 (Electronic) 1021-7401 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20203530> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

KLUGER, M. J. Is fever beneficial? **Yale J Biol Med**, Michigan, v. 59, n. 2, p. 89-95, Mar-Apr 1986. ISSN 0044-0086 (Print) 0044-0086 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3488621> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

KOCOVSKA, E. et al. Vitamin-D Deficiency As a Potential Environmental Risk Factor in Multiple Sclerosis, Schizophrenia, and Autism. **Front Psychiatry**, London, v. 8, p. 47, 2017. ISSN 1664-0640 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28396640> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

KUMAR, H.; SHARMA, B. Memantine ameliorates autistic behavior, biochemistry & blood brain barrier impairments in rats. **Brain Res Bull**, Uttar Pradesh, v. 124, p. 27-39, Jun 2016a. ISSN 1873-2747 (Electronic) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27034117> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

KUMAR, H.; SHARMA, B . Minocycline ameliorates prenatal valproic acid induced autistic behaviour, biochemistry and blood brain barrier impairments in rats. **Brain Res**, Uttar Pradesh, v. 1630, p. 83-97, Jan 01 2016b. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26551768> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

KUMAR, H.; SHARMA, B. M.; SHARMA, B. Benefits of agomelatine in behavioral, neurochemical and blood brain barrier alterations in prenatal valproic acid induced autism spectrum disorder. **Neurochem Int**, Uttar Pradesh, v. 91, p. 34-45, Dec 2015. ISSN 1872-9754 (Electronic) 0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26498253> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

LEEKAM, S. R. et al. Describing the sensory abnormalities of children and adults with autism. **J Autism Dev Disord**, Durhan, v. 37, n. 5, p. 894-910, May 2007. ISSN 0162-3257 (Print) 0162-3257 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17016677> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

MAQUIAVEL, N. O príncipe. Tradução: Antônio Caruccio-Caporale. **L&PM POCKET**. [S.l] 2008. v. 110, p. 126. ISBN 978-85-254-0895-2

MARKRAM, K. et al. Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**, Lausanne, v. 33, n. 4, p. 901-12, Mar 2008. ISSN 0893-133X (Print) 0893-133X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507914> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

MARTIN, L. A.; GOLDDOWITZ, D.; MITTLEMAN, G. Repetitive behavior and increased activity in mice with Purkinje cell loss: a model for understanding the role of cerebellar pathology in autism. **Eur J Neurosci**, Azusa, v. 31, n. 3, p. 544-55, Feb 2010. ISSN 1460-9568 (Electronic) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20105240> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

MELANCIA, F. et al. Testing the correlation between experimentally-induced hypothyroidism during pregnancy and autistic-like symptoms in the rat offspring. **Behav Brain Res**, Roma, v. 321, p. 113-122, Mar 15 2017. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28034801> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

MEYER, U.; FELDON, J.; FATEMI, S. H. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. **Neurosci Biobehav Rev**, Zurich, v. 33, n. 7, p. 1061-79, Jul 2009. ISSN 1873-7528 (Electronic) 0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442688> >. Acessado em: 15 abr. 2017.



MEYER, U. et al. Prenatal and postnatal maternal contributions in the infection model of schizophrenia. **Exp Brain Res**, Zurich, v. 173, n. 2, p. 243-57, Aug 2006. ISSN 0014-4819 (Print)

0014-4819 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16552558> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

MIKULECKA, A. et al. Consequences of early postnatal benzodiazepines exposure in rats. I. Cognitive-like behavior. **Front Behav Neurosci**, Prague, v. 8, p. 101, 2014. ISSN 1662-5153 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24734010> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

MINSHEW, N. J.; KELLER, T. A. The nature of brain dysfunction in autism: functional brain imaging studies. **Curr Opin Neurol**, Pittsburgh, v. 23, n. 2, p. 124-30, Apr 2010. ISSN 1473-6551 (Electronic)

1350-7540 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20154614> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

ORNOY, A.; WEINSTEIN-FUDIM, L.; ERGAZ, Z. Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). **Reprod Toxicol**, Jerusalem, v. 56, p. 155-69, Aug 15 2015. ISSN 1873-1708 (Electronic)

0890-6238 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26021712> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

OSKVIG, D. B. et al. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. **Brain Behav Immun**, Bethesda, v. 26, n. 4, p. 623-34, May 2012. ISSN 1090-2139 (Electronic)

0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22310921> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

PAINTLIA, M. K. et al. N-acetylcysteine prevents endotoxin-induced degeneration of oligodendrocyte progenitors and hypomyelination in developing rat brain. **J Neurosci Res**, South Carolina, v. 78, n. 3, p. 347-61, Nov 01 2004. ISSN 0360-4012 (Print)

0360-4012 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15389835> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

PAINTLIA, M. K. et al. Lipopolysaccharide-induced peroxisomal dysfunction exacerbates cerebral white matter injury: attenuation by N-acetyl cysteine. **Exp Neurol**, South Carolina, v. 210, n. 2, p. 560-76, Apr 2008. ISSN 0014-4886 (Print)

0014-4886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18291369> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

PAINTLIA, M. K. et al. Attenuation of lipopolysaccharide-induced inflammatory response and phospholipids metabolism at the feto-maternal interface by N-acetyl cysteine. **Pediatr Res**, South Carolina, v. 64, n. 4, p. 334-9, Oct 2008. ISSN 1530-0447 (Electronic)

0031-3998 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18552708> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

PARDO, C. A.; EBERHART, C. G. The neurobiology of autism. **Brain Pathol**, Baltimore, v. 17, n. 4, p. 434-47, Oct 2007. ISSN 1015-6305 (Print) 1015-6305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919129> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

PATTERSON, P. H. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. **Behav Brain Res**, Pasadena, v. 204, n. 2, p. 313-21, Dec 07 2009. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136031> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

PATTERSON, P. H. et al. Maternal infection and immune involvement in autism. **Trends Mol Med**, Pasadena, v. 17, n. 7, p. 389-94, Jul 2011. ISSN 1471-499X (Electronic) 1471-4914 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21482187> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

PAXINIOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 6. ed, 2007. [S.l.s.m]: p.[]: figures 8-56. ISBN 13:978-0-12-374121-9

PECCHI, E. et al. Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. **Physiol Behav**, Marseille, v. 97, n. 3-4, p. 279-92, Jun 22 2009. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19275907> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, London, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985. ISSN 0165-0270 (Print) 0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2864480> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

PENTEADO, S. H. et al. Prenatal lipopolysaccharide disrupts maternal behavior, reduces nest odor preference in pups, and induces anxiety: studies of F1 and F2 generations. **Eur J Pharmacol**, São Paulo, v. 738, p. 342-51, Sep 05 2014. ISSN 1879-0712 (Electronic) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24927995> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

SERVADIO, M. et al. Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autistic-like symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid. **Transl Psychiatry**, Roma, v. 6, n. 9, p. e902, Sep 27 2016. ISSN 2158-3188 (Electronic) 2158-3188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27676443> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

SERVADIO, M.; VANDERSCHUREN, L. J.; TREZZA, V. Modeling autism-relevant behavioral phenotypes in rats and mice: Do 'autistic' rodents exist? **Behav Pharmacol**, Roma, v. 26, n. 6, p. 522-40, Sep 2015. ISSN 1473-5849 (Electronic) 0955-8810 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26226143> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

SMITH, S. E. et al. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. **J Neurosci**, Pasadena, v. 27, n. 40, p. 10695-702, Oct 03 2007. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17913903> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

SOSA-DIAZ, N. et al. Prefrontal cortex, hippocampus, and basolateral amygdala plasticity in a rat model of autism spectrum. **Synapse**, Puebla, v. 68, n. 10, p. 468-73, Oct 2014. ISSN 1098-2396 (Electronic)

0887-4476 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24985713> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

SPENCE, H. R. et al. Vocal coselection in rat pup ultrasonic vocalizations. **Ecol Evol**, Massachusetts, v. 6, n. 7, p. 1922-9, Apr 2016. ISSN 2045-7758 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27066218> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **Eur J Pharmacol**, Tokio, v. 350, n. 1, p. 21-9, May 29 1998. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9683010> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

TAYLOR, P. V. et al. Sexually dimorphic effects of a prenatal immune challenge on social play and vasopressin expression in juvenile rats. **Biol Sex Differ**, Massachusetts, v. 3, n. 1, p. 15, Jun 14 2012. ISSN 2042-6410 (Electronic)

2042-6410 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22697211> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

UMEDA, T. et al. Evaluation of Pax6 mutant rat as a model for autism. **PLoS One**, Sendai, v. 5, n. 12, p. e15500, Dec 21 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21203536> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

URAKUBO, A. et al. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. **Schizophr Res**, Chapel Hill, v. 47, n. 1, p. 27-36, Jan 15 2001. ISSN 0920-9964 (Print)

0920-9964 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163542> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

VAN KERKHOFF, L. W. et al. Functional integrity of the habenula is necessary for social play behaviour in rats. **Eur J Neurosci**, Utrecht, v. 38, n. 10, p. 3465-75, Nov 2013. ISSN 1460-9568 (Electronic)

0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24103016> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

VANDERSCHUREN, L. J.; ACHTERBERG, E. J.; TREZZA, V. The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. **Neurosci Biobehav Rev**, Utrecht, v. 70, p. 86-105, Nov 2016. ISSN 1873-7528 (Electronic)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27587003> >. Acessado em: 15 abr. 2017.



VANDERSCHUREN, L. J.; TREZZA, V. What the laboratory rat has taught us about social play behavior: role in behavioral development and neural mechanisms. **Curr Top Behav Neurosci**, Utrecht, v. 16, p. 189-212, 2014. ISSN 1866-3370 (Print) 1866-3370 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24338663> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Glucocorticoids disrupt neuroendocrine and behavioral responses during lactation. **Endocrinology**, Alfenas, v. 152, n. 12, p. 4838-45, Dec 2011. ISSN 1945-7170 (Electronic) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21933864> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid receptor agonist disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. **Behav Brain Res**, Alfenas, v. 263, p. 190-7, Apr 15 2014. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24495659> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

WICKER, B.; MONFARDINI, E.; ROYET, J. P. Olfactory processing in adults with autism spectrum disorders. **Mol Autism**, Marseille, v. 7, p. 4, 2016. ISSN 2040-2392 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26788281> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

YIRMIYA, R. et al. Behavioral effects of lipopolysaccharide in rats: involvement of endogenous opioids. **Brain Res**, Jerusalem, v. 648, n. 1, p. 80-6, Jun 13 1994. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7922530> >. Acessado em: 15 abr. 2017.

## ANEXO

ANEXO A – Parecer da comissão de ética e pesquisa.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
**Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG**  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG CEP 37130-000  
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da administração de LPS em ratas prenhas e suas consequências sobre o desenvolvimento comportamental dos filhotes como modelo de autismo", registrada com o nº 23/2016, sob a responsabilidade de Alexandre Giuti-Paiva – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS, em reunião de 02/06/2016.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 02/06/2016 a 08/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	200
Sexo	Machos (10 adultos e 80 filhotes) Fêmeas (30 adultos e 80 filhotes)
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 06 de junho de 2016.

*Estela Regina de Oliveira*  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Estela Regina de Oliveira  
 Coordenadora CEUA-UNIFAL



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
**Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG**  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG. CEP 37130-000  
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



## CERTIFICATE

We hereby certify that the proposal entitled “Effect of LPS administration in pregnant rats and its consequences on the behavioral development of puppies as autism model”, registration number 23/2016, under the responsibility of Alexandre Giusti-Paiva, which implies production, maintenance or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans), for the purpose of scientific research, is in compliance with Law no. 11794, published on October 8<sup>th</sup>, 2008, with Decree no. 6899, published on July 15<sup>th</sup>, 2009, and with the guidelines issued by the National Council on the Control of Animal Experimentation (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA), and was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA-UNIFAL) (Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas) on 06/02/2016.

Purpose: ( ) Teaching		( X ) Scientific research
Expiration date	08/2017	
Species/strain/breed	Wistar rat / Outbred	
Number of animals	200	
Sex	Male (10 adults and 80 puppies) Female (30 adults and 80 puppies)	
Origin	Central Vivarium UNIFAL-MG	

Alfenas, June 6, 2016.

*Estela Regina de Oliveira*, PhD  
 CEUA/UNIFAL Coordinator