

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

SHEILA SOUZA PARREIRAS

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO
EXPERIMENTAL DE AUTISMO E AO EMPOBRECIMENTO DO AMBIENTE
PÓS-NATAL POR ISOLAMENTO.**

Alfenas/MG

2018

SHEILA SOUZA PARREIRAS

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO
EXPERIMENTAL DE AUTISMO E AO EMPOBRECIMENTO DO AMBIENTE
PÓS-NATAL POR ISOLAMENTO.**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia.
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva.

Alfenas/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Sheila Souza Parreiras.
S543a Avaliação comportamental de ratos submetidos a um modelo experimental de autismo e ao empobrecimento ambiental do ambiente pós-natal por isolamento / Sheila Souza Parreiras. -- Alfenas/MG, 2018. 135 f.: il.--

Orientador: Alexandre Giusti Paiva.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2018.
Bibliografia.

1. Transtorno Autístico. 2. Lipopolissacarídeo. 3. Sistema Imune. 4. Isolamento social. I. Paiva, Alexandre Giusti. II. Título.

CDD- 571

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

SHEILA SOUZA PARREIRAS

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO
EXPERIMENTAL DE AUTISMO E AO EMPOBRECIMENTO DO AMBIENTE
PÓS-NATAL POR ISOLAMENTO.**

A banca abaixo-assinada aprova a dissertação como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia.

Aprovada em 25/07/2018

Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: _____

Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Júnior

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: _____

Profª. Dra. Layla Dutra Marinho Cabral

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade e pela excelente formação que recebi, tanto na graduação quanto na pós-graduação. Ao Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva, por ter aceitado me orientar, pela orientação que me fez enxergar um mundo completamente novo na pesquisa, pela confiança, pelo imenso aprendizado e pela gentileza com que me tratou durante todo o mestrado.

À Prof^a. Dra. Fabiana Cardoso Vilela Giusti pelas dicas e orientações, especialmente por ter me ensinado tudo sobre o ciclo reprodutivo das ratas e pela ajuda quanto ao comportamento materno e ao isolamento dos animais. Aos colegas: Fernando, por ter me apresentado o modelo experimental, bem como muitos dos experimentos que realizei neste trabalho; Mara, pelos conselhos e orientações sobre a pós-graduação; Tati, pela convivência agradável e pela ajuda com a remoção de estruturas cerebrais; Bianca, por ter me ensinado a técnica de remoção de cérebros, pela amizade e pelos conselhos; Wesley, pelas inestimáveis explicações de estatística e pelas conversas enriquecedoras sobre pesquisa; Carol, pela amizade, por ter me ensinado a técnica de remoção da adrenal, pela ajuda nos experimentos e por compreender meu amor pelos ratinhos; Ana Cláudia, pela ajuda constante, pela imensa boa vontade e presteza, e principalmente, pela amizade e por ter me ouvido e apoiado nos momentos difíceis. Sílvia e Mel pelas caronas e conversas agradáveis e Zé pelo cuidado com os meus animais.

Quando cheguei ao laboratório, não sabia absolutamente nada de pesquisa com animais, então cada passo do caminho teve a ajuda e apoio de cada um!

Aos meus pais, pelo incentivo constante e pelas demonstrações de orgulho que me fazem querer sempre melhorar como pessoa e como profissional. À Gabi, Mari (tô cansada! Tô exausta!), Priscila (gêmula), Anézio, Magda e Dérik (migo!) pela paciência e compreensão nos meus sumiços e ausências, e especialmente, pelas cervejas e conversas que recarregaram minhas baterias durante esses dois anos.

À Jacqueline, por ter segurado todos os meus PT's, por ter ouvido cada detalhe de todas as conquistas e problemas, pela eterna consultoria profissional, por me empurrar praticando a goela abaixo sempre que precisei. Miga, nem sei como agradecer a você por ser você. Te amo!

À Taya, pela imensa paciência, pelo apoio emocional constante, pela parceria a cada passo do caminho, pelo companheirismo inabalável, pelos almoços na universidade aos domingos (e pela comida maravilhosa), pelo apoio durante os períodos de experimento em que eu “acampava” no laboratório, pelo cuidado e carinho com nossos animais e com nossa casa, o

que me permitiu focar na pesquisa sem preocupações, e principalmente, pelo amor que me faz querer mais da vida sempre. É noiz que avôa, biscoito! Te amo!

À todo o pessoal da ETAP: sem vocês o título de mestre não teria o mesmo significado! Principalmente ao Thiago, que foi quem acreditou no meu trabalho primeiro. E por fim, à todos aqueles que de alguma maneira direta ou indireta contribuíram com o meu trabalho e compartilharam comigo alguma parte da jornada. Muito obrigada!

RESUMO

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) é uma classe de distúrbios do neurodesenvolvimento que afeta cerca de meio milhão de pessoas no Brasil, caracterizado pelo comprometimento dos domínios da interação social, comunicação e flexibilidade comportamental. O modelo experimental de autismo por exposição pré-natal ao LPS é um modelo novo e pouco estudado, que pode ajudar a compreender a etiologia e a fisiopatologia do distúrbio. Estudos prévios suportam a evidência de que alterações no ambiente pós-natal são capazes de modular o fenótipo do TEA. O isolamento precoce tem sido associado ao desenvolvimento de comportamentos do tipo-autista, do tipo-ansioso e do tipo-depressivo. Neste trabalho foram estudadas as alterações comportamentais na prole submetida ao modelo de autismo por exposição ao LPS no período gestacional, ao isolamento precoce e à combinação de ambos. Os resultados indicaram que a prole masculina é susceptível ao modelo de indução ao TEA, enquanto a prole feminina é susceptível ao desenvolvimento do comportamento do tipo-ansioso. O isolamento individualmente não foi capaz de provocar alterações comportamentais, porém, quando associado à administração gestacional de LPS foi capaz de prevenir alguns dos prejuízos provocados pelo modelo de indução ao TEA.

Palavras-chave: Transtorno do espectro autista. Ativação do sistema imune materno. Isolamento neonatal.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a class of neurodevelopmental disorders that affects about half a million people in Brazil, characterized by impairments in social interaction, communication and behavioral flexibility. The ASD animal model by the prenatal LPS exposure is a new model that may help to understand the etiology and pathophysiology of the disorder. Previous studies support the evidence that changes in the postnatal environment can modulate the ASD phenotype. Early isolation has been associated with the development of autistic-, anxiety-, and depressive-like behaviors. In this study, we investigated behavioral alterations in offspring exposed to prenatal LPS, neonatal isolation and the combination of both factors. The results indicated that male offspring are susceptible to the ASD model, while female offspring are susceptible to the development of anxiety-like behavior. Isolation alone was not related to any behavioral changes, however, when associated with prenatal LPS exposure, prevented some of the damage caused by the ASD model.

Keywords: Autism spectrum disorder. Maternal immune activation. Neonatal isolation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Guipos experimentais.....	36
Figura 2	Procedimentos e experimentos que foram realizados na Etapa I.....	37
Figura 3	Experimentos que foram realizados na Etapa II.....	38
Figura 4	Experimentos que foram realizados na Etapa III.....	38
Figura 5	Cronograma de realização dos experimentos realizados com a prole.....	38
Figura 6	Efeitos da administração intraperitoneal de LPS em ratas gestantes (500µg/kg no 16º dia de gestação) sobre os parâmetros do comportamento doentio materno.....	51
Figura 7	Comportamento materno total no período matutino (8h – 9:30h) entre os dias de lactação 2 e 20.....	53
Figura 8	Comportamento materno total semanal no período matutino (8h – 9:30h) entre os dias de lactação 2 e 20.....	53
Figura 9	Avaliação dos parâmetros do comportamento materno no período matutino (8h – 9:30h) entre os dias de lactação 2 e 20.....	54
Figura 10	Avaliação do comportamento materno total no período vespertino (15:30h – 17:00h) entre os dias de lactação 2 e 20.....	55
Figura 11	Avaliação do comportamento materno total semanal no período vespertino (15:30h – 17:00h) entre os dias de lactação 2 e 20.....	56
Figura 12	Avaliação de cada parâmetro isoladamente no período vespertino (15:30h – 17:00h) entre os dias de lactação 2 e 20.....	57
Figura 13	Efeitos da administração de LPS no período gestacional sobre o número de filhotes nascidos vivos (A) e sobre o peso das ninhadas precedente a padronização (B).....	59
Figura 14	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre o peso das ninhadas após padronização.....	59
Figura 15	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre o peso dos animais adultos.....	60
Figura 16	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre a comunicação da prole masculina e feminina.....	61
Figura 17	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre o tempo de latência para atingir a maravalha do ninho e no número de saídas da maravalha do ninho.....	62
Figura 18	Comparação do tempo de latência para atingir a maravalha materna na prole masculina e na prole feminina.....	63
Figura 19	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre a distância percorrida, o tempo de imobilidade e o número de <i>self grooming</i> no teste de campo aberto.....	64
Figura 20	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento no comportamento de brincar da prole feminina.....	65

Figura 21	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental no comportamento de brincar da prole masculina.....	66
Figura 22	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre o tempo despendido nos braços abertos e nos braços fechados no labirinto em cruz elevado.....	67
Figura 23	Comparação do tempo despendido nos braços abertos pela prole feminina e pela prole masculina.....	68
Figura 24	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre o número de mergulhos nos buracos na prole masculina e feminina.....	69
Figura 25	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental sobre o tempo latência para atingir a plataforma nos cinco dias de treino do labirinto aquático.....	70
Figura 26	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental sobre o tempo de latência para atingir o local da plataforma, o tempo de permanência no quadrante alvo e a distância percorrida no labirinto aquático.....	71
Figura 27	Comparação do tempo de latência para atingir a plataforma na prole feminina e masculina.....	72
Figura 28	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre na fase de exposição ao odor de gato.....	74
Figura 29	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre a fase de contexto do teste de exposição ao odor de gato.....	75
Figura 30	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental no tempo despedido nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado.....	77
Figura 31	Comparação do tempo despendido nos braços fechados do labirinto em cruz elevado pela prole feminina e pela prole masculina.....	78
Figura 32	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental sobre os parâmetros da interação social na prole feminina.....	79
Figura 33	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental sobre os parâmetros da interação social na prole masculina.....	80
Figura 34	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental sobre os parâmetros do campo aberto.....	81
Figura 35	Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental no peso da glândula adrenal na prole masculina e feminina.....	82
Figura 36	Comparação dos efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental no peso da glândula adrenal na prole masculina e na feminina.....	83

Fotografia 1	Incubadora com nichos individualizados utilizada para o isolamento dos animais.....	35
Fotografia 2	Aparato para o teste do campo aberto.....	40
Fotografia 3	Estação utilizada para o teste de vocalização ultrassônica.....	41
Fotografia 4	Caixa utilizada no teste de <i>homing response</i> contendo maravalha limpa e maravalha proveniente do ninho.....	42
Fotografia 5	Aparato utilizado no teste de campo aberto da prole adulta.....	43
Fotografia 6	Caixa de vidro preparada para o teste do comportamento de brincar.....	44
Fotografia 7	Aparato preparado para o teste do labirinto em cruz elevado.....	45
Fotografia 8	Aparato preparado para o teste da tábua-de-buracos.....	46
Fotografia 9	Aparato utilizado no teste do labirinto aquático de Morris.....	47
Fotografia 10	Aparato preparado para o teste de exposição ao odor de gato.....	48
Fotografia 11	Aparato preparado para o teste de interação social.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DG	Dia de gestação
DL	Dia de lactação
DPN	Dia pós-natal
CNTN4	Gene da proteína Contactina 4
CNTNAP2	Gene da proteína semelhante à proteína associada à Contactina 2
IL	Interleucina
ISO	Isolamento
LPS	Lipopolissacarídeo
LPS + ISO	LPS associado ao isolamento
NLGN3	Gene da proteína Neurogila 3
NLGN4	Gene da proteína Neurogila 4
NMDA	N-metil-D-aspartato
NRXN1 β	Gene da proteína Neuroxina 1 beta
Poly:C	Ácido poliribonucleico-polirribocitidílico
SAL	Solução salina
SRY	<i>Sex-determining region Y</i>
TEA	Transtorno do Espectro Autista
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TRL4	Receptor <i>Toll Like 4</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUDUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO.....	15
2.2	MODELOS ANIMAIS DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA	20
2.2.1	Modelos animais de ativação do sistema imune materno.....	21
2.2.2	Modelo animal de autismo por exposição gestacional ao LPS.....	24
2.3	FATORES AMBIENTAIS PÓS-NATAIS NA MODULAÇÃO DO FENÓTIPO DO TEA.....	27
3	JUSTIFICATIVA.....	31
4	OBJETIVOS.....	33
4.1	OBJETIVO GERAL.....	33
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
5.1	ANIMAIS.....	34
5.2	SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS.....	34
5.3	MODELO EXPERIMENTAL DE AUTISMO.....	35
5.4	EMPOBRECIMENTO AMBIENTAL POR ISOLAMENTO.....	35
5.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	36
5.6	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	37
5.6.1	Comportamento doentio materno.....	38
5.6.1.1	<i>Avaliação da ingestão alimentar e da alteração de peso corporal.....</i>	38
5.6.1.2	<i>Campo aberto.....</i>	38
5.6.2	Comportamento Materno.....	40
5.6.3	Vocalização ultrassônica.....	41
5.6.4	Campo aberto.....	43
5.6.5	<i>Play Behavior.....</i>	43
5.6.6	Labirinto em cruz elevado.....	44
5.6.7	Tábua-de-buracos.....	45
5.6.8	Labirinto aquático de Morris.....	46
5.6.9	Exposição ao odor de gato.....	47
5.6.10	Teste de interação social.....	48
5.6.11	Avaliação do peso da glândula adrenal.....	49
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
6	RESULTADOS.....	51
6.1	RESULTADOS DA ETAPA I – EXPERIMENTOS REALIZADOS COM FÊMEAS GESTANTES E LACTANTES.....	51
6.1.1	Comportamento doentio materno.....	51
6.1.2	Variação da sensibilidade ao LPS.....	52
6.1.3	Comportamento Materno.....	52
6.1.3.1	<i>Período matutino.....</i>	52

6.1.3.2	<i>Período Vespertino</i>	55
6.2	RESULTADOS DOS EFEITOS GERAIS DA ADMINISTRAÇÃO DE LPS NO PERÍODO GESTACIONAL E DO EMPOBRECIMENTO AMBIENTAL POR ISOLAMENTO NAS NINHADAS.....	58
6.2.1	Avaliação do peso e tamanho das ninhadas.....	58
6.3	RESULTADOS DA ETAPA II – EXPERIMENTOS REALIZADOS COM FILHOTES ENTRE OS DIAS DE VIDA 13 E 32.....	60
6.3.1	Vocalização.....	60
6.3.2	<i>Homing response</i>	61
6.3.3	Campo aberto.....	63
6.3.4	Comportamento de brincar.....	64
6.3.5	Labirinto em cruz elevado.....	67
6.3.6	Tábua-de-buracos.....	68
6.4	RESULTADOS DA ETAPA III – EXPERIMENTOS REALIZADOS COM A PROLE ADULTA.....	69
6.4.1	Labirinto aquático de Morris.....	69
6.4.2	Exposição ao odor de gato.....	72
6.4.3	Labirinto em cruz elevado.....	76
6.4.4	Interação social.....	78
6.4.5	Campo aberto.....	80
6.4.6	Peso da glândula adrenal.....	82
7	DISCUSSÃO	84
7.1	COMPORTAMENTO DO ENTIO MATERNO.....	84
7.2	EFEITOS GERAIS DA ADMINISTRAÇÃO DE LPS NO PERÍODO GESTACIONAL E DO EMPOBRECIMENTO AMBIENTAL NO PESO E TAMANHO DAS NINHADAS.....	85
7.3	COMPORTAMENTO MATERNO.....	88
7.4	EXPERIMENTOS REALIZADOS COM A PROLE NA INFÂNCIA, ADOLESCENCIA E VIDA ADULTA.....	90
8	CONCLUSÕES	103
	REFERENCIAS	104
	APÊNDICE	127

1 INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado pelo comprometimento dos domínios da interação social, comunicação e flexibilidade comportamental (GOH; PETERSON, 2011). É um distúrbio complexo, que apresenta uma grande heterogeneidade fenotípica e curso clínico variável (BRITO; VASCONSELOS, 2016).

A fisiopatologia, bem como a etiologia do transtorno são pouco compreendidas, porém, evidências sugerem que se trate de uma interação entre fatores genéticos e ambientais (KLIN, 2006). Em relação aos aspectos ambientais, embora diversos estudos se proponham a avaliar a influência do enriquecimento ambiental na mitigação dos sintomas do TEA (YANG et al, 2011; REYNOLD; URRELA; DEVINE, 2013; WOO et al, 2015), não foram encontradas investigações a respeito dos efeitos do empobrecimento ambiental no fenótipo do transtorno.

A heterogeneidade do fenótipo bem como a multiplicidade de possíveis fatores etiológicos são barreiras que dificultam as pesquisas clínicas, o que levou à necessidade do desenvolvimento de modelos experimentais (SCHLIKMANN; FORTUNATO, 2013). Como nenhum modelo é capaz de mimetizar todas as características do TEA, o desenvolvimento de modelos variados de maneira a explorar os diversos aspectos do transtorno é extremamente desejável (SERVADIO; VANDERSCHUREN; TREZZA, 2015).

O modelo animal de autismo pela exposição materna ao lipopolissacarídeo (LPS) é um modelo novo (KIRSTEIN, 2012) e pouco estudado. O isolamento neonatal é bem documentado na literatura, sendo capaz de provocar, inclusive, comportamentos do tipo-autista em animais (TAN et al, 2018; BAHI, 2016; WU et al, 2014).

Assim, este trabalho se propôs a investigar as alterações comportamentais de ratos submetidos a este modelo experimental, bem como avaliar a influência do empobrecimento ambiental, através do isolamento, na apresentação do fenótipo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) é uma classe de distúrbios do neurodesenvolvimento (ZANON; BACKES; BOSA, 2014) que produzem prejuízos qualitativos e quantitativos na interação social, comunicação e flexibilidade comportamental (GOH; PETERSON, 2011). É um transtorno complexo, de curso clínico heterogêneo (CONCEIÇÃO et al, 2013) que apresenta uma grande variabilidade de na intensidade e forma de expressão da sintomatologia (ZANON; BACKES; BOSA, 2014).

Afeta crianças em idade precoce, com início da sintomatologia antes dos três anos de idade (SANTOS et al, 2015). Embora tenha sido descrito originalmente como um transtorno inato, com apresentação de sintomatologia desde o nascimento (KANNER, 1943), a evolução das investigações sobre a doença permitiu a identificação de pelo menos dois cursos distintos de evolução clínica, podendo o TEA desencadear alterações perceptíveis a partir do primeiro trimestre de vida, com alterações progressivas nos dois primeiros anos do desenvolvimento infantil ou se manifestar após um período de desenvolvimento normal da criança com regressão ou perda de habilidades durante o segundo ano de vida (WERNER et al, 2005).

Apresenta distribuição desigual por sexo, sendo cerca de quatro vezes mais frequentes em meninos que em meninas (CALABRESEC et al, 2016; GOH; PETERSON, 2011), porém, quando afetadas, as meninas tendem a desenvolver a forma mais severa de TEA, associada à grave comprometimento cognitivo (SADOCK; SADOCK, 2007).

É considerado um dos mais frequentes transtornos mentais da infância (MINETO; LÖRH, 2016), embora sua prevalência não esteja bem estabelecida, variando de 0,7 a 72,6 casos a cada 10.000 crianças (GOH; PETERSON, 2011). É provável que diferenças metodológicas nos estudos epidemiológicos, bem como diferenças nos critérios de diagnóstico sejam responsáveis por essa variação (FLORES-PAJOT et al, 2016).

O transtorno afeta múltiplos domínios comportamentais, sendo a alteração no domínio da interação social sua característica essencial e definidora (GOH; PETERSON, 2011). As alterações sociais compreendem redução da interação social e comunicação, com isolamento ou falta de interesse no contato social, alteração acentuada em múltiplos comportamentos não verbais como expressão facial e postura corporal, redução ou ausência de contato visual, ausência de reciprocidade emocional e inabilidade para estabelecer laços afetivos (GOH; PETERSON, 2011; ZANON; BACKES; BOSA, 2014; CONNOR et al, 2016)

As alterações no domínio da linguagem e comunicação incluem atraso na aquisição e desenvolvimento da fala (CZERMAINSKI; BOSA; SALLES, 2013) ou ausência total da linguagem falada (GOH; PETERSON, 2011), uso repetitivo e estereotipado da linguagem com o desenvolvimento de manifestações vocais como ecolalia, inversão pronominal (SADOCK; SADOCK, 2007), gritos inadequados ou ruídos contínuos (PAULA; BELISÁRIO-FILHO; TEIXEIRA, 2016), ausência de brincadeiras imitativas sociais apropriadas ao nível de desenvolvimento e déficits na atenção compartilhada e em brincadeiras simbólicas (ZANON; BACKES; BOSA, 2014)

O domínio da flexibilidade comportamental também é afetado (GOH; PETERSON, 2011), ocorrendo padrões restritos e repetitivos de interesses e atividades (SADOCK; SADOCK, 2007), maneirismos motores estereotipados como balançar-se para frente e para trás, balançar as mãos ou andar na ponta dos pés (PAULA; BELISÁRIO-FILHO; TEIXEIRA, 2016), preocupação persistente com partes de objetos e adesão inflexível a rotinas específicas e não funcionais (GOH; PETERSON, 2011), com desejo obsessivo pela manutenção da uniformidade e medo de mudanças (SADOCK; SADOCK, 2007).

Comorbidades neurológicas e psiquiátricas são frequentemente associadas ao TEA (GOH; PETERSON, 2011). Deficiências cognitivas, que variam desde prejuízos cognitivos leves até atraso mental severo, estão presentes em 60 a 70% dos casos (PAULA; BELISÁRIO-FILHO; TEIXEIRA, 2016; GOH; PETERSON, 2011) e cerca de 30% dos portadores do transtorno apresentam também epilepsia (MASKI; JESTE; SPENCE, 2008). Alterações neuropsiquiátricas como hiperatividade, agressividade, ansiedade (DUARTE et al, 2016), depressão, sintomas obsessivo-compulsivos (GOH; PETERSON, 2011; SANDERS et al, 2008), automutilação e sensibilidade anormal à estímulos sensoriais (PEREIRA; RIESGO; WAGNER, 2008) também são frequentemente observadas em associação com o TEA.

Outras comorbidades incluem déficits motores relacionados à anormalidades na marcha, coordenação, movimentação de membros e estabilidade postural (MASKI; JESTE; SPENCE, 2011) e deficiências neurometabólicas, em especial distúrbios do metabolismo dos carboidratos e aminoácidos (GOH; PETERSON, 2011).

Em relação à etiologia e psicopatologia, no geral o TEA é pouco compreendido. A hipótese mais aceita atualmente é a de que o transtorno resulte de uma interação entre características genéticas e fatores ambientais, com envolvimento de múltiplos fatores de risco e proteção nos níveis biológico, psicológico e social (MANDY; LAI, 2016).

O fato dos fatores de risco e proteção apresentarem grande variação no tipo e magnitude ao longo do desenvolvimento do indivíduo, a complexa dinâmica entre o indivíduo e o ambiente

e a possibilidade dos mecanismos ambientais exercerem influência através do genoma por alterações no próprio genótipo ou por influenciar sua expressão, como através da epigenética, são características que dificultam a investigação e a compreensão do transtorno (MANDY; LAI, 2016). A multiplicidade de fatores e interações também pode explicar a grande heterogeneidade dos fenótipos do TEA (KLIN, 2006).

Em relação ao componente genético, o risco para TEA de familiares em primeiro grau de portadores do transtorno é de 20 a 80 vezes mais alto que na população em geral, de maneira que o transtorno se constitui o quadro neuropsiquiátrico de maior herdabilidade (GOH; PETERSON, 2011).

Nenhuma variante genética específica foi identificada como necessária ou suficiente para causar o TEA, sugerindo que exista uma heterogeneidade genética, com múltiplas variações que, ao se relacionarem com a composição genética global do indivíduo, contribuam em conjunto para a formação do fenótipo clínico (SOARES, 2015). As alterações genéticas incluem mutações novas e herdadas, polimorfismos e variantes do número de cópias (GOH; PETERSON, 2011).

A alta heterogeneidade genética do transtorno, com evidências de envolvimento de múltiplos modelos de herança, bem como as interações gene-ambiente, são fatores que dificultam o esclarecimento do componente genético na etiologia do TEA (HOMS et al, 2016), entretanto, foram identificadas alterações em diversos genes, em especial NLGN3 e 4, NRXN1 β , CNTN4, CNTNAP2 e SHANK3 (GOH; PETERSON, 2011).

Doenças genéticas como a síndrome do X frágil, síndrome de Down e esclerose tuberosa estão associadas ao aumento do risco para TEA, que quando ocorre em conjunto à esses quadros é denominado de autismo secundário (SADOCK; SADOCK, 2007). Genes relacionados ao atraso mental, autossômico ou ligado ao cromossomo X, também são frequentemente observados em portadores do transtorno (RIBEIRO; FREITAS; OLIVA-TELES, 2013).

Em relação ao componente ambiental, uma série de fatores tem sido associada ao desenvolvimento do TEA. O ambiente pré-natal, em especial, tem sido investigado por diversos estudos, uma vez que o cérebro em desenvolvimento é extremamente suscetível a problemas causados por fatores ambientais, principalmente no primeiro trimestre da gestação (LANDRIGAN, 2010).

Estudos retrospectivos têm relacionados fatores como doenças maternas como o diabetes gestacional (LYALL et al, 2012; LI et al, 2016), episódios prolongados de febre durante a gestação (ATLADOTTIR et al, 2012), uso de medicamentos como inibidores seletivos da receptação de serotonina (HEALY; LE NOURY; MANGIN, 2016; GIDAYA et al,

2014) e anticonvulsivantes, em especial o ácido valpróico (CHRISTENSEN et al, 2013), infecção por vírus como a rubéola (HUTTON, 2016), exposição a defensivos agrícolas, em especial os organofosforados (SHELTON et al, 2014), exposição à poluição do ar (FLORES-PAJOT et al, 2016) e ativação do sistema imunológico materno durante a gestação por infecções (MELTZER; WATER, 2016), com aumento do risco para TEA.

No período pós-natal os fatores ambientais, quando ocorrem em idade precoce, podem desempenhar um papel de gatilho desencadeando o desenvolvimento do fenótipo do TEA em indivíduos portadores da susceptibilidade genética. Quando ocorrem após o desenvolvimento do transtorno, podem ter impacto na gravidade dos sintomas e no resultado funcional do indivíduo, agindo como fatores moduladores do fenótipo (MANDY; LAI, 2016).

Complicações de parto como hipóxia, sofrimento fetal, aspiração de mecônio, icterícia e ocorrência de lesões e traumas tem sido associadas com maior incidência de TEA (TORDJMAN et al, 2014), podendo se constituir gatilhos ambientais para o desenvolvimento da doença. Além das complicações de parto, o tipo de amamentação, tempo de amamentação exclusiva e tempo total de amamentação também têm sido descritos como fatores capazes de alterar o risco para TEA (SHAFAI et al, 2014; RAVI et al, 2016)

Entretanto, essas associações são preliminares e os estudos apresentam limitações metodológicas, de maneira que a influência ambiental no desenvolvimento do TEA permanece em grande parte desconhecida (ORNOY; WEINSTEIN-FUDIM; ERGAZ, 2016).

Em relação à neurobiologia do transtorno, os mecanismos do desenvolvimento anormal do cérebro não são bem compreendidos, porém, estudos de necropsia, exames de imagem e estudos com modelos animais têm fornecido informações importantes sobre as alterações relacionadas ao TEA (JOHNSON; BLUE, 2009).

Alterações anatômicas incluem aumento de peso e volume cerebral atribuído ao aumento da substância branca, principalmente a coroa radiada e as fibras U, redução do corpo caloso, aumento do cerebelo e núcleo caudado, alterações variáveis no volume da amígdala e do hipocampo, alterações dos tratos de substância branca em diversas regiões relacionadas à cognição, como o giro fusiforme, giro temporal superior, córtex pré-frontal ventromedial, cíngulo anterior e junção temporoparietal (GOH; PETERSON, 2011) e redução das células de Purkinje cerebelares, o que pode estar associado com as anormalidades da atenção e dos processos sensoriais (SADOCK; SADOCK, 2007).

As características comportamentais dos portadores de TEA sugerem a existência de alterações no desenvolvimento dos neurônios e transtornos das sinapses, como desordenamento no circuito das áreas neocorticais e límbicas específicas do córtex cerebral, o que poderia

explicar os prejuízos nos domínios da interação social e da linguagem, e problemas nas conexões do tronco cerebral, do cerebelo, do tálamo e dos gânglios da base, que poderiam explicar as anormalidades motoras, os comportamentos estereotipados e as alterações na reatividade aos estímulos sensoriais (JOHNSON; BLUE, 2009).

Embora as vias pelas quais essas desordens neuronais e sinápticas ocorrem não estejam esclarecidas, achados em exames de neuroimagem como a tomografia por emissão de pósitrons, a tomografia computadorizada por emissão de fóton único e a espectroscopia por ressonância magnética têm demonstrado anormalidades como níveis mais baixos de N-acetilaspártato neuronal, alterações no metabolismo de colina e de creatinina, perfusão cerebral reduzida, anormalidades da síntese de serotonina e padrões atípicos de ativação cerebral durante tarefas de processamento da face, linguagem e compreensão emocional em portadores de TEA (GOH; PETERSON, 2011).

Evidências sugerem que possa existir ainda um componente imunológico na patogenia do transtorno (SADOCK; SADOCK, 2007). Disfunções imunológicas ligadas a regulação de linfócitos e citocinas e presença de anticorpos antineuronais na circulação sistêmica são frequentemente observados em portadores de TEA (MELTZER; WATER, 2016).

Mustafa e Al-Ayadhi (2012) avaliaram a presença de anticorpos antineuronais no plasma de crianças portadoras de TEA e relataram maior percentual de positividade em indivíduos com autismo severo e em crianças do sexo feminino. Esses resultados podem ajudar a esclarecer a maior prevalência de atraso cognitivo severo associado ao transtorno em meninas (SADOCK; SADOCK, 2007). Goines et al (2016) encontraram resultados semelhantes em um estudo com 277 crianças portadoras de TEA. Os autores relataram correlação significativa entre a presença de anticorpos plasmáticos reativos à proteínas neuronais com pior desempenho adaptativo e comportamentos aberrantes mais pronunciados.

A despeito dessa gama de alterações, nenhum biomarcador foi identificado até o momento, de maneira que o diagnóstico do TEA é clínico, com base nas alterações comportamentais (KLIN, 2006) relacionadas à prejuízos na interação social, linguagem e comunicação (DUARTE et al, 2016).

O curso do transtorno é marcadamente heterogêneo, podendo ocorrer melhoras na sintomatologia na adolescência, de forma que cerca de 15% dos indivíduos diagnosticados na infância não satisfazem os critérios para TEA na idade adulta, entretanto, no geral é um transtorno debilitante, em que a maioria dos portadores não é capaz de exercer atividades profissionais e cotidianas de maneira independente (GOH; PETERSON, 2011).

Em relação ao tratamento, não há cura. Intervenções psicológicas e educacionais precoces constituem a base do tratamento, que tem por objetivo intensificar comportamentos socialmente apropriados, reduzir comportamentos indesejáveis e facilitar o desenvolvimento cognitivo, social e afetivo. O tratamento farmacológico é utilizado em alguns casos como adjuvante das estratégias psicopedagógicas. Medicação antipsicótica têm se mostrado eficaz em casos de agressividade severa e automutilação, inibidores seletivos e não seletivos de serotonina são utilizados para auxiliar a redução de comportamentos perturbadores e o ácido valpróico vem sendo utilizado para redução da agressividade (GOH; PETERSON, 2011).

2.2 MODELOS ANIMAIS DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

A complexidade do TEA, a grande variação no fenótipo de apresentação e a frequente associação à comorbidades constituem barreiras que dificultam sobremaneira a pesquisa do distúrbio, o que levou a necessidade do desenvolvimento de modelos animais (SCHLIKMANN; FORTUNATO, 2013). Esses modelos experimentais permitem a investigação de diversos fatores de risco, tanto ambientais quanto genéticos, bem como a pesquisa de vias moleculares e mecanismos neurofisiológicos envolvidos no transtorno, sendo a compreensão desses aspectos essencial para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e de terapias eficazes (KIM et al, 2016).

A exposição gestacional ao ácido valpróico (RODIER et al, 1996) é um dos modelos animais mais antigos e mais utilizados para o estudo do autismo, sendo capaz de mimetizar as principais características do transtorno, como redução da sociabilidade, prejuízos na comunicação e apresentação de comportamentos estereotipados e repetitivos, além de aumento da ansiedade e na intensidade e duração das memórias relacionadas ao medo (CHOMIAK; TURNER; HU, 2013).

Em 2007 foi desenvolvido o primeiro modelo genético para o estudo do TEA (TABUSHI et al, 2007). Esse modelo, baseado em uma mutação no gene NLGN3, é capaz de provocar redução da sociabilidade em camundongos. A partir daí surgiram diversos outros modelos genéticos para o estudo do transtorno, um exemplo desse tipo de modelo é o desenvolvimento de camundongos BTBR, que apresentam redução do comportamento social e aumento de comportamentos repetitivos (CHADMAN, 2017). Outros modelos genéticos incluem a utilização de animais *knockout* para uma variedade de genes (YENKOYAN et al, 2017).

Embora os modelos animais sejam capazes de reproduzir os comportamentos mais relevantes relacionados ao TEA, dada a etiologia multifatorial e a grande variação fenotípica do transtorno, nenhum modelo animal é capaz de reproduzir todos os aspectos moleculares, celulares e comportamentais. Assim, se torna importante o desenvolvimento de modelos experimentais variados, bem como as investigações paralelas em diversos níveis, como genético, neurobiológico e comportamental (SERVADIO; VANDERSCHUREN; TREZZA, 2015).

Nesse contexto, as evidências da participação do sistema imunológico nos transtornos do neurodesenvolvimento levaram ao desenvolvimento dos modelos de ativação imune materna (AIM), nos quais animais gestantes são expostas a um agente imunoestimulador em um período gestacional específico (ESTES; MCALLISTER, 2017). Uma grande diversidade de agentes têm sido utilizada nesse modelo, incluindo vírus como influenza e citomegalovírus (YENKOYAN et al, 2017), porém, os dois imunoestimuladores mais utilizados são o ácido poliinosínico:policitidílico (PolyI:C), que mimetiza uma infecção viral, e o LPS, que mimetiza uma infecção bacteriana (ESTES; MCALLISTER, 2017).

O modelo de autismo induzido pela exposição gestacional precoce ao lipopolissacarídeo (LPS) é um modelo novo, capaz de mimetizar as deficiências comportamentais básicas do TEA como prejuízos na interação social, comunicação e cognição, além da presença de comportamentos repetitivos e restritos (KIRSTEN, 2012).

2.2.1 Modelos animais de ativação do sistema imune materno

A inflamação não está relacionada somente com a resposta do organismo a agressões, mas também a estados fisiológicos normais, como a gestação (PALM et al, 2013; PETERSON et al, 2008). Na gestação, o sistema imune sofre adaptações para ser capaz de proteger o organismo materno e fetal, ao mesmo tempo em que tolera a presença do feto (PRINS et al, 2018; KUMPEL; MANOUSSAKA, 2012; SVENSSON et al, 2011). Assim, ao contrário da antiga concepção de se tratar de um estado de imunossupressão, na gestação o sistema imunológico está ativo, funcional e cuidadosamente regulado (MOR et al, 2011).

O sistema imune exerce um controle significativo dos eventos da gestação. Para que ocorra a implantação do embrião no endométrio uterino, é necessária a ação integrada de diversas citocinas secretadas pelo endométrio e pelo embrião, entre elas a IL-6, IL-11, IL-1, IL-18 e TNF α , que exercem uma ação finamente regulada e equilibrada para obter o sucesso da

implantação. Caso ocorra um rompimento desse controle, a gestação pode ser prejudicada (MOURIK; MACKLON; HEIJNEN, 2009).

O trofoblasto, um dos primeiros anexos embrionários, com funções na implantação do embrião e na constituição da parte embrionária da placenta (MOORE; PERSAUD, 2008), também exerce um papel imunológico. A presença do trofoblasto é capaz de induzir a diferenciação de monócitos em macrófagos CD14+/CD16+, com maior capacidade de fagocitose, bem como alta capacidade de secreção de citocinas (ALDO et al, 2014).

O próprio endométrio uterino, que na gestação é chamado de decídua (MOORE; PERSAUD, 2008) desempenha funções imunológicas. A decídua apresenta uma população única de células imunes, que inclui *uterine Natural Killer* (uNK), cuja atividade é crítica para o desenvolvimento e manutenção da placenta, e macrófagos, relacionados com a renovação celular e o reparo dos tecidos (RACICOT et al, 2014).

No geral, tanto as células *Natural Killer* quanto macrófagos são altamente citotóxicas quanto ativadas nos tecidos e na circulação, porém, durante a gestação essas células assumem um perfil pró-gestacional, uma alteração relacionada a fatores modulatórios secretados pela decídua, como a IL-10, e uma falha nesse processo regulatório pode levar a prejuízos na gestação (RACICOT et al, 2014). Um adequado balanço de células T regulatórias constituem outro fator modulatório crítico para a adaptação do sistema imunológico materno e manutenção da gestação (ROCCA et al, 2014; NG et al, 2002).

A placenta é considerada um órgão regulatório do sistema imunológico, sendo capaz de influenciar o sistema imune materno, contribuindo com as alterações imunológicas que permitem a manutenção da gestação. Além de funcionar como um escudo que evita a ativação do sistema imune materno contra o feto, pela ausência do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (BURTON; JAUNIAUX, 2015), a placenta também desempenha um papel ativo na regulação, diferenciação e função das células imunes maternas, criando um perfil imunológico pró-gestacional (RACICOT et al, 2014).

O sistema imune desempenha também um papel fundamental na finalização da gestação. O período final a gestação é marcado pelo aumento da sensibilidade imunológica da decídua, levando a um evento pró-inflamatório que termina por desencadear o parto (NORWITZ, 2015).

Com relação ao neurodesenvolvimento, o sistema imunológico exerce um papel crítico. A ação de citocinas têm particular importância para o desenvolvimento normal do cérebro fetal (RATNAYAKE et al, 2013). As citocinas são responsáveis pela indução do neuroepitélio, pela regulação da auto-renovação das células da glia; exercem funções quimioatrativas, regulando a

migração de neurônios e modulando a localização de trajetos de axônios, além de ter papel na modulação da vascularização, na sobrevivência neuronal e na formação e função das sinapses (DEVERMAN; PETERSON, 2009).

É notável, portanto, que uma atividade coordenada e regulada do sistema imunológico, da implantação do embrião ao parto, é essencial para a manutenção da gestação e para o desenvolvimento normal do feto. Isso indica que no período gestacional, existe uma estrutura imunológica complexa e ativa, suscetível a fatores capazes de romper o delicado equilíbrio estabelecido, de maneira que uma desorganização na produção de citocinas pode levar a falha na implantação, perda da gestação e/ou complicações obstétricas (KWARAK-KIM; GILMAN-SACKS; KIM, 2005).

Os modelos animais baseados na ativação do sistema imunológico materno se baseiam, portanto, na premissa de que a presença de um imunoestimulador, como o LPS, é capaz de romper o balanço de citocinas na gestação e afetar o neurodesenvolvimento da prole (PRINS et al, 2018).

Diversos estudos têm demonstrado alterações provocadas pela infecção no período gestacional. Zavan et al (2015) avaliaram as alterações no controle imunológico uterino provocadas pela administração de LPS em camundongos gestantes e encontraram redução no número de células uNK na decídua, com potenciais implicações no papel protetivo e regulador que essas células desempenham.

Ning et al (2008), estudaram os níveis de TNF α na circulação materna, líquido amniótico e cérebro fetal, após a administração de LPS em camundongos gestantes no 17º dia de gestação, e relataram aumento significativo. Os autores verificaram também a expressão fetal de TNF α e não encontraram alterações, indicando que citocinas produzidas pelo organismo materno são capazes de alcançar o cérebro fetal.

Simões et al (2018), analisaram as alterações relacionadas a administração de LPS em ratas no 15º dia de gestação e relataram aumento da permeabilidade da barreira placentária e da barreira hematoencefálica e aumento de citocinas pró-inflamatórias no cérebro fetal. Os autores concluíram que a ativação do sistema imune materno altera o ambiente fetal com possíveis prejuízos no neurodesenvolvimento.

O'Loughlin et al (2017) encontraram resultados semelhantes. Os autores administraram LPS em ratas no 12º dia de gestação e encontraram elevação de citocinas no cérebro fetal, astrogliose e ativação da micróglia. Além disso, os autores analisaram o cérebro da prole adolescente e relataram alterações na amígdala, uma área cerebral relacionada a expressão das emoções e ao aprendizado emocional.

A associação entre essas alterações imunológicas provocadas pela ativação do sistema imunológico materno e distúrbios do neurodesenvolvimento começou a ser percebida a partir de estudos epidemiológicos que indicaram aumento na prevalência de TEA e esquizofrenia após epidemias de rubéola (SOLEK et al, 2018).

A partir desses achados epidemiológicos, foram desenvolvidos os modelos animais de ativação do sistema imunológico materno, e atualmente, a relação entre o risco para distúrbios do neurodesenvolvimento e infecção gestacional está bem estabelecida na literatura (HOWERTON; BALE, 2012; BALE et al, 2010; FATEMI et al, 2008; BUKA et al, 2001; BROWN et al, 2000).

Assim, a infecção no período pré-natal tem sido utilizada como modelo animal para o estudo de neurodesordens como a esquizofrenia desde a década de 80 (MEYER et al, 2005). Esse modelo animal também tem contribuído no estudo da doença de Parkinson (CARVEY et al, 2003), de desordens neuropsíquicas como depressão e ansiedade (DEPINO, 2015; LIN; WANG, 2014; ENAYATI et al, 2012; ASIAEI; SOLATI; SALARI, 2011; MARKHAM; KOENING, 2011), além do TEA, epilepsia e paralisia cerebral (STOLP, 2013).

2.2.2 Modelo animal de autismo por exposição gestacional ao LPS

A superfície externa de muitos microorganismos é composta de moléculas que não ocorrem nos organismos pluricelulares hospedeiros, o que provoca, quando em contato com os hospedeiros, uma forte resposta imunoestimuladora (ALBERTS, 2004). Uma dessas moléculas é o LPS, encontrado no folheto externo da parede celular de bactérias gram-negativas, sendo um constituinte fundamental para a função de diversas proteínas da parede bacteriana (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

O LPS é uma endotoxina constituída por um cerne polissacarídeo, uma cadeia polissacarídica lateral chamada Antígeno O e uma região lipídica bifosforilada denominada Lipídeo A. O Lipídeo A é o responsável pela sua atividade imunoestimuladora (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010). Quando em contato com o organismo animal, essa endotoxina é reconhecida pelo organismo através de proteínas como a LBP (do inglês *lipopolysaccharide binding protein*) ou proteína ligadora de LPS, a proteína CD14 que pode se encontrar livre na circulação (sCD14) ou ancorada à membrana celular (mCD14) e a Proteína Mielóide Diferenciadora 2 (MD-2), também encontrada na forma livre ou ancorada à membrana. Tanto o LBP quanto o CD14 e o MD-2 agem como proteínas auxiliares, transferindo

o LPS para receptores localizados na membrana celular denominados *Toll-like 4* (TRL4) (CRUZ-MACHADO, 2010).

A ativação dos receptores TRL4 é capaz de desencadear diversas vias de sinalização que promovem a transcrição de genes promotores de citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , relacionadas a reação inflamatória aguda. A produção dessas moléculas causada pela exposição ao LPS desencadeia uma variada sinalização para células do sistema imunológico, levando a uma resposta imunológica sistêmica e generalizada (NIJLAND; HOFLAND; STRIJP, 2014).

Embora o LPS não seja capaz de atravessar a barreira hematoencefálica em quantidades significativas, a produção das citocinas inflamatórias pelas células imunes periféricas funciona como um sinal para macrófagos e micróglia iniciarem a secreção das mesmas citocinas no SNC (SAH et al, 2011). Além disso, as citocinas periféricas podem atuar no SNC por outras vias, como através da estimulação do nervo vago e da atuação direta em áreas cerebrais desprovidas de barreira hematoencefálica (MARQUES; CIZZA; STERNBERG, 2007). A neuroinflamação provocada pela presença de citocinas no SNC provoca alterações na neurotransmissão, levando a um padrão de comportamento denominado *sickness behavior* ou comportamento doentio, caracterizado por sintomas não específicos como prolongamento do sono, febre, redução da ingestão de água e alimentos, redução da mobilidade, ansiedade e depressão (SAH et al, 2011).

Além disso, existe uma complexa integração entre os sistemas nervoso, imune e endócrino na resposta ao estresse, de maneira que a ativação do sistema imunológico acarreta alterações endócrinas importantes, especialmente no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), assim como respostas do Sistema Nervoso Autônomo (DIMIANI; SOUSA; DAMIANI, 2006).

Em animais gestantes, o LPS não é capaz de atravessar a barreira placentária e chegar ao feto, entretanto, a ativação do sistema imune materno provoca a produção placentária de citocinas inflamatórias. Tanto as citocinas produzidas pela placenta quanto as citocinas presentes na corrente sanguínea materna são capazes de chegar ao feto em desenvolvimento (ASHDOWN et al, 2006). Além da ação das citocinas, as alterações hormonais maternas, em especial no eixo HHA, também podem provocar alterações no desenvolvimento fetal (HOWERTON; BALE, 2012). Dessa maneira, o LPS, embora não seja capaz de alterar diretamente o desenvolvimento intra-uterino, pode provocar alterações fetais mediadas pelas respostas neuro-imune-endócrinas do organismo materno.

Em 2010, um estudo de Kirsten e colaboradores mostrou que a exposição gestacional ao LPS é capaz de reduzir o comportamento social na infância e na vida adulta em ratos. Sendo a alteração no domínio da interação social a característica essencial e definidora do TEA (GOH;

PETERSON, 2011), este estudo abriu a possibilidade do uso da ativação do sistema imune materno pela administração de LPS como um modelo animal para o estudo do autismo.

De acordo com a 5ª edição do manual de diagnóstico e estatística dos transtornos mentais (DSM-5) da Associação Americana de Psiquiatria (APA, 2014), o diagnóstico do TEA deve ser feito segundo três critérios: presença de déficits na comunicação e na sociabilidade (critério A), presença de padrões de comportamento restritos e repetitivos (critério B) e presença dos sintomas desde a infância (critério C).

O trabalho de Servadio, Vanderschuren e Trezza (2015) teve por objetivo relacionar os testes comportamentais capazes de detectar alterações no comportamento de animais, de maneira a satisfazer esses critérios e validar um modelo animal de TEA. Segundo os autores, o critério A pode ser avaliado com base no teste de vocalização ultrassônica e no teste do comportamento social de brincar (*play behavior*) e o critério B pode ser avaliado a partir de testes em que o animal é colocado em uma arena e a frequência de um comportamento repetitivo é mensurada. Já o critério C é satisfeito se os testes forem realizados ainda na infância.

Considerando esses critérios, a partir do trabalho pioneiro de Kirsten (2010), outros estudos têm utilizado testes comportamentais para analisar a validade do modelo animal.

Com relação ao domínio da comunicação, Kirsten (2012) avaliou a prole masculina de ratos submetidos ao LPS no período pré-natal e relatou redução no número de vocalizações no 11º dia de vida. Baharnoori, Bhardwaj e Srivastava (2010) também avaliaram a comunicação da prole exposta ao LPS gestacional e relataram redução no número de vocalizações até o 6º DPN.

Penteado et al (2014) analisaram a prole masculina submetida ao LPS pré-natal e encontraram redução da preferência pelo odor do ninho na infância, indicando prejuízos na motivação social desses animais. Vieira (2017) também analisou animais submetidos ao LPS durante a gestação e relatou os mesmos resultados.

Kirsten et al (2015) relataram prejuízos na sociabilidade de animais expostos ao LPS no período gestacional, tanto na infância, com redução dos comportamentos sociais no teste do comportamento de brincar, como na idade adulta, com redução dos comportamentos sociais no teste de interação social. Esses resultados, em conjunto com prejuízos na motivação social, demonstram as alterações no domínio da sociabilidade.

Zager, Menecier e Palermo-Neto (2012) avaliaram a presença de comportamentos repetitivos em animais expostos ao LPS durante a gestação a partir da avaliação do tempo despendido no comportamento de *self grooming* e relataram aumento significativo. Kirsten e Bernardi (2017) encontraram resultados semelhantes, com aumento no tempo e frequência

desse comportamento. Esses resultados demonstram que a exposição pré-natal ao LPS foi capaz de provocar prejuízos no domínio da flexibilidade comportamental.

Em conjunto, esses resultados indicam que o modelo de indução ao TEA por exposição gestacional ao LPS é capaz de mimetizar as principais alterações comportamentais do TEA em humanos, bem como satisfazer os critérios de diagnóstico propostos pelo DSM-5.

2.3 FATORES AMBIENTAIS PÓS-NATAIS NA MODULAÇÃO DO FENÓTIPO DO TEA

Evidências sugerem que as características do ambiente pós-natal, em especial características socioambientais, podem mediar a relação entre a susceptibilidade genética para o TEA presente ao nascimento e o desenvolvimento do fenótipo do transtorno, bem como modular a severidade do fenótipo apresentado (MANDY; LAI, 2016), uma vez que os fatores ambientais na primeira infância desempenham um papel significativo no desenvolvimento cerebral (SHAFAI et al, 2014).

O fato de 15 a 25% dos indivíduos diagnosticados com TEA na infância apresentarem melhora na sintomatologia e não satisfazerem os critérios para o transtorno na vida adulta (GOH; PETERSON, 2011) sugere uma significativa capacidade de fatores ambientais em modular o fenótipo do transtorno.

Na última década, os mecanismos pelos quais a susceptibilidade genética se relaciona com o ambiente social tem sido alvo de investigações. Estudos retrospectivos (CHAWARSKA; MACARI; SHIC, 2013; JONES; KLIN, 2013; ELSABBAGH et al, 2012) tem suportado a existência de um pódro ou conjunto de sinais anunciadores, apresentado nos primeiros meses de vida, que inclui redução do contato visual e redução da atenção para os olhos, redução da atenção para cenas sociais, desengajamento e comportamento infantil atípico, e se constitui um marcador precoce do desenvolvimento do TEA (GREEN et al, 2015).

Esse pódro se traduz em tendência reduzida para procurar, responder e evocar experiência social, de maneira que a própria criança acaba por evocar menor interação social ou evocar interações atípicas com seus cuidadores, o que pode influenciar o desenvolvimento do fenótipo completo do TEA (MANDY; LAI, 2016). Assim, as características das interações entre a criança e seus cuidadores podem ser um fator importante no neurodesenvolvimento de crianças que apresentam alto risco para TEA (WAN et al, 2012).

A possibilidade de o pódro apresentado por crianças com alto risco para autismo, e portanto portadoras de susceptibilidade genética, ser capaz de induzir alterações nas interações sociais foi estudada por Wan et al (2012). Os autores avaliaram as interações entre pais e

crianças com alto risco para TEA em comparação às interações familiares de crianças de baixo risco e relatam diferenças nas características globais das interações como maior diretividade ou tom de comando, menor reciprocidade e menor incentivo para a criança conduzir a interação, o que constitui um tipo de interação menos dinâmica e com menor exigência de resposta da criança.

Embora a possibilidade de esse tipo de interação ser capaz de alterar o desenvolvimento infantil não esteja esclarecida, o estudo demonstra que comportamentos associados a indivíduos de alto risco para TEA podem ser capazes de induzir alterações no ambiente social.

Investigações realizadas com modelos animais têm contribuído para o esclarecimento da relação entre neurodesenvolvimento e ambiente pós-natal. Brenes et al (2016) avaliaram os efeitos do enriquecimento ambiental sensorial em ratos através da introdução periódica de objetos novos de diferentes materiais e formatos nas gaiolas e relataram aumento na vocalização e efeitos positivos na plasticidade neuronal e na performance cognitiva.

Esses resultados corroboram com os dados obtidos por Reynolds, Urruela e Devine (2013), que avaliaram os efeitos do enriquecimento ambiental em ratos com comportamentos repetitivos induzidos por um modelo experimental de autismo e relataram redução dos comportamentos repetitivos e das estereotipias motoras.

Yang et al (2011) avaliaram o enriquecimento ambiental com base no aumento da interação social. Os autores analisaram o efeito do compartilhamento de gaiolas entre camundongos de alta performance social e camundongos portadores de déficits no domínio da interação social induzidos por um modelo experimental de autismo. De acordo com os autores, o enriquecimento social do ambiente foi capaz de reverter as deficiências na sociabilidade nos camundongos submetidos ao modelo de autismo.

Os resultados positivos obtidos nas pesquisas com modelos animais levaram à elaboração de terapias de enriquecimento ambiental para crianças portadoras de TEA. Woo et al (2015) analisaram os efeitos do enriquecimento ambiental sensorial e motor em um grupo de crianças de 3 a 5 anos portadoras de TEA em relação à crianças que recebiam tratamento padrão. Os autores relataram que após seis meses foram observados ganhos significativos na cognição, declínio de respostas sensoriais atípicas e melhora na comunicação. Além disso, após este período 21% das crianças estudadas já não atendiam mais aos critérios de diagnóstico do autismo clássico.

A partir da significativa influência das alterações ambientais positivas no fenótipo do TEA é possível supor que alterações negativas possam também exercer algum efeito modulador na severidade do transtorno. Como enriquecimento sensorial têm demonstrado efeitos positivos

na modulação do TEA, o empobrecimento de estímulos sensoriais através do isolamento pode, portanto, seguir o caminho oposto e se traduzir na exacerbação do fenótipo.

Alguns trabalhos têm demonstrado que o estresse precoce induzido pelo isolamento social é capaz de provocar alterações neuroquímicas e alterações na arquitetura neuronal que levam à uma maior susceptibilidade aos transtornos do neurodesenvolvimento (REINWALD et al, 2018; FONE; PORKESS, 2008).

Aisa et al (2007) avaliaram os efeitos da separação materna precoce em ratos e relataram que os animais separados das mães durante 180 minutos diários, do 2º ao 21º dia de vida apresentaram comportamento semelhante a depressão, prejuízos cognitivos e hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal frente à agentes estressores, com manutenção das alterações na vida adulta.

Vargas et al (2016) estudaram os efeitos do isolamento social por 180 minutos diários nos primeiros 14 dias de vida em ratos e encontraram resultados semelhantes, com hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em ratos submetidos ao isolamento social, apresentação de comportamentos do tipo-depressivos e alterações metabólicas como ganho de peso corporal, aumento da glicemia e aumento dos níveis de insulina.

Alguns trabalhos apresentaram evidências de que o isolamento social precoce é capaz de provocar o desenvolvimento de comportamentos associados ao TEA. Wu et al (2014) investigaram os efeitos do isolamento no comportamento de ratos adultos e relatam que o isolamento do filhote durante uma hora por dia nos nove primeiros dias de vida foi capaz de induzir comportamentos do tipo-autista na prole, com prejuízos na sociabilidade e apresentação de comportamentos repetitivos. Além disso, o isolamento também esteve associado ao desenvolvimento de comportamentos do tipo-ansioso, comportamentos do tipo-depressivo e alterações neurológicas, com prejuízos na neurogênese e desordens sinápticas no hipocampo.

Bahi et al (2016) estudaram os efeitos do isolamento por 90 minutos entre o 1º e o 11º dia de vida e também relataram o desenvolvimento de comportamentos do tipo-autista nos animais isolados, com redução da sociabilidade e aumento de comportamentos repetitivos. Tan et al (2018) analisaram ratos submetidos ao isolamento social durante 1 hora diariamente entre o 1º e o 9º DPN e encontraram os mesmos resultados.

A literatura suporta, portanto, uma relação entre o isolamento precoce e o TEA, porém, não foram encontrados estudos que tenham investigado os efeitos do isolamento em animais já susceptíveis ao desenvolvimento de comportamentos do tipo-autista. Como o transtorno têm etiologia multifatorial, com provável envolvimento de múltiplos fatores de risco (MANDY;

LAI, 2016), é necessário investigar se fatores diferentes, como a infecção gestacional e o ambiente pós-natal pobre em estímulos, podem interagir e alterar o fenótipo do transtorno.

3 JUSTIFICATIVA

Cerca de meio milhão de pessoas são portadoras de TEA no Brasil (LEAL et al, 2015), e o distúrbio ocupa o terceiro lugar entre os transtornos de desenvolvimento mais frequentes (SHMIDT, 2012). É uma condição debilitante, associada a alto grau de dependência familiar e/ou institucional durante toda a vida (GOH; PETERSON, 2011).

Do ponto de vista familiar, o transtorno implica em sofrimento psíquico, mudanças na dinâmica familiar e dificuldades de diversas ordens, pela necessidade de mobilizar tempo e recursos financeiros nas terapias, que frequentemente envolvem diversos profissionais entre educadores e profissionais da saúde (ANDRADE e TEODORO, 2012).

Em relação ao impacto público, o acolhimento do indivíduo portador de TEA e suas famílias implica no estabelecimento de uma ampla rede de apoio que envolve serviços de saúde em diversos níveis de atenção (LIMA et al, 2014). Embora não existam dados brasileiros a respeito do impacto financeiro do TEA, dados internacionais sugerem um alto custo, tanto para as famílias quanto para as instituições públicas. Um levantamento americano realizado em 2012 estima que o custo total anual para suprir as necessidades específicas de um indivíduo portador do transtorno se situa entre 40.000 a 60.000 dólares (AUTISM SPEAKS, 2012).

A compreensão do transtorno, em seus aspectos etiológicos e fisiopatológicos é indispensável para o desenvolvimento de estratégias efetivas de prevenção e manejo da susceptibilidade genética, bem como para o desenvolvimento de terapias mais eficazes na melhora da sintomatologia. Assim, os estudos que visem investigar o TEA são extremamente necessários.

Os modelos animais se constituem uma importante ferramenta para a investigação do transtorno (SCHLIKSMANN; FORTUNATO, 2013). Nenhum modelo entretanto, é capaz de mimetizar todas as características do TEA, dada a sua complexidade, heterogeneidade e multiplicidade de possíveis fatores etiológicos, de maneira que o desenvolvimento de modelos diversificados é necessário. Nesse sentido, a pesquisa do modelo animal pela exposição materna ao LPS (KIRSTEN, 2012) é de grande importância, por se tratar de um modelo novo e pouco estudado.

O estudo das alterações ambientais pós-natais negativas como o isolamento é necessário, uma vez que, ao contrário dos estudos a respeito do enriquecimento ambiental, não existem estudos que esclareçam se o empobrecimento ambiental e a redução dos estímulos sensoriais podem exercer algum efeito modulador sobre o TEA.

A maioria dos possíveis fatores etiológicos e moduladores da expressão do fenótipo do TEA como susceptibilidade genética, infecções pré-natais, exposição a defensivos agrícolas, entre outros, não são passíveis de modificação por parte das famílias e profissionais de saúde. Nesse sentido, a compreensão dos efeitos do ambiente pós-natal, em especial do ambiente social, tem um grande potencial de impacto nas terapias de controle da sintomatologia, uma vez que estão ao alcance de familiares e profissionais.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as alterações comportamentais de ratos submetidos ao modelo experimental de autismo pela exposição ao LPS durante a gestação e ao empobrecimento ambiental pós natal através do isolamento.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar as alterações nos três domínios afetados pelo TEA (comunicação, interação social e flexibilidade comportamental) em ratos submetidos ao modelo experimental de autismo pela exposição materna ao LPS durante a gestação, com desenvolvimento pós-natal em ambiente normal e em ambiente empobrecido por isolamento;
- b) Avaliar a existência de comportamento do tipo ansioso e alterações na cognição, comorbidades associadas ao TEA, em ratos submetidos ao modelo experimental de autismo pela exposição materna ao LPS durante a gestação, com desenvolvimento pós-natal em ambiente normal e em ambiente empobrecido por isolamento;
- c) Avaliar a existência de alterações no comportamento materno durante a lactação em ratas submetidas à administração de LPS durante a gestação, em contato contínuo com a prole e submetidas ao isolamento da prole;
- d) Avaliar alterações na resposta ao estresse e no eixo HHA em ratos submetidos ao modelo experimental de autismo pela exposição materna ao LPS durante a gestação, com desenvolvimento pós-natal em ambiente normal e em ambiente empobrecido por isolamento.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 40 ratas Wistar, pesando cerca de 200 gramas e 20 ratos Wistar com idade de 8 semanas, os quais foram alojados em gaiolas e mantidos em condições padrões de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), temperatura de $\pm 22,1^{\circ}\text{C}$, umidade de 65%, com livre acesso à ração e água.

Os animais foram colocados em gaiolas para acasalamento (2 fêmeas para 1 macho em cada gaiola) até a detecção de espermatozoides no esfregaço vaginal, sendo considerado o dia da detecção como o dia zero da gestação (DG 0). Após o acasalamento, as fêmeas foram acondicionadas em gaiolas e mantidas em condições padrões de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), temperatura de $\pm 22,1^{\circ}\text{C}$, umidade de 65%, com livre acesso à ração e água.

Cerca de 24 horas após o parto as ninhadas foram padronizadas em oito filhotes, quatro machos e quatro fêmeas. Foram obtidos um total de 320 filhotes, 160 fêmeas e 160 machos. A prole foi desmamada aos 21 dias de vida e os animais acondicionados em gaiolas, com um limite de 4 animais por gaiola, separados por sexo, nas mesmas condições de iluminação, temperatura, umidade e acesso à ração e água, onde foram mantidos até a idade adulta.

Todos os procedimentos envolvendo animais estavam de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) (aprovados com Protocolo nº 56/2016) e com a diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais pra fins científicos e didáticos (MINISTÉRIO, 2013). Enfatiza-se que todo o esforço foi feito para minimizar o sofrimento animal, e o delineamento experimental foi realizado considerando a utilização de um número mínimo de animais necessário para obtenção de dados científicos fidedignos.

5.2 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Neste trabalho foram utilizados lipopolissacarídeo (LPS) e solução aquosa de cloreto de sódio estéril a 0,9%. O LPS foi obtido a partir de *Escherichia coli*, sorotipo 026:B6, marca Sigma-Aldrich. Foi previamente dissolvido em solução aquosa de NaCl estéril a 0,9% e estocado em alíquotas de 10 mg/ml. A diluição para a administração intraperitoneal nas ratas gestantes foi feita imediatamente antes da administração, também em solução aquosa de NaCl estéril a 0,9%.

5. 3 MODELO EXPERIMENTAL DE AUTISMO

A indução ao modelo experimental de autismo foi realizada pela administração intraperitoneal de LPS na concentração de 500µg/kg de peso, diluído em solução aquosa de NaCl estéril a 0,9% (50µg de LPS por ml de solução salina) no décimo sexto dia de gestação.

Foi utilizado o 16º DG porque esse período da gestação em ratos é correspondente ao segundo trimestre de gestação em humanos e a ativação do sistema imune materno nesse ponto da gestação está relacionada ao desenvolvimento de anormalidades cerebrais e comportamentais (GHIANI, 2011). A dose utilizada foi definida com base em um estudo prévio realizado neste laboratório, que identificou que a dose de 500µg/kg foi capaz de induzir o comportamento doentio nas ratas gestantes (VIEIRA, 2017).

Os animais do grupo controle receberam volume equivalente de solução aquosa de NaCl estéril a 0,9%, também por via intraperitoneal, no décimo sexto dia de gestação.

5. 4 EMPOBRECIMENTO AMBIENTAL POR ISOLAMENTO

A partir do segundo dia após o nascimento, os animais foram retirados da caixa-moradia da ninhada e gentilmente colocados em uma incubadora de isolamento, dotada de 64 espaços individuais de 10 x 10 centímetros, onde foram mantidos em condições padrões de iluminação, temperatura de 30°C mantida por um termostato e umidade de 65%. Esse procedimento foi realizado diariamente, com duração de 3 horas (9:00h – 12:00h), durante 14 dias (entre os dias de vida 2 e 16).

Fotografia 1 – Incubadora com nichos individualizados utilizada para o isolamento dos animais.



Fonte: Da autora.

5.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As fêmeas gestantes foram separadas em dois grupos:

- a) Grupo Salina, composto por 20 animais, que receberam solução salina no décimo sexto dia da gestação.

A prole deste grupo, padronizada em 8 animais, 4 machos e 4 fêmeas, foi dividida em dois grupos:

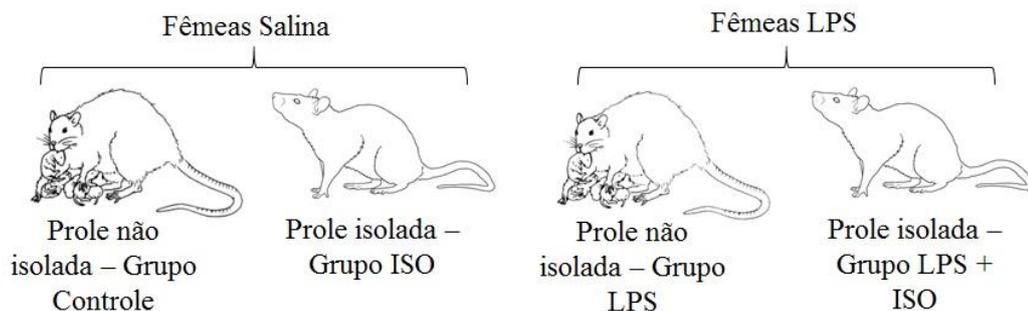
- Grupo Controle, composto por 80 animais, 40 machos e 40 fêmeas.
- Grupo ISO, composto por 80 animais, 40 machos e 40 fêmeas, que foram submetidos ao empobrecimento ambiental por isolamento.

- b) Grupo LPS, composto por 20 animais, que receberam injeção de LPS no décimo sexto dia da gestação, conforme o modelo experimental de autismo.

A prole, padronizada em 8 animais, 4 machos e 4 fêmeas, foi dividida em dois grupos:

- Grupo LPS, composto por 80 animais, 40 machos e 40 fêmeas
- Grupo LPS + ISO, composto por 80 animais, 40 machos e 40 fêmeas, que foram submetidos ao empobrecimento ambiental por isolamento.

Figura 1 – Grupos experimentais.



Fonte: Da autora.

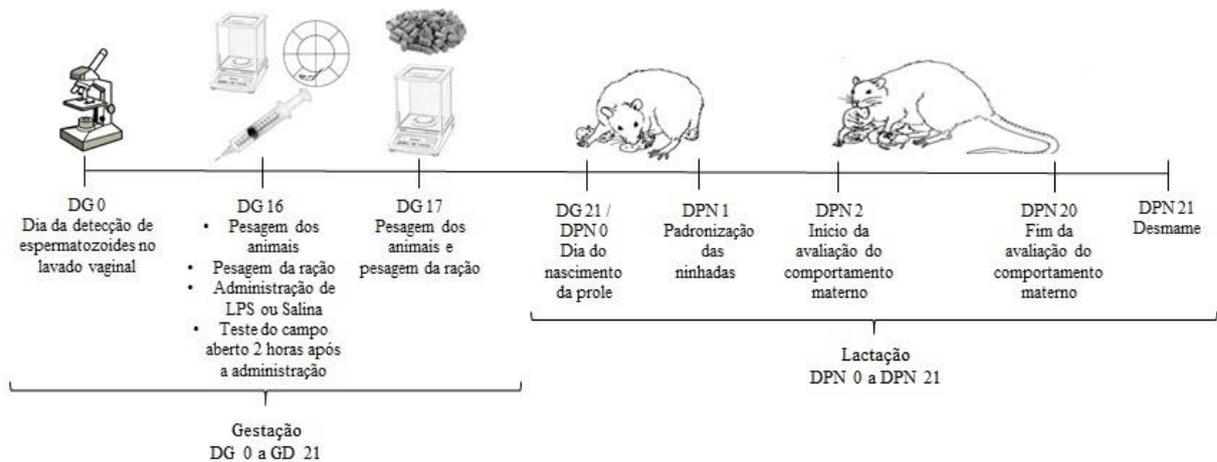
Para avaliar os efeitos gerais da administração gestacional de LPS na prole, as fêmeas do grupo LPS que perderam peso nas 24 horas subsequentes à administração de LPS foram separadas em um grupo adicional de fêmeas consideradas responsivas (LPS-R). Os animais que apresentaram ganho de peso após administração de LPS foram considerados animais hiporresponsivos (LPS-HR).

5.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais foram realizados em três etapas:

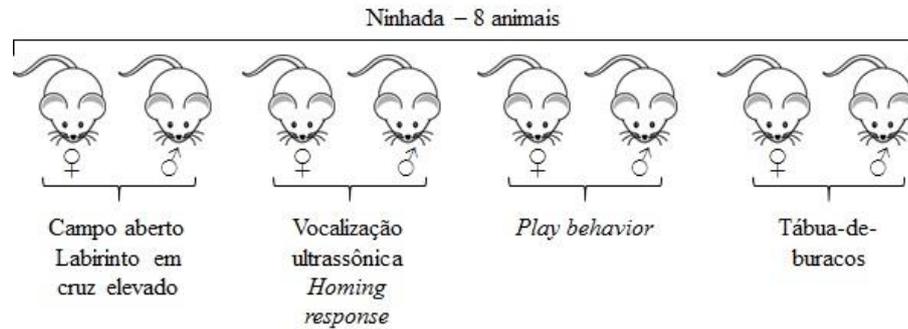
- Testes realizados com ratas adultas, gestantes ou lactantes. Os testes foram comportamento doentio materno, composto por campo aberto, avaliação da ingestão alimentar e avaliação da alteração do peso corporal, realizado com as ratas prenhes; e avaliação do comportamento materno, realizado com as ratas lactantes entre os dias de lactação 2 e 20;
- Testes realizados com filhotes, entre os dias de vida 13 e 32. Os testes foram vocalização, *homing response*, campo aberto, labirinto em cruz elevado, vocalização ultrassônica, tábua de buracos e *play behaviour*;
- Testes realizados com animais adultos, entre os dias de vida 66 e 82. Os testes foram labirinto em cruz elevado, labirinto aquático de Morris, teste de interação social e exposição ao odor de gato. Após cada teste comportamental realizado com as fêmeas adultas, foi realizado um esfregaço vaginal para a detecção da fase do ciclo reprodutivo. Além dos testes comportamentais, na etapa III foi realizada também a avaliação do peso da glândula adrenal dos animais adultos.

Figura 2 - Procedimentos e experimentos que foram realizados na Etapa I.



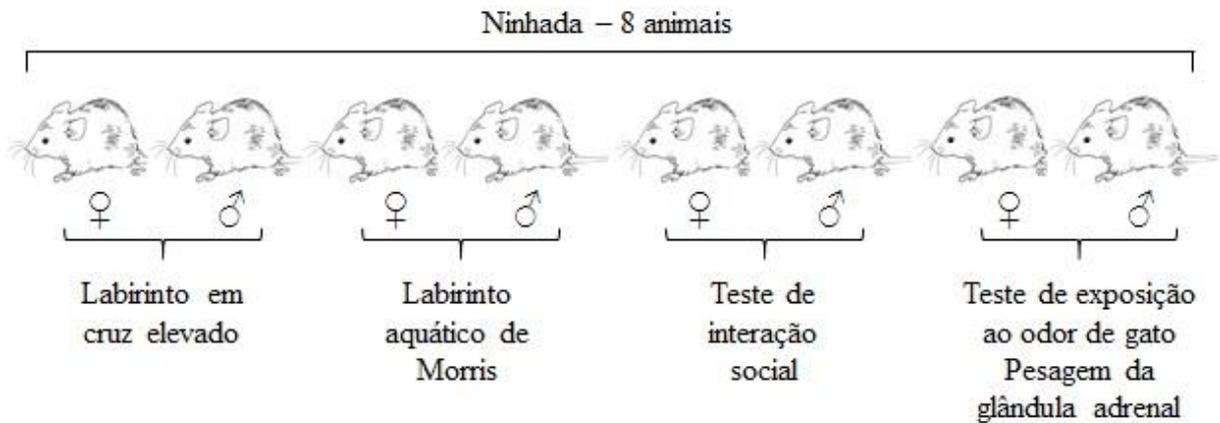
Fonte: Da autora.

Figura 3 – Experimentos que foram realizados na Etapa II.



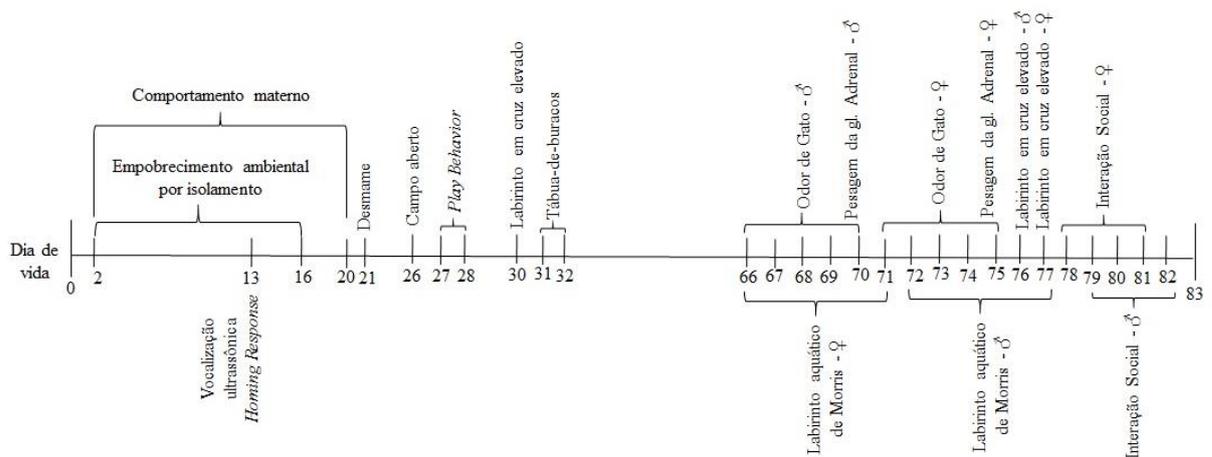
Fonte: Da autora.

Figura 4 – Experimentos que foram realizados na Etapa III.



Fonte: Da autora.

Figura 5 - Cronograma de realização dos experimentos realizados com a prole.



Fonte: Da autora.

5.6.1. Comportamento doentio materno

5.6.1.1. Avaliação da ingestão alimentar e da alteração de peso corporal

Imediatamente após a administração de LPS ou solução salina, no décimo sexto dia de gestação, foi realizada a pesagem da ração disponibilizada em cada caixa-moradia. Após 24 horas foi realizada uma nova pesagem, obtendo-se assim o consumo de ração no período. A alteração do peso corporal foi verificada pela pesagem dos animais imediatamente antes da administração de LPS ou solução salina e 24 horas depois.

A resposta inflamatória sistêmica pode levar ao comprometimento da regulação fisiológica do balanço energético, causando anorexia e perda de peso (OGIMOTO; HARRIS; WISSE, 2006). Sendo a anorexia um proeminente componente da fase aguda da resposta imunológica sistêmica ao LPS (KOPF et al, 2010), a quantidade de alimento consumido e a alteração de peso nas primeiras 24 horas após a administração de LPS são indicadores da ativação do sistema imunológico materno.

5.6.1.2 Campo aberto

A redução da atividade motora e a letargia fazem parte do padrão comportamental característico resultante da resposta imunológica aguda (MAES et al, 2012), podendo ser utilizados como um indicador da ativação do sistema imunológico materno. Este teste teve por finalidade avaliar a atividade motora voluntária dos animais.

Duas horas após a administração de LPS ou solução salina, os animais gestantes foram colocados no centro de uma arena circular de 60 centímetros de diâmetro, com paredes transparentes de 30 centímetros de altura, previamente limpa com solução água/álcool a 5%. O teste teve duração de 5 minutos, e a análise foi automatizada, realizada pelo *software* Ethovision® (Ethovision; Noldus Information Technology, Leesburg, VA, EUA), e foram avaliados os parâmetros: distância percorrida pelo animal e tempo de imobilidade (GOULD; DAO; KOVACSICS, 2009).

Fotografia 2 – Aparato para o teste do campo aberto.



Fonte: Da autora.

5.6.2 Comportamento Materno

Este teste teve por objetivo verificar se a ativação do sistema imunológico materno durante a gestação e/ou o isolamento da filhotes levam a alterações nos cuidados com a prole. A metodologia utilizada foi adaptada de Costa, Vilela e Giusti-Paiva (2013).

Os comportamentos maternos e não maternos das ratas lactantes foram registrados diariamente entre 8h e 9:30h e entre 15:30h e 17h, totalizando três horas de observação por dia. Durante cada período o registro foi feito a cada três minutos, resultando em 31 observações por período, e 62 observações diárias. O experimento foi conduzido por 19 dias, entre os dias de lactação 2 e 20.

Os comportamentos maternos avaliados foram: lambe os filhotes, se manter sobre os filhotes em posição arqueada (cifose), se manter sobre os filhotes em posição não arqueada, posição passiva com exposição das mamas, atividades de construção do ninho e *self grooming*. Os comportamentos não maternos avaliados foram: exploração do ambiente sem contato com os filhotes, ausência de contato com os filhotes sem exploração do ambiente ou dormindo e atividades de alimentação.

Foi obtida a porcentagem observada de cada comportamento em relação ao comportamento total, dividindo-se o total de cada parâmetro pelo número total de observações e multiplicando o valor resultante por 100.

5.6.3 Vocalização ultrassônica

A vocalização emitida por filhotes de ratos quando separados de suas mães indica solicitação por interação materna, bem como é um indicador de emoção e apego (SPENCE et al, 2016). Este teste teve por finalidade, portanto, detectar alterações na comunicação e na interação social. No 13º dia de vida um macho e uma fêmea de cada ninhada foram isolados individualmente por 10 minutos. Após o período de isolamento cada animal foi imediatamente colocado no aparato, composto por uma caixa dotada de microfones capaz de captar a vocalização emitida. O teste teve duração de três minutos. A limpeza do aparato antes e depois de cada teste foi realizada com solução de água/álcool a 5%.

Fotografia 3 - Estação utilizada para o teste de vocalização ultrassônica.



Fonte: Da autora.

5.6.4 *Homing response*

Este teste foi utilizado para avaliar a memória e performance social. A metodologia utilizada foi adaptada de Schneider e Przewlocki (2005), e é capaz de detectar a capacidade de reconhecimento da maravalha materna e a motivação de busca do ninho a partir de dicas sensoriais, como o olfato.

No 13º dia de vida um macho e uma fêmea de cada ninhada foram isolados individualmente durante 30 minutos. Após esse período, cada animal foi imediatamente transferido para o aparato, composto por uma caixa moradia com as dimensões 40x32 centímetros e 20cm de altura, com três quartos do piso recobertos por maravalha nova, de odor neutro e um quarto recoberto com maravalha retirada do ninho. Para isso, a maravalha foi mantida na caixa moradia em contato com a mãe e a ninhada durante 6 dias.

O animal teste foi colocado na extremidade oposta a maravalha do ninho, com a cabeça voltada para a parede da caixa. O teste teve duração total de 3 minutos, e foram avaliados os parâmetros: tempo de latência para alcançar a maravalha do ninho e número de saídas da maravalha do ninho em direção à maravalha de odor neutro.

Fotografia 4 – Caixa moradia preparada para o teste de *homing response*, contendo $\frac{3}{4}$ de maravalha limpa e $\frac{1}{4}$ de maravalha proveniente do ninho.



Fonte: Da autora.

5.6.5 Campo aberto

Este teste teve por finalidade verificar o desempenho motor dos animais e foi realizado em duas etapas. Na etapa II, o teste foi feito no 26º dia de vida, com um macho e uma fêmea de cada ninhada. Os animais foram colocados no centro de uma arena circular de 60 centímetros de diâmetro, com paredes transparentes de 30 centímetros, previamente limpa com solução de água/álcool a 5%. Na etapa III, o teste foi feito com os animais adultos, um macho e uma fêmea de cada ninhada. Os animais foram colocados no centro de uma arena quadrada de 60 x 60 centímetros, também com paredes transparentes.

O teste teve duração de 5 minutos e a análise dos resultados foi automatizada, realizada pelo *software* Ethovision®. Foram avaliados os parâmetros: distância percorrida pelo animal e tempo de imobilidade (GOULD; DAO; KOVACSICS, 2009). Foi avaliado também o número de vezes em que o animal realizou o comportamento de *self grooming*. Essa análise foi feita manualmente e teve por objetivo avaliar a flexibilidade comportamental e a existência de comportamentos do tipo ansioso nos animais, uma vez que o número de *self grooming* pode indicar a presença de comportamentos estereotipados e repetitivos, típicos do TEA

(SILVERMAN et al, 2010), bem como pode indicar ansiedade (NUNES, PEZZATO; HOSHINO, 2012).

Fotografia 5 – Aparato utilizado no teste de campo aberto da prole adulta.



Fonte: Da autora.

5.5.6 *Play Behavior*

Este teste foi utilizado para avaliar a performance social dos animais na adolescência. A metodologia utilizada foi adaptada de Terranova e Laviola (2005). Foi utilizado um aparato quadrado, de vidro transparente, de 40 centímetros de largura e 50 centímetros de altura, com piso recoberto por cerca de 2 centímetros de maravalha. No 28º dia de vida um macho e uma fêmea de cada ninhada foram isolados em caixas individuais durante três horas e trinta minutos. Após esse período, dois machos e duas fêmeas de cada grupo, provenientes de ninhadas diferentes, foram confrontados no aparato. O teste teve duração de 15 minutos e a performance social foi avaliada através da quantificação dos seguintes parâmetros: tempo de farejamento do outro animal, tempo de perseguição ao outro animal, frequência em que um animal se deita expondo o ventre para o parceiro (*pinning*), frequência em que um animal monta o parceiro, solicitando a brincadeira (*poucing*) e frequência em que o animal passa sobre ou sob o parceiro. A frequência total de comportamentos sociais foi obtida pelo somatório da frequência de *pinning*, *poucing* e passagens sobre/sob o parceiro.

No dia anterior ao teste todos os animais foram colocados individualmente no aparato durante 10 minutos para livre exploração. A ambientação no aparato teve por objetivo reduzir o comportamento exploratório da arena de maneira a não interferir no comportamento social. As caixas-moradias permaneceram na sala do teste nas 24 horas precedentes para ambientação.

Fotografia 6 – Caixa de vidro preparada para o teste do comportamento de brincar.



Fonte: Da autora.

5.6.7 Labirinto em cruz elevado

O teste teve por objetivo verificar a existência de comportamento do tipo-ansioso, e foi realizado em duas etapas: na etapa II com a prole adolescente (30º dia de vida), e na etapa III, com a prole adulta (machos no 76º dia de vida e fêmeas no 77º dia de vida). Um macho e uma fêmea de cada ninhada foram colocados em um aparato elevado a 50 centímetros do solo, dotados de dois braços abertos e dois braços fechados de 50 centímetros de extensão, unidos por uma plataforma central.

O teste teve duração de 5 minutos (WILCONSON et al, 2007), e foi avaliado o tempo de permanência nos braços abertos e o tempo de permanência nos braços fechados. Um aumento do tempo despendido nos braços fechados ou redução do tempo despendido nos braços abertos são considerados indicadores de ansiedade (DAWSON; TRICKLEBANK, 1995). A análise foi automatizada, realizada pelo *software* Ethovision® (Ethovision; Noldus Information Technology, Leesburg, VA, EUA).

Fotografia 7 – Aparato preparado para o teste do labirinto em cruz elevado.



Fonte: Da autora.

5.6.8 Tábua-de-buracos

Este teste foi utilizada para avaliar o comportamento exploratório. Foi utilizado um aparato quadrado, de vidro transparente de 40 centímetros de largura e 50 centímetros de altura, dotado de uma placa quadrada com 16 buracos de três centímetros cada posicionada 15 centímetros acima do piso da caixa. No 32º dia de vida um macho e uma fêmea de cada ninhada foram colocados individualmente no aparato durante 5 minutos. A análise foi feita a partir da quantificação do número de mergulhos nos buracos da placa (DOUKKALI et al, 2015). Foram considerados os mergulhos em que a cabeça do animal penetrou no buraco até a base das orelhas.

No dia anterior ao teste cada animal foi colocado no aparato sem a placa de buracos durante 10 minutos para a ambientação.

Fotografia 8 – Aparato preparado para o teste da tábua-de-buracos.



Fonte: Da autora.

5.6.9 Labirinto aquático de Morris

Este teste foi utilizado para avaliar a aquisição de memória e cognição espacial. A metodologia utilizada foi adaptada de Batinic et al (2016).

Foi utilizado um tanque circular, de cor azul, com as dimensões de 90 centímetros de diâmetro e 50 centímetros de altura, com uma plataforma de acrílico transparente de 35 centímetros de altura, com uma plataforma superior circular de 13 centímetros de diâmetro. O tanque foi preenchido com água até que a plataforma estivesse submersa dois centímetros abaixo da linha d'água. Para a completa invisibilização da plataforma foram utilizados 2 gramas de corante alimentício azul e 200 gramas de amido de milho, de maneira que a água adquiriu a mesma coloração do tanque. Um macho e uma fêmea adultos (a partir da 9ª semana de vida) de cada ninhada passaram por uma etapa de treinamento durante 5 dias. O treinamento consistiu em quatro ensaios diários com tempo máximo de 120 segundos cada ensaio e intervalo de 60 segundos entre um ensaio e outro. Quando o tempo máximo do ensaio foi atingido sem que o animal encontrasse a plataforma, o animal foi guiado até ela. O tempo de permanência na plataforma foi de 15 segundos. O tempo de latência despendido por cada animal para alcançar a plataforma em cada ensaio nos cinco dias da etapa de treinos foi registrado.

O teste foi conduzido 24 horas após o último treino e consistiu em um único ensaio, com duração de 60 segundos, sem a presença da plataforma no tanque. A análise foi automatizada, realizada pelo *software* Ethovision® (Ethovision; Noldus Information Technology, Leesburg, VA, EUA), e foram analisados os seguintes parâmetros: distância percorrida pelo animal,

latência para alcançar o local onde se encontrava a plataforma durante os treinos e tempo de permanência no quadrante em que estava a plataforma durante a etapa de treinamento.

Fotografia 9 – Aparato utilizado no teste do labirinto aquático de Morris.



Fonte: Da autora.

5.6.10 Exposição ao odor de gato

Este teste objetivou avaliar a resposta comportamental do animal à um estímulo aversivo. A metodologia utilizada foi adaptada de Orte (1999) e Kirsten et al (2011). Foi utilizado um aparato composto por duas caixas moradias com de 38 x 32 centímetros e 20 centímetros de altura, posicionadas uma ao lado da outra, com piso forrado por cerca de 2cm de maravalha nova de odor neutro e uma tampa de vidro transparente de 90 x 50 centímetros. Um abrigo branco opaco de isopor de 22 x 14 centímetros foi fixado em cada extremidade da tampa, de maneira que entre o abrigo e o piso da caixa permaneceu um espaço de 6 centímetros para livre movimentação do animal. No lado oposto dos abrigos, foi fixado na parede das caixas um pedaço de tecido de algodão cru (18cm x 22cm) impregnado ou não com odor de gato. Foi feita uma marcação na tampa de vidro correspondente a uma distância de 5cm do tecido, de maneira permitir a visualização e quantificação do número de vezes que o animal se aproxima do tecido e o tempo de permanência próximo ao tecido.

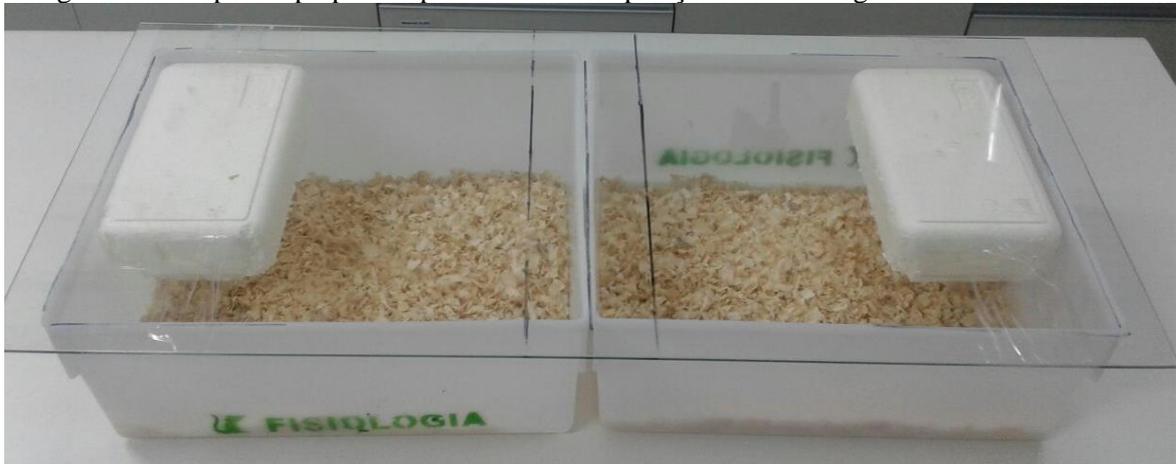
A obtenção do odor de gato foi realizada pelo esfregaço vigoroso do tecido umedecido contra os pelos de um gato doméstico adulto durante cinco minutos uma hora antes do teste. O tecido impregnado com o odor de gato foi mantido em um recipiente plástico vedado até o

momento do teste. O experimento foi realizado com um macho e uma fêmea de cada ninhada, adultos (a partir da 9ª semana de vida) e foi composto por 3 fases:

- Ambientação: cada animal foi colocado no aparato contendo de odor neutro durante 15 minutos por 3 dias consecutivos. O último dia de ambientação foi registrado em vídeo, e os resultados dos animais controle expostos ao odor neutro foram utilizados para formar o grupo Neutro.
- Estímulo olfatório aversivo: cada animal foi colocado no aparato contendo tecido impregnado com odor de gato. O teste ocorreu 24 horas após o último dia de ambientação e teve duração de 15 minutos.
- Contexto: cada animal foi colocado novamente no aparato contendo tecido de odor neutro. O teste ocorreu 24 horas após o teste do estímulo olfatório e teve duração de 15 minutos.

A análise foi feita a partir da quantificação dos seguintes parâmetros: tempo de permanência no abrigo, número de aproximações do tecido e tempo de permanência próximo ao tecido.

Fotografia 10 – Aparato preparado para o teste de exposição ao odor de gato.



Fonte: Da autora.

5.6.11 Teste de interação social

Este teste teve por objetivo avaliar a performance social dos animais adultos (1ª semana de vida). A metodologia utilizada foi adaptada de Cruz e Landeira-Fernandes (2012).

Foi utilizada uma arena quadrada de 60 x 60 centímetros, com piso recoberto por cerca de 3cm de maravalha. Um macho e uma fêmea de cada ninhada foram previamente isolados

por um período de 3 horas e trinta minutos em caixas individuais. Após o período de isolamento, dois animais de cada grupo foram colocados na arena durante 15 minutos.

Para a formação das duplas de teste, os animais foram pesados e pareados de acordo com o peso. Nos três dias precedentes ao teste cada animal foi colocado na arena durante 10 minutos para livre exploração com o objetivo de ambientá-los ao aparato para reduzir o comportamento exploratório que poderia interferir no comportamento social. A análise foi feita a partir da quantificação dos seguintes critérios: tempo de farejamento do outro animal, tempo de perseguição ao outro animal, frequência em que um animal se deita expondo o ventre para o parceiro (*pinning*), frequência em que um animal monta o parceiro (*poucing*), e frequência em que um animal passa sobre/sob o parceiro. A frequência total de comportamentos sociais foi obtida com através do somatório das frequências de *pinning*, *poucing* e passagens sobre/sob o parceiro.

Fotografia 11 – Aparato preparado para o teste de interação social.



Fonte: Da autora.

5.6.12 Avaliação do peso da glândula adrenal

Após a realização do teste de exposição ao odor de gato os animais foram sacrificados por decapitação. Imediatamente após o sacrifício a glândula adrenal esquerda de cada animal foi removida e pesada. Como a administração de LPS leva à alterações no eixo HHA de ratas prenhes (HOWERTON; BALE, 2012), essa avaliação teve por objetivo verificar se essas alterações também ocorrem na prole.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism* versão 7.0 e os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Para determinar a distribuição dos dados, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não apresentavam distribuição normal foram convertidos para LOG10.

Para comparação de duas médias foi utilizado o teste “t” de *Student*. Para a comparação de três médias com apenas a variável tratamento, foi utilizada a análise de variância ANOVA *One-way* seguida pelo pós-teste de *Turkey*. Para a comparação dos quatro grupos com duas variáveis (tratamento e isolamento), foi utilizada a análise de variância ANOVA *Two-way*, seguida pelo pós-teste de *Turkey*. Para a comparação dos quatro grupos com três variáveis (tratamento, isolamento e sexo da prole ou tratamento, isolamento e tempo), foi utilizada a análise de variância ANOVA *Three-way*, seguida pelo pós-teste de *Turkey*. Para a comparação de todos os grupos com o grupo Neutro, no teste de exposição ao odor de gato, foi utilizada a análise de variância ANOVA *One-way*, seguida pelo pós-teste de *Dunnet*. Foram considerados estatisticamente diferentes grupos analisados em que $p < 0,05$.

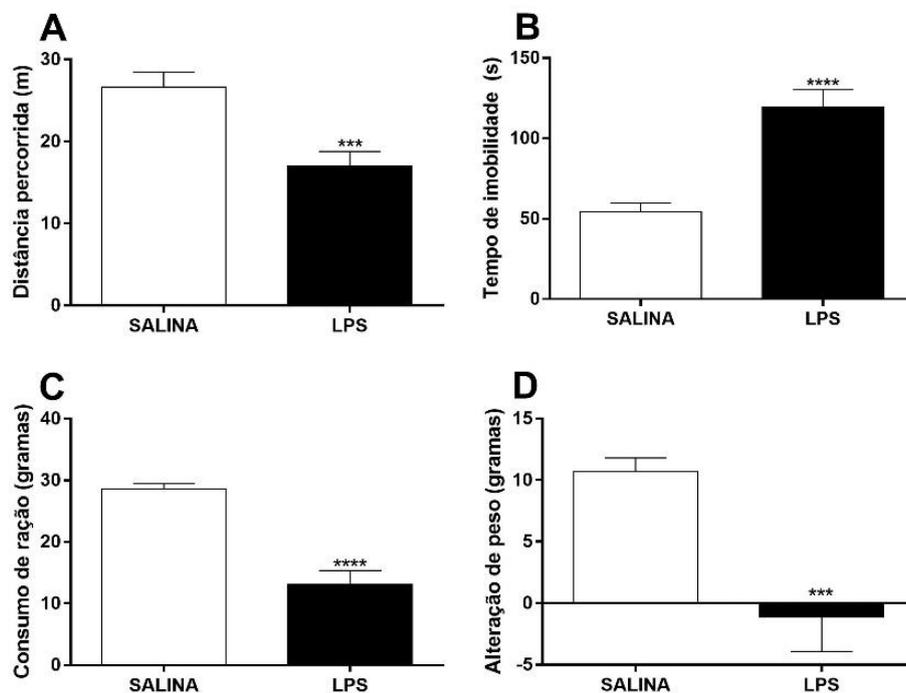
6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS DA ETAPA I – EXPERIMENTOS REALIZADOS COM FÊMEAS GESTANTES E LACTANTES.

6.1.1 Comportamento doentio materno

Os resultados do comportamento doentio materno estão apresentados na Figura 6. A administração intraperitoneal de LPS causou redução da distância percorrida ($p=0,004$) e aumento no tempo de imobilidade ($p<0,0001$) no teste do campo aberto realizado duas horas após a administração, bem como redução da ingestão alimentar ($p<0,0001$) e perda de peso ($p=0,003$) nas 24 horas subsequentes, demonstrando que o LPS foi capaz de provocar o comportamento doentio materno.

Figura 6 – Efeitos da administração intraperitoneal de LPS em ratas gestantes ($500\mu\text{g}/\text{kg}$ no 16º dia de gestação) sobre os parâmetros do comportamento doentio materno.



Nota: Efeitos da administração intraperitoneal de LPS em ratas gestantes ($500\mu\text{g}/\text{kg}$ no 16º dia de gestação) sobre os parâmetros do comportamento doentio materno. A = Distância percorrida no campo aberto 2h após a administração de LPS ou SAL; B = Tempo de imobilidade no campo aberto 2h após a administração de LPS ou SAL; C = Consumo de ração nas 24h subsequentes à administração de LPS ou SAL; D = Alteração de peso nas 24h subsequências à

administração de LPS ou SAL. **** $p < 0,0001$ e *** $p < 0,005$ comparado com o grupo controle (teste “t” de *Student*). $N = 20$ em ambos os grupos. Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

6.1.2 Variação da sensibilidade ao LPS

Todos os animais que receberam salina no 16º dia de gestação ganharam peso nas 24 horas subsequentes. Dos animais que receberam 500 μ g de LPS, 8 animais (40%) ganharam peso, 1 animal (5%) não demonstrou alteração no peso e 11 animais (55%) perderam peso.

A alteração do peso materno após um desafio imunológico é um indicador da intensidade da resposta imunológica, e portanto, da intensidade em a prole é afetada (MISSAULT et al, 2014; VORHEES et al, 2012; BRONSON et al, 2011), assim, os animais que apresentaram perda de peso foram considerados animais responsivos ao LPS (LPS-R), e os animais que ganharam peso foram considerados hipo-responsivos ao LPS (LPS-HR).

6.1.3 Comportamento Materno

Para a análise estatística dos resultados do comportamento materno foi utilizada a análise de variância de três vias (ANOVA *three-way*), seguida pelo pós-teste de *Turkey*.

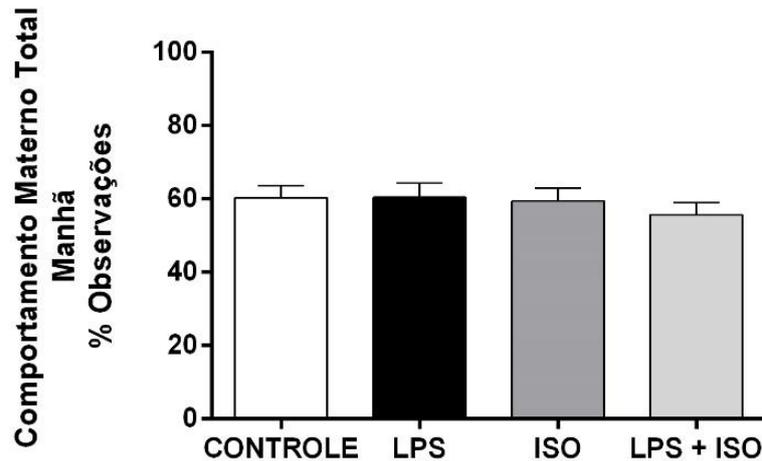
6.1.3.1 Período matutino

A Figura 7 representa o comportamento materno total observado durante o período da manhã nos 19 dias de experimento, ou seja, representa apenas os parâmetros considerados maternos: lambe os filhotes, cifose, se manter sobre os filhotes, posição passiva, atividades de construção do ninho e *self grooming*. A Figura 8 apresenta os resultados do comportamento materno total por semana de lactação. Os dados estão apresentados em forma de porcentagem em relação ao comportamento total. A análise estatística indicou efeito significativo do dia de lactação ($p < 0,0001$), e do isolamento ($p = 0,023$) no comportamento materno total, porém não foram observadas diferenças significativas entre os grupos analisados ($p > 0,05$)

A Figura 9 representa os resultados dos parâmetros individualmente, tanto maternos quanto não maternos. Foi observado efeito significativo da administração de LPS sobre os parâmetros Explorando ($p = 0,0462$) e Lambendo os filhotes ($p = 0,0079$). O isolamento foi significativo nos parâmetros Alimentando ($p = 0,0048$), Não explorando ($p = 0,0401$) e

Lambendo ($p = 0,0015$), já o dia de lactação foi significativo em todos os parâmetros ($p < 0,05$), exceto no parâmetro Sobre os filhotes ($p = 0,1215$). Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados em nenhum dos parâmetros ($p > 0,05$).

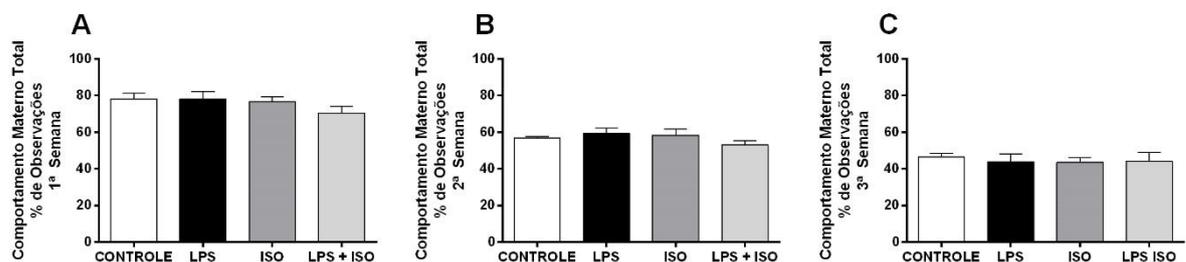
Figura 7 – Comportamento materno total no período matutino (8h – 9:30h) entre os dias de lactação 2 e 20.



Nota: Comportamento materno total no período matutino (8h – 9:30h) entre os dias de lactação 2 e 20. Sem diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$ – ANOVA *three-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). $N = 10$ em todos os grupos. Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

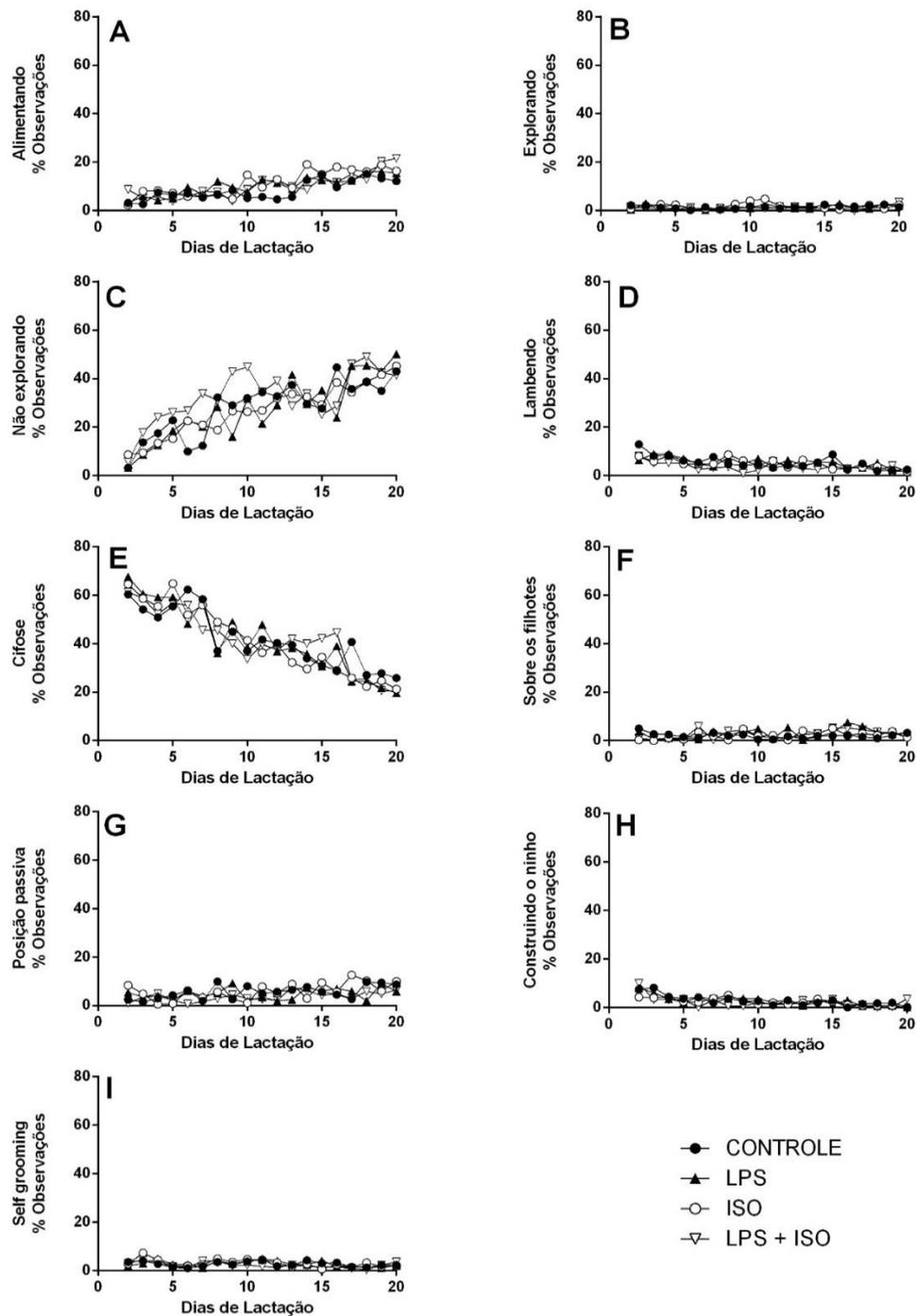
Figura 8 – Comportamento materno total semanal no período matutino (8h – 9:30h) entre os dias de lactação 2 e 20.



Nota: Comportamento materno total semanal no período matutino (8h – 9:30h) entre os dias de lactação 2 e 20. A = Primeira semana de lactação; B = Segunda semana de lactação; C = Terceira semana de lactação. Sem diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$ – ANOVA *three-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). $N = 10$ em todos os grupos. Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

Figura 9 – Avaliação dos parâmetros do comportamento materno no período matutino (8h – 9:30h) entre os dias de lactação 2 e 20.



Nota: Avaliação dos parâmetros do comportamento materno no período matutino (8h – 9:30h) entre os dias de lactação 2 e 20. Sem diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$ – ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). A = Comportamentos de alimentação; B= Exploração do ambiente; C= Longe dos filhotes sem exploração do ambiente ou dormindo; D= Lamber o filhotes; E= Cifose; F= Manter-se sobre os filhotes; G= Posição Passiva; H= Atividades de construção do ninho; I= *Self Grooming*. N = 10 em todos os grupos. Valores representados em média \pm erro padrão da média.

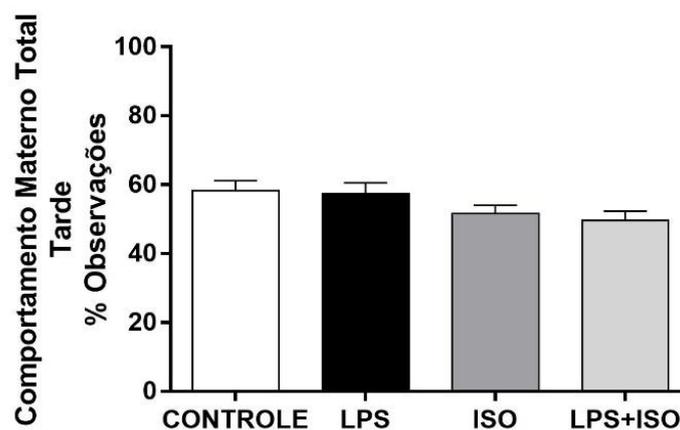
Fonte: Da autora.

6.1.3.2 Período Vespertino

A Figura 10 representa o comportamento materno total observado no período da tarde nos 19 dias de experimento (apenas os parâmetros considerados maternos). A Figura 11 apresenta os resultados do comportamento materno total por semana de lactação. Os dados estão apresentados em forma de porcentagem em relação ao comportamento total. Foi observado efeito significativo do dia de lactação e do isolamento sobre o comportamento materno total ($p < 0,0001$), porém, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados ($p > 0,05$).

Foi realizada também a análise de cada parâmetro individualmente, tanto os parâmetros considerados maternos como não maternos, representada na Figura 12. O isolamento demonstrou efeito significativo sobre os parâmetros Explorando, Não explorando e Lambendo ($p < 0,0001$). O dia de lactação foi significativo em todos os parâmetros ($p < 0,05$), exceto no no parâmetro Sobre os filhotes e *Self grooming*. Porém, o pós-teste indicou que não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados ($p > 0,05$).

Figura 10 – Avaliação do comportamento materno total no período vespertino (15:30h – 17:00h) entre os dias de lactação 2 e 20.



Nota: Avaliação do comportamento materno total no período vespertino (15:30h – 17:00h) entre os dias de lactação 2 e 20. Sem diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$ – ANOVA *three-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). N = 10 em todos os grupos. Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

Figura 11 – Avaliação do comportamento materno total semanal no período vespertino (15:30h – 17:00h) entre os dias de lactação 2 e 20.

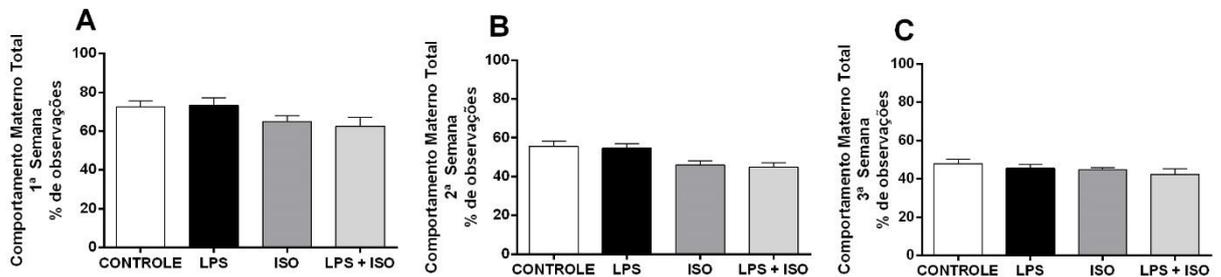
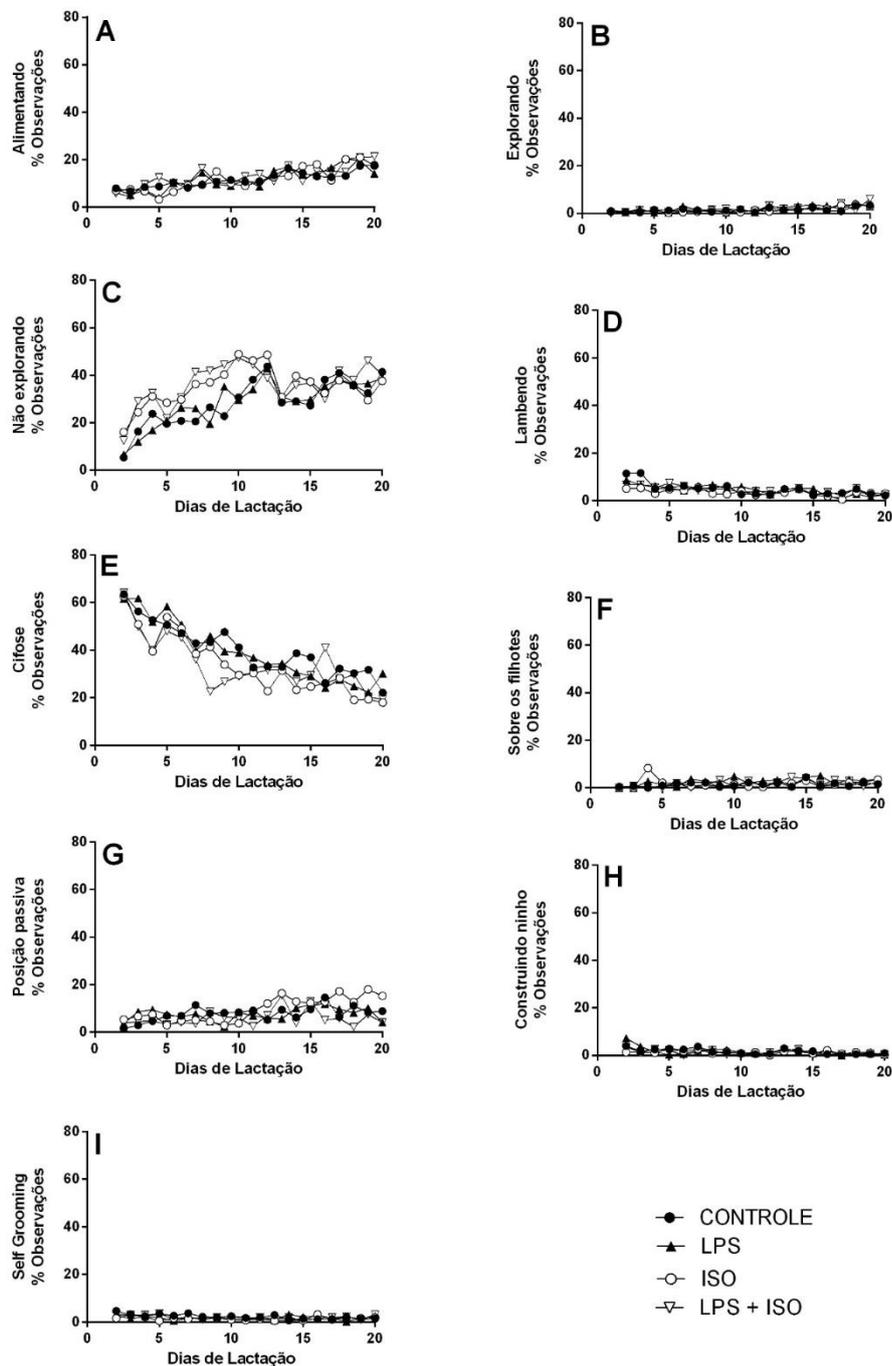


Figura 11 – Avaliação do comportamento materno total semanal no período vespertino (15:30h – 17:00h) entre os dias de lactação 2 e 20. A = Primeira semana de lactação; B= Segunda semana de lactação; C= Terceira semana de lactação. Sem diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$ – ANOVA *three-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). N = 10 em todos os grupos. Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

Figura 12 – Avaliação dos parâmetros do comportamento materno no período vespertino (15:30h – 17:00h) entre os dias de lactação 2 e 20.



Nota: Avaliação dos parâmetros do comportamento materno no período vespertino (15:30h – 17:00h) entre os dias de lactação 2 e 20. Sem diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$ – ANOVA *three-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). A = Comportamentos de alimentação; B= Exploração do ambiente; C= Longe dos filhotes sem exploração do ambiente ou dormindo; D= Lamber o filhotes; E= Cifose; F= Manter-se sobre os filhotes; G= Posição Passiva; H= Atividades de construção do ninho; I= *Self Grooming*. N = 10 em todos os grupos. Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

6.2 RESULTADOS DOS EFEITOS GERAIS DA ADMINISTRAÇÃO DE LPS NO PERÍODO GESTACIONAL E DO EMPOBRECIMENTO AMBIENTAL POR ISOLAMENTO NAS NINHADAS

6.2.1 Avaliação do peso e tamanho das ninhadas

A alteração do peso materno após um desafio imunológico é um indicador da intensidade da resposta imunológica (VOHREES et al, 2012; BRONSON et al, 2011), assim, as fêmeas que perderam peso nas 24 horas subsequentes à administração de LPS foram consideradas responsivas ao LPS (grupo LPS-R), e as que ganharam peso, hipo-responsivas ao LPS (grupo LPS-HR).

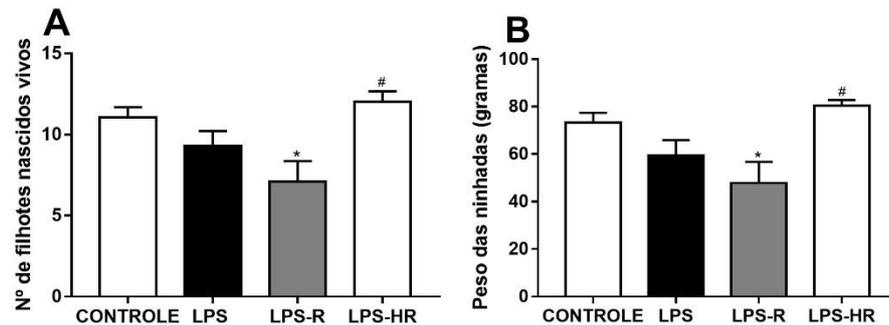
A Figura 13 mostra a avaliação do número de filhotes nascidos vivos e do peso das ninhadas no 1º dia pós-nascimento (DPN 1), antes da realização da padronização. A administração gestacional de LPS teve efeito significativo no tamanho e no peso das ninhadas ($p = 0,0090$ e $p = 0,0100$, respectivamente), e as ninhadas das fêmeas responsivas ao LPS apresentaram menor número de filhotes ($p = 0,0194$) e menor peso ($p = 0,0316$) em relação as ninhadas das fêmeas controle. As ninhadas das fêmeas hipo-responsivas ao LPS apresentaram significativamente maior número de filhotes ($p = 0,0191$) e maior peso ($p = 0,0241$) comparado as ninhadas das fêmeas responsivas (ANOVA *one-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*).

Após a padronização as ninhadas foram divididas em grupos isolados e não isolados. Para a análise do peso das ninhadas após padronização e do peso dos animais adultos foi utilizada a análise de variância de duas vias (ANOVA *two-way*) seguida pelo pós-teste de *Turkey*.

Foi realizado o controle de peso das ninhadas no 1º, 7º, 13º e 21º dia de vida. Os resultados estão apresentados na Figura 14. Não foi observado efeito significativo da exposição gestacional ao LPS nem do isolamento sobre o peso das ninhadas em nenhum dos dias analisados ($p > 0,05$)

Entre os dias de vida 70 e 75 foram pesados um macho e uma fêmea de cada ninhada. O peso médio por animal na idade adulta está apresentado na Figura 15. Na prole feminina, o fator isolamento foi significativo ($p = 0,0023$), porém não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos analisados. Na prole masculina não houve efeito do tratamento nem do isolamento no peso do macho adulto ($p > 0,05$).

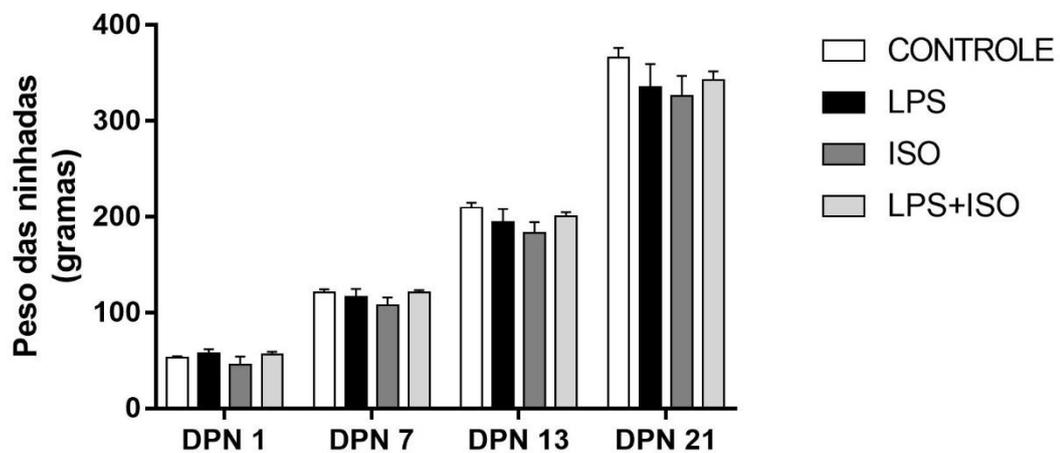
Figura 13 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional sobre o número de filhotes nascidos vivos (A) e sobre o peso das ninhadas precedente a padronização (B).



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional sobre o número de filhotes nascidos vivos (A) e sobre o peso das ninhadas precedente a padronização (B). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle e # $p < 0,05$ comparado com o grupo LPS-R (ANOVA *One-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média \pm erro padrão da média. Grupo Controle $n=20$, grupo LPS $n=20$, grupo LPS HR $n=7$.

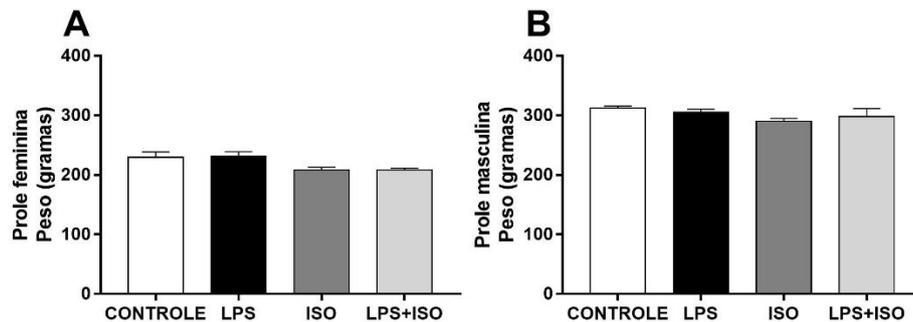
Fonte: Da autora.

Figura 14 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre o peso das ninhadas após padronização.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre o peso das ninhadas após padronização. $N=10$ em todos os grupos. Valores representados em média \pm erro padrão da média. Sem diferenças estatísticas entre os grupos analisados ($p < 0,05$ - ANOVA *Two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*).
Fonte: Da autora.

Figura 15 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre o peso dos animais adultos.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre o peso dos animais adultos. A – Resultados na prole feminina; B – Resultados na prole masculina. N=10 em todos os grupos. Valores representados em média \pm erro padrão da média. Sem diferenças estatísticas entre os grupos analisados ($p < 0,05$ - ANOVA *Two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*).

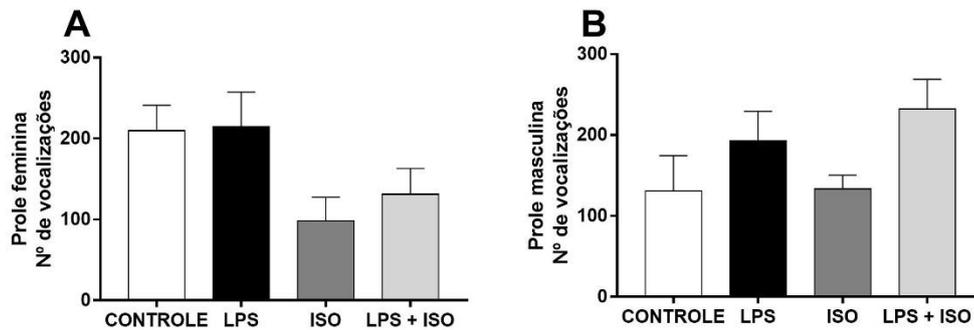
Fonte: Da autora.

6.3 RESULTADOS DA ETAPA II – EXPERIMENTOS REALIZADOS COM FILHOTES ENTRE OS DIAS DE VIDA 13 E 32.

6.3.1 Vocalização

Os resultados do teste de vocalização tanto da prole masculina quanto da prole feminina estão apresentados na Figura 16. O isolamento teve efeito significativo no número de vocalizações da prole feminina ($p = 0,0076$), e a exposição gestacional ao LPS teve efeito significativo sobre a vocalização da prole masculina ($p = 0,0282$). Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados ($p > 0,05$ – ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*).

Figura 16 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre a comunicação da prole masculina e feminina.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre a comunicação da prole masculina e feminina. Sem diferença estatística para todos os grupos ($p > 0,05$ – ANOVA *Two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). A = Resultados na prole feminina, B= Resultados na prole masculina. N = 10 em todos os grupos. Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

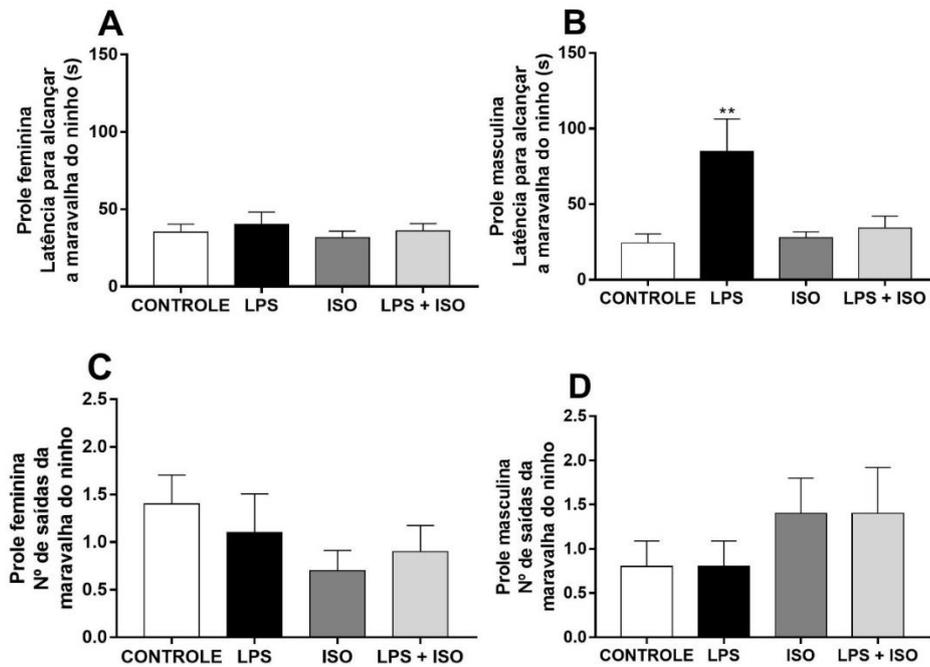
6.3.2 *Homing response*

Os resultados do teste de *Homing response* estão apresentados na Figura 17. A análise estatística (ANOVA *two-way* com pós-teste de *Turkey*) apontou que na prole masculina houve efeito significativo da exposição gestacional ao LPS no tempo de latência para alcançar a maravalha do ninho ($p = 0,0185$), bem como interação entre a exposição ao LPS e o isolamento ($p = 0,0160$). O pós-teste indicou que a exposição ao LPS provocou aumento significativo no tempo de latência para alcançar a maravalha do ninho ($p = 0,0060$ comparado ao grupo Controle). Essa alteração não foi observada nos animais LPS+ISO ($p = 0,7738$ comparado ao grupo Controle), sugerindo que o isolamento foi capaz de prevenir o efeito da exposição ao LPS. No número de saídas da maravalha do ninho não houve efeito do tratamento nem do isolamento ($p > 0,05$). Na prole feminina também não foram observadas alterações em nenhum dos dois parâmetros avaliados ($p > 0,05$).

A Figura 18 apresenta a comparação da latência para atingir a maravalha do ninho entre a prole masculina e a feminina. Para isso foi utilizada a análise de variância de três vias (ANOVA *three-way* com pós-teste de *Turkey*). Houve interação significativa entre os três fatores (exposição gestacional ao LPS, isolamento e sexo da prole – $p = 0,0477$). O pós-teste

indicou que o efeito do LPS no aumento da latência ocorreu apenas na prole masculina ($p = 0,0244$ comparado ao grupo LPS da prole feminina).

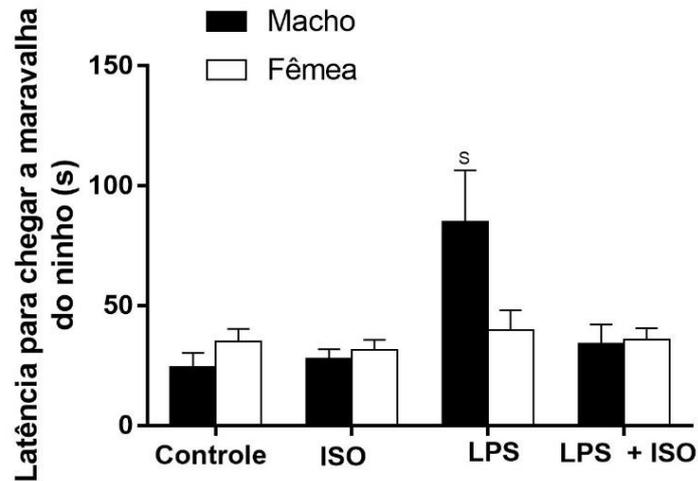
Figura 17 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre o tempo de latência para atingir a maravalha do ninho e no número de saídas da maravalha do ninho.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre o tempo de latência para atingir a maravalha do ninho e no número de saídas da maravalha do ninho. A e C – Resultados na prole feminina; B e D – Resultados na prole masculina. N = 10 em todos os grupos. ** $p = 0,0060$ em relação ao Grupo Controle. (ANOVA *Two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

Figura 18 – Comparação do tempo de latência para atingir a maravalha materna na prole masculina e na prole feminina. N = 10 em todos os grupos.



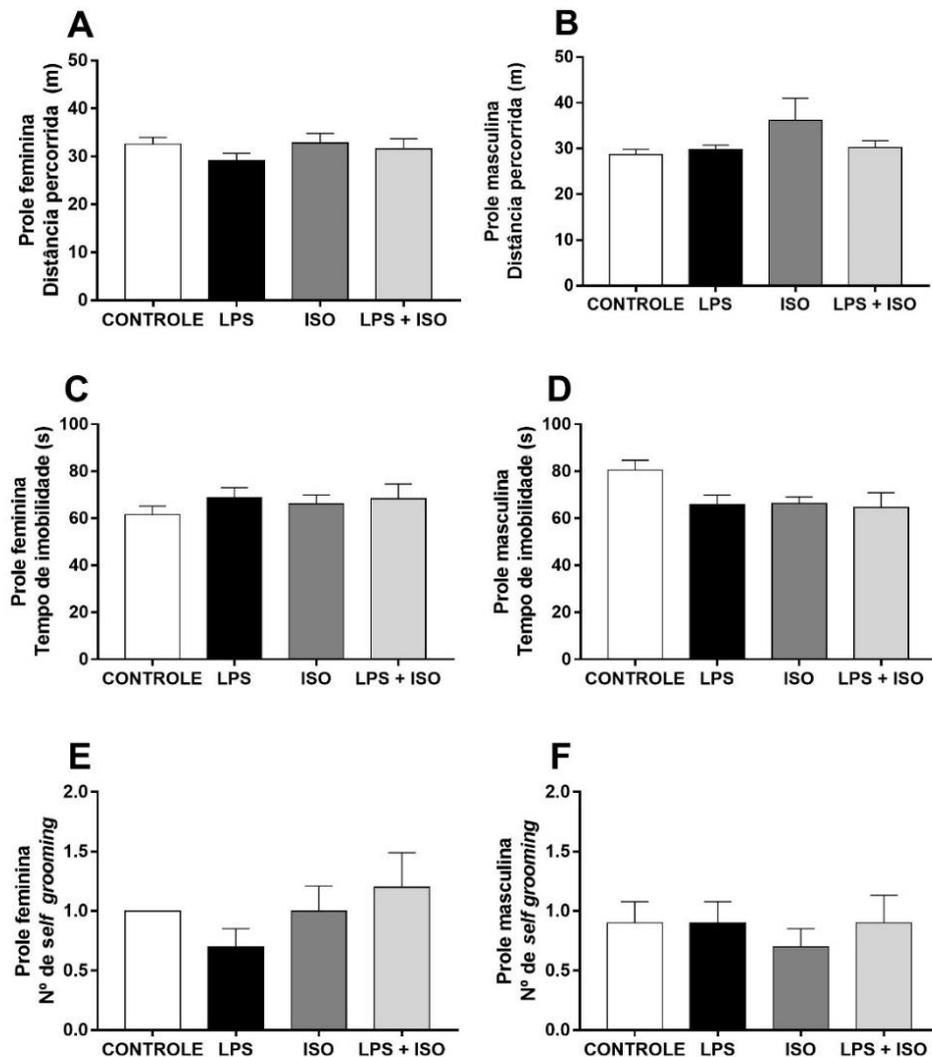
Nota: Comparação do tempo de latência para atingir a maravalha materna na prole masculina e na prole feminina. N = 10 em todos os grupos. ^sp= 0,0244 comparado ao grupo LPS da prole feminina. (ANOVA *three-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média ± erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

6.3.3 Campo aberto

Os resultados do teste de campo aberto estão apresentados na Figura 19. Não foi observado efeito significativo da exposição gestacional ao LPS ou do isolamento ($p > 0,05$) sobre os parâmetros avaliados, independente do sexo da prole (ANOVA *two-way*).

Figura 19 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre a distância percorrida, o tempo de imobilidade e o número de *self grooming* no teste de campo aberto.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre a distância percorrida, o tempo de imobilidade e o número de *self grooming* no teste de campo aberto. A, C e E – Resultados na prole feminina; B, D e F – Resultados na prole masculina. N = 10 em todos os grupos. Valores representados em média \pm erro padrão da média. Sem diferenças significativas entre os grupos analisados ($p > 0,05$ – ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*).

Fonte: Da autora.

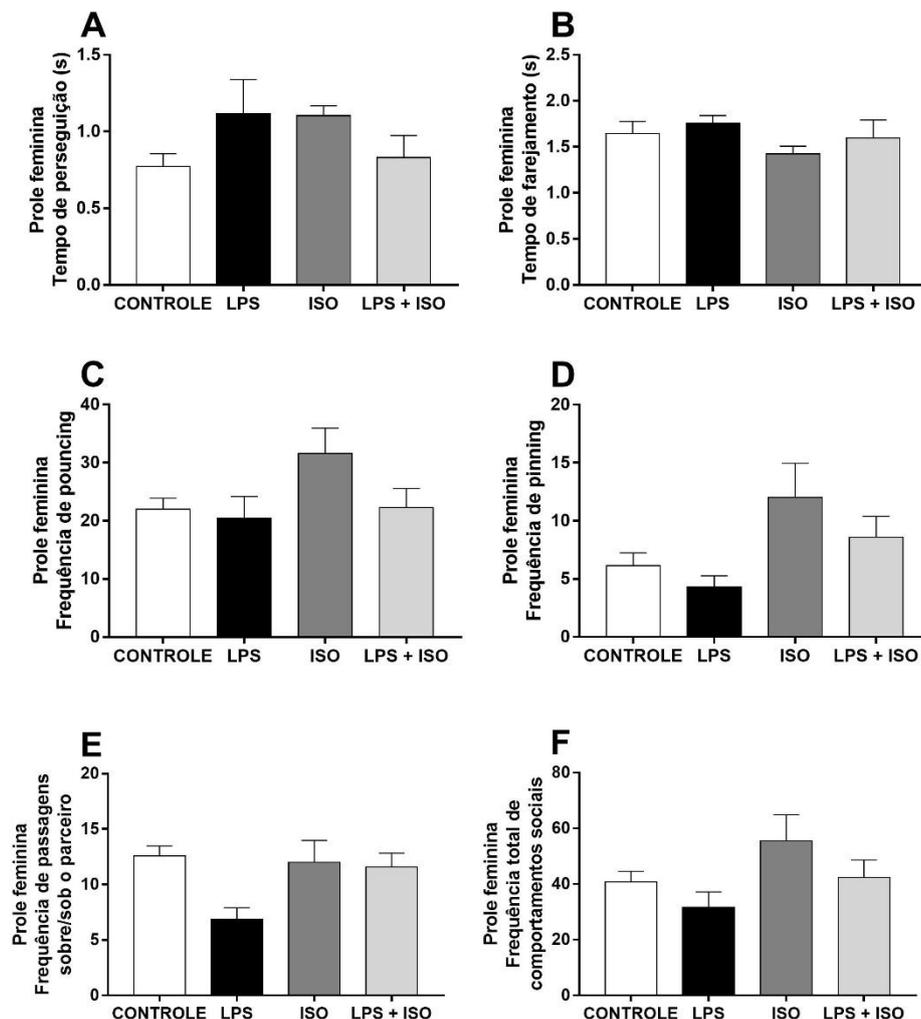
6.3.4 Comportamento de brincar (*Play Behavior*)

Os resultados do teste do comportamento de brincar estão apresentados nas Figuras 20 (prole feminina) e 21 (prole masculina). Para a análise estatística foi utilizada a análise de variância de duas vias (ANOVA *two-way*) com pós-teste de *Turkey*. Na prole masculina houve

efeito significativo da exposição gestacional ao LPS e do isolamento na frequência de *pouncing* ($p = 0,0337$ e $p = 0,0183$, respectivamente) e na frequência total de comportamentos sociais ($p = 0,0178$ e $p = 0,0465$, respectivamente), sem interação entre os fatores ($p > 0,05$). O pós-teste não identificou diferenças significativas entre os grupos analisados, porém, foi observada uma tendência de redução na frequência total de comportamentos sociais no grupo LPS ($p = 0,0506$ comparado ao grupo controle).

Na prole feminina o isolamento teve efeito significativo na frequência de *pinning* ($p = 0,0130$), e a exposição ao LPS na frequência de passagens sob/sobre o parceiro ($p = 0,0332$). Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados ($p > 0,05$).

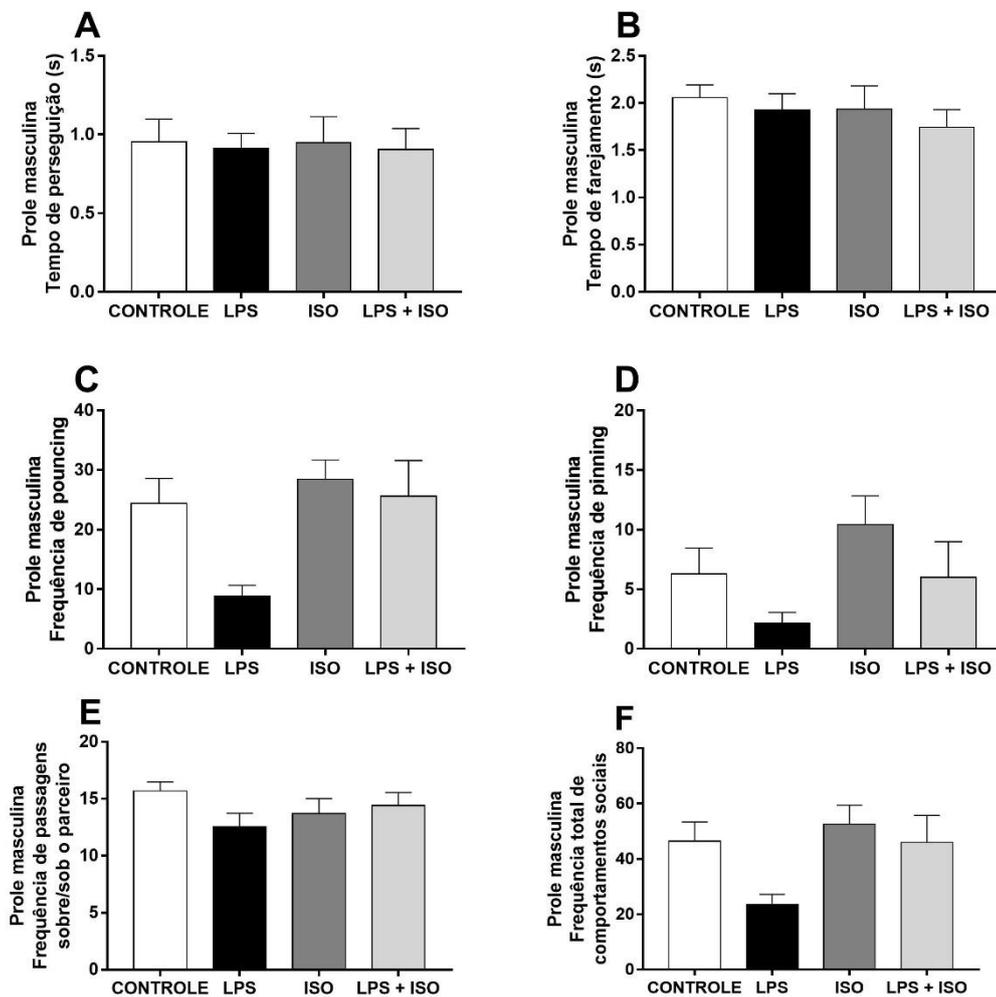
Figura 20 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento no comportamento de brincar da prole feminina.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento no comportamento de brincar da prole feminina. A = tempo de perseguição; B – tempo de farejamento; C – frequência de *pouncing*, D – frequência de *pinning*; E – frequência de passagens sobre/sob o parceiro; F – frequência total de comportamentos sociais. N = 7 duplas em todos os grupos. Sem diferenças significativas entre os grupos analisados ($p > 0,05$ – ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

Figura 21 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental no comportamento de brincar da prole masculina.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental no comportamento de brincar da prole masculina. A = tempo de perseguição; B – tempo de farejamento; C – frequência de *pouncing*, D – frequência de *pinning*; E – frequência de passagens sobre/sob o parceiro; F – frequência total de comportamentos sociais. N = 7 duplas em todos os grupos. Sem diferenças significativas entre os grupos analisados ($p > 0,05$ – ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média \pm erro padrão da média.

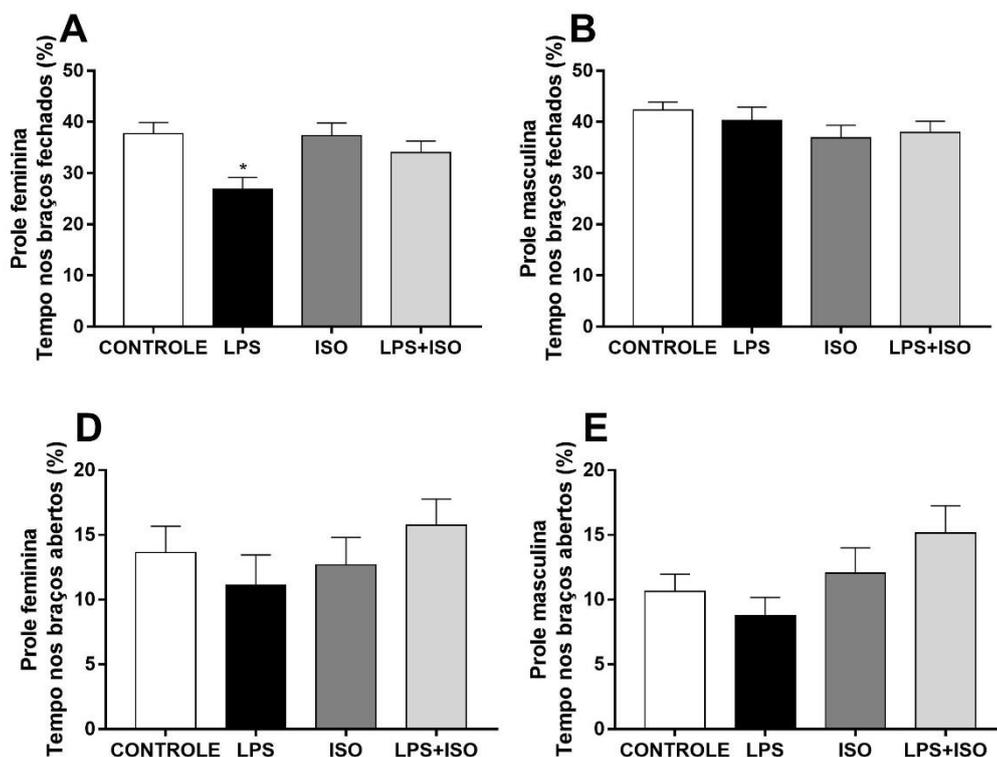
Fonte: Da autora.

6.3.5 Labirinto em cruz elevado

A Figura 22 mostra os resultados do teste do labirinto em cruz elevado realizado com a prole adolescente (30° DPN). Na prole feminina houve efeito significativo da exposição gestacional ao LPS na porcentagem de tempo despendido nos braços fechados ($p = 0,0045$), e o grupo LPS apresentou redução nesse parâmetro ($p = 0,0112$ comparado ao grupo Controle). A mesma alteração não foi observada no grupo LPS+ISO ($p = 0,7578$ comparado ao grupo Controle), porém, o teste não identificou interação entre a exposição gestacional ao LPS e o isolamento ($p=0,1104$). Na prole masculina o isolamento teve efeito na porcentagem de tempo despendido nos braços abertos ($p = 0,0309$), mas não foram observadas diferenças significativas entre os grupos analisados ($p > 0,05$ – ANOVA *two-way* com pós-teste de *Turkey*).

A comparação entre a porcentagem de tempo despendida nos braços fechados pela prole feminina e pela prole masculina está apresentada na Figura 23. Foi utilizada a análise de variância de três vias (ANOVA *Three-way*) com pós-teste de *Turkey*. Houve efeito significativo do tratamento ($p = 0,0060$) e do fator sexo ($p = 0,0003$), com interação entre os dois fatores ($p = 0,0463$). O pós-teste indicou que a exposição ao LPS levou a redução no tempo despendido nos braços fechados apenas na prole feminina ($p= 0,0024$ comparado ao grupo LPS da prole masculina).

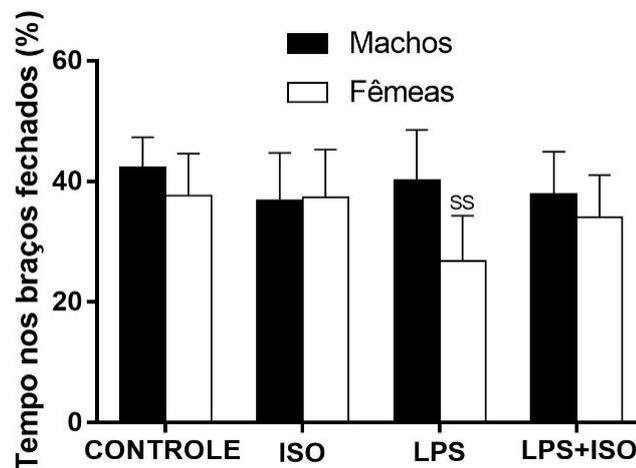
Figura 22 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre o tempo despendido nos braços abertos e nos braços fechados no labirinto em cruz elevado.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre o tempo despendido nos braços abertos e nos braços fechados no labirinto em cruz elevado. A e C - Resultados na prole feminina; B e D - Resultados na prole masculina. N= 10 em todos os grupos. *p= 0,0112 (ANOVA *Two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

Figura 23 – Comparação do tempo despendido nos braços abertos pela prole feminina e pela prole masculina.



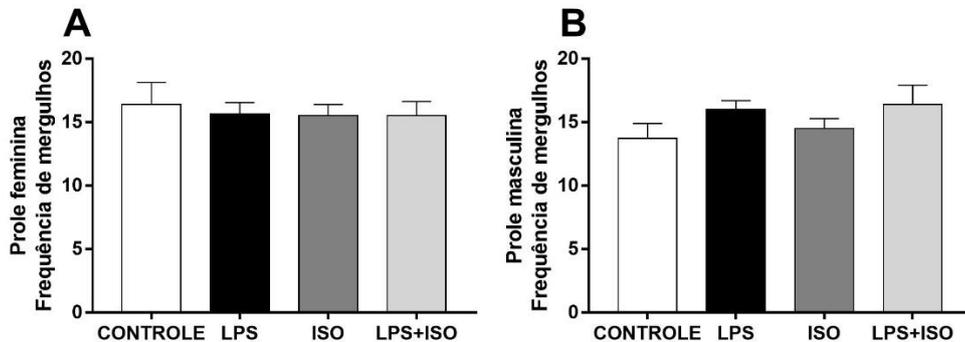
Nota: Comparação do tempo despendido nos braços abertos pela prole feminina e pela prole masculina. N= 10 em todos os grupos. ^{SS}p= 0,0024 comparado ao grupo LPS da prole masculina (ANOVA *Three-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

6.3.6 Tábua-de-buracos

Os resultados do teste da tábua-de-buracos estão apresentados na Figura 24. A análise estatística (ANOVA *Two-way*) não identificou efeito significativo da exposição ao LPS durante o período gestacional ou do isolamento sobre o número de mergulhos ($p > 0,05$), tanto na prole feminina quanto na prole masculina.

Figura 24 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre o número de mergulhos nos buracos na prole masculina e feminina.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre o número de mergulhos nos buracos na prole masculina e feminina. A - Resultados na prole feminina; B - Resultados na prole masculina. N=10 em todos os grupos. Sem diferenças significativas entre os grupos analisados ($p > 0,05$ – ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

6.4 RESULTADOS DA ETAPA III – EXPERIMENTOS REALIZADOS COM A PROLE ADULTA.

6.4.1 Labirinto aquático de Morris

A Figura 25 apresenta os resultados da etapa de treinos do labirinto aquático de Morris. Foi observado efeito significativo do dia de treino na latência para encontrar a plataforma ($p < 0,0001$), tanto na prole feminina quanto na prole masculina, porém, não foram observados efeitos da exposição ao LPS ou do isolamento ($p > 0,05$ – ANOVA *three-way*).

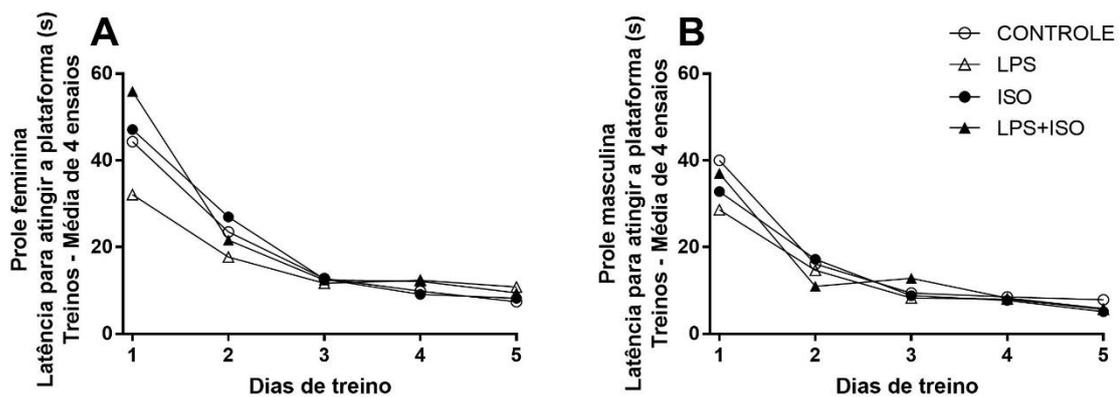
Para a análise dos resultados do dia do teste (Figura 26) foi utilizada a análise de variância de duas vias (ANOVA *two-way*) com pós-teste de *Turkey*. Na prole feminina a exposição gestacional ao LPS teve efeito significativo sobre o tempo de latência para chegar ao local onde ficava a plataforma na etapa de treinos ($p = 0,0454$), e o LPS esteve associado ao aumento significativo na latência ($p = 0,0439$ comparado ao controle). A mesma alteração não foi observada no grupo LPS+ISO ($p = 0,6882$ comparado ao grupo controle), porém o teste não identificou interação entre a exposição gestacional ao LPS e o isolamento ($p = 0,2878$). Foi observado efeito do isolamento no tempo despendido no quadrante alvo ($p = 0,0185$), porém não foram encontradas diferenças entre os grupos neste parâmetro ($p > 0,05$).

Na prole masculina, houve efeito do isolamento na distância percorrida ($p = 0,0208$), porém, o pós-teste não indicou diferenças entre os grupos. Nos outros parâmetros analisados não foram identificados efeitos da exposição ao LPS ou do isolamento ($p > 0,05$).

Foi feita a comparação entre a prole masculina e a prole feminina no parâmetro de latência para atingir o local onde ficava a plataforma na etapa de treinos. Para isso foi utilizada a análise de variância de três vias (ANOVA *three-way*), que indicou efeito significativo do sexo da prole nos resultados ($p = 0,0477$), porém, o pós-teste não indicou diferenças entre os grupos analisados ($p > 0,05$).

Em relação a fase do ciclo reprodutivo, no dia teste 43,47% das fêmeas estavam em diestro, 32,60% em metaestro, 13,04% em estro e 10,86% em proestro.

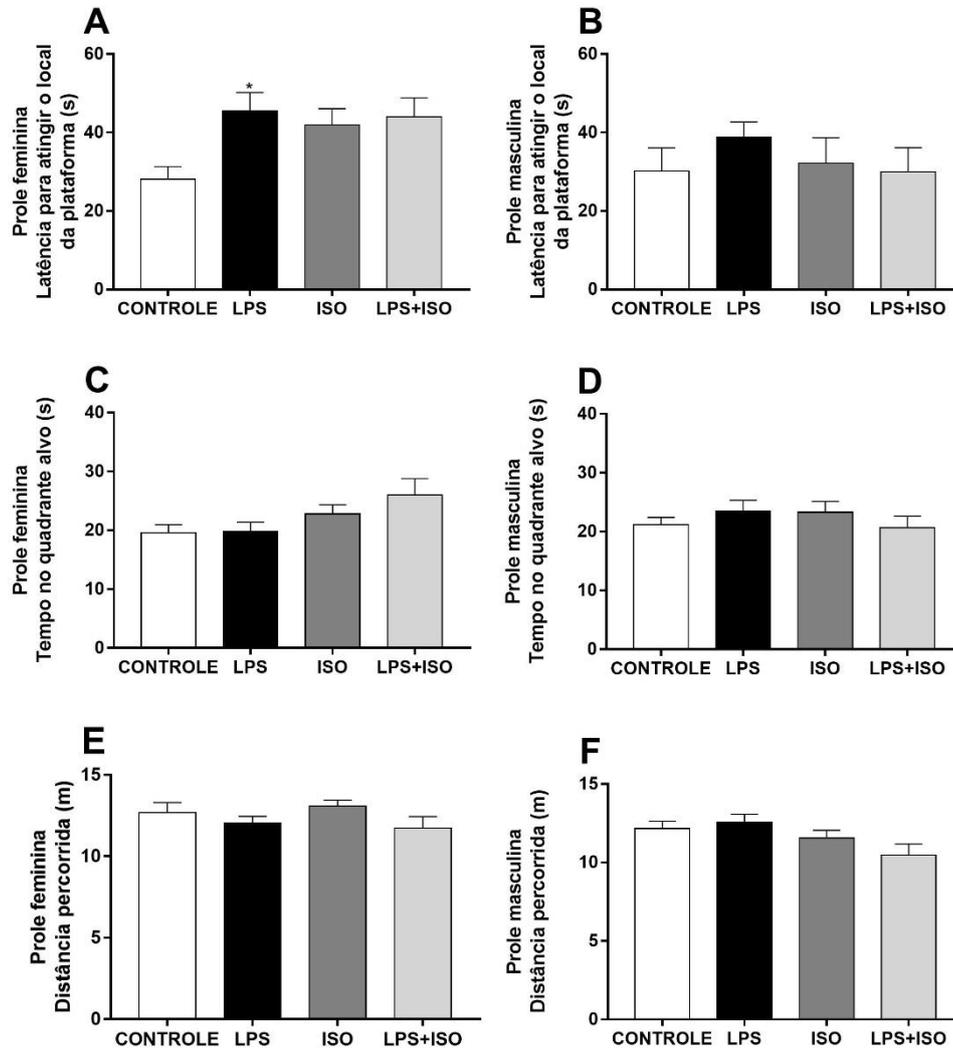
Figura 25 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental sobre o tempo latência para atingir a plataforma nos cinco dias de treino do labirinto aquático.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental sobre o tempo latência para atingir a plataforma nos cinco dias de treino do labirinto aquático. A – Resultados na prole feminina; B – Resultados na prole masculina. N=10 em todos os grupos. Valores expressos em média.

Fonte: Da autora.

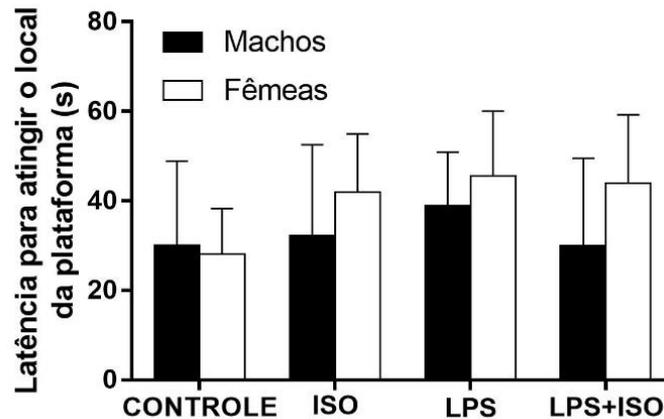
Figura 26 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental sobre o tempo de latência para atingir o local da plataforma, o tempo de permanência no quadrante alvo e a distância percorrida no labirinto aquático.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental sobre o tempo de latência para atingir o local da plataforma, o tempo de permanência no quadrante alvo e a distância percorrida no labirinto aquático. A, C e E – Resultados na prole feminina; B, D e F – Resultados na prole masculina. N=10 em todos os grupos. * $p=0,0439$ quando comparado ao grupo Controle (ANOVA *Two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

Figura 27 – Comparação do tempo de latência para atingir a plataforma na prole feminina e masculina.



Nota: Comparação do tempo de latência para atingir a plataforma na prole feminina e masculina. N=10 em todos os grupos. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos analisados (ANOVA *Three-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

6.4.2 Exposição ao odor de gato

Neste teste todos os grupos foram comparados ao grupo Neutro nas duas etapas, por isso foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA *One-way*) seguida pelo pós-teste de Dunnett.

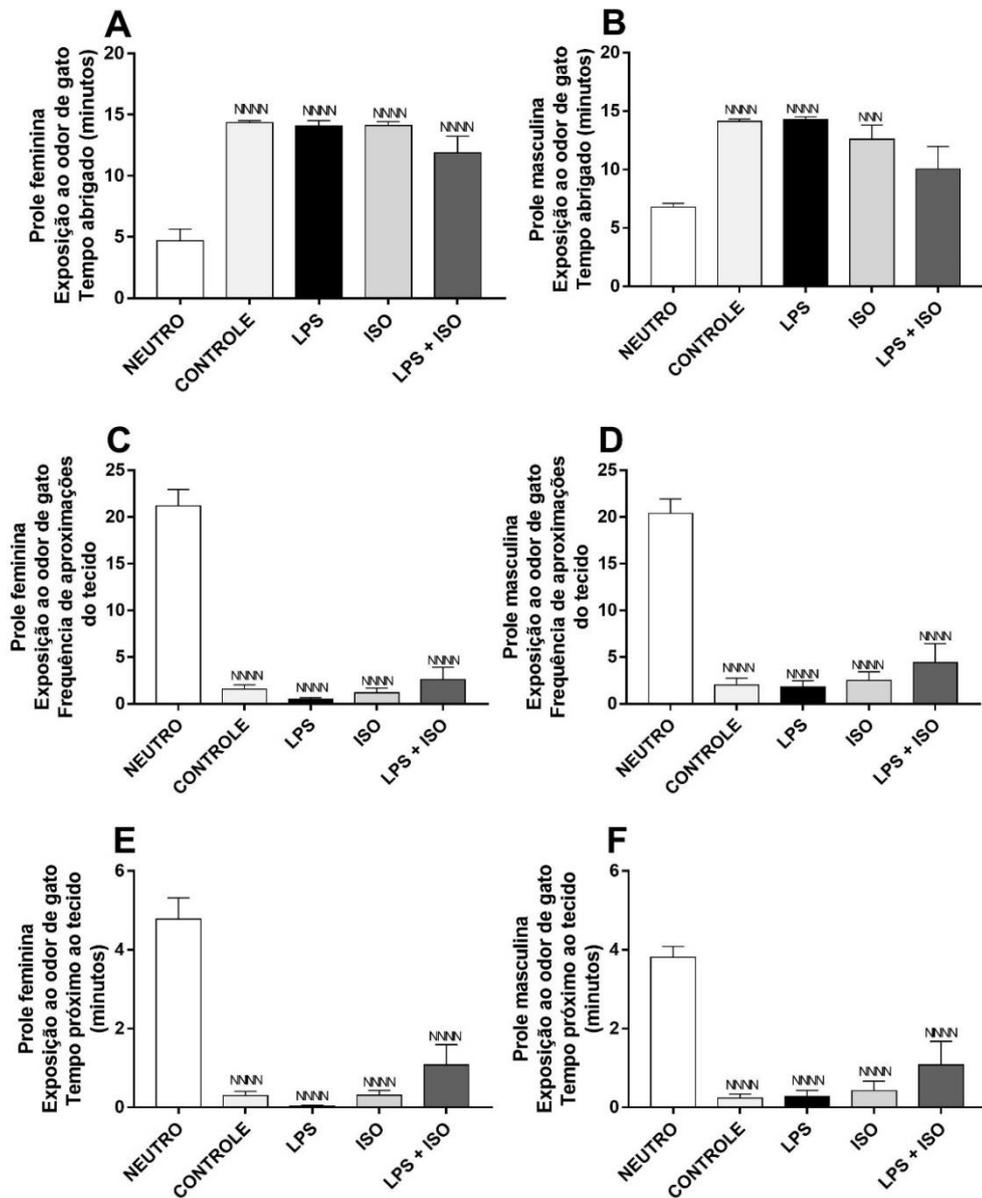
A Figura 28 apresenta os resultados do teste de exposição ao odor aversivo na fase de exposição ao odor de gato. Na prole feminina, quando comparados ao grupo Neutro, todos os grupos analisados foram sensíveis ao odor de gato, apresentando aumento no tempo de abrigo, redução na frequência de aproximações do tecido impregnado com odor e redução no tempo despendido próximo ao tecido ($p < 0,05$). Quanto ao ciclo reprodutivo, no dia teste 53,33% das fêmeas estavam em diestro, 28,88% estavam em estro e 17,7% estavam em metaestro.

Na prole masculina, o grupo LPS+ISO não apresentou aumento no tempo de abrigo ($p = 0,0956$), porém, todos os outros grupos analisados apresentaram aumento significativo no tempo despendido no abrigo ($p < 0,05$). Em relação aos outros parâmetros, todos os grupos apresentaram redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na frequência de aproximações e no tempo gasto próximo ao tecido impregnado com o odor de gato, indicando que todos os grupos foram sensíveis ao odor.

Os resultados da fase de contexto estão apresentados na Figura 29. Na prole feminina o grupo LPS e o grupo LPS+ISO apresentaram redução na frequência de aproximações do tecido de odor neutro ($p = 0,0024$ e $p = 0,0445$, respectivamente), sugerindo comportamento de medo e ansiedade nesses animais.

Na prole masculina, os animais expostos ao LPS no período gestacional apresentaram aumento no tempo de abrigo ($p=0,0121$). A mesma alteração não foi identificada no grupo LPS+ISO ($p = 0,9999$ comparado ao grupo Neutro). No tempo despendido próximo ao tecido não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos analisados e o grupo Neutro ($p > 0,05$).

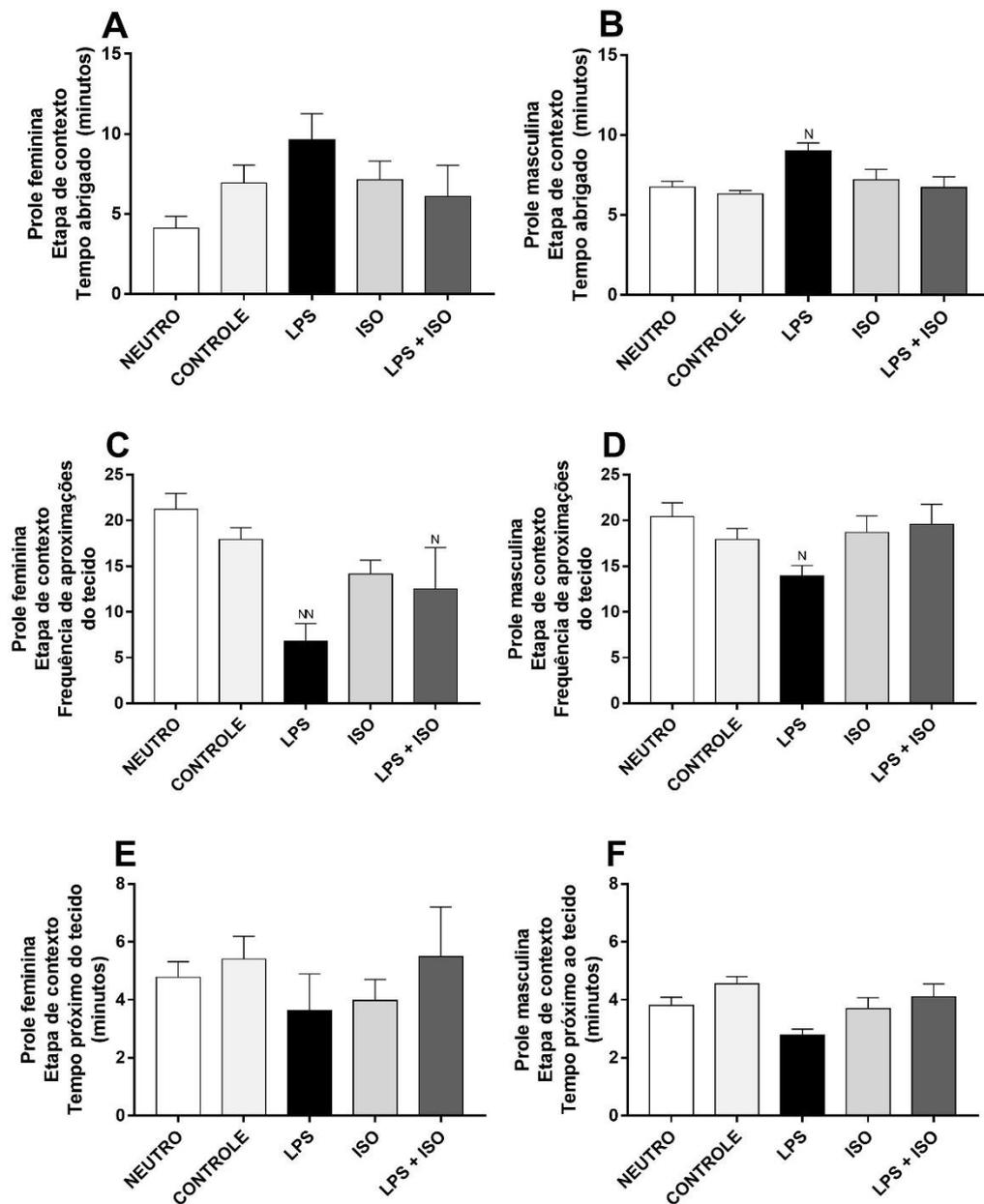
Figura 28 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre na fase de exposição ao odor de gato.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre na fase de exposição ao odor de gato. A, C e E – Resultados na prole feminina; B, D e F – Resultados na prole masculina. N=10 em todos os grupos. ^{NNN}p <0,0001 quando comparado ao grupo Neutro e ^{NNN}p <0,001 quando comparado ao grupo Neutro (ANOVA *One-way* seguido pelo pós-teste de Dunnet). Valores representados em média ± erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

Figura 29 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre a fase de contexto do teste de exposição ao odor de gato.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental por isolamento sobre a fase de contexto do teste de exposição ao odor de gato. A, C e E – Resultados na prole feminina – N=10 grupos Neutro e Controle, N=5 grupo LPS, N= 8 grupos ISO e LPS+ISO; B, D e F – Resultados na prole masculina - N=10 em todos os grupos. ^Np < 0,05 quando comparado ao grupo Neutro; ^{NN}p < 0,01 quando comparado ao grupo Neutro (ANOVA *One-way* seguido pelo pós-teste de Dunnett). Valores representados em média ± erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

6.4.3 Labirinto em cruz elevado

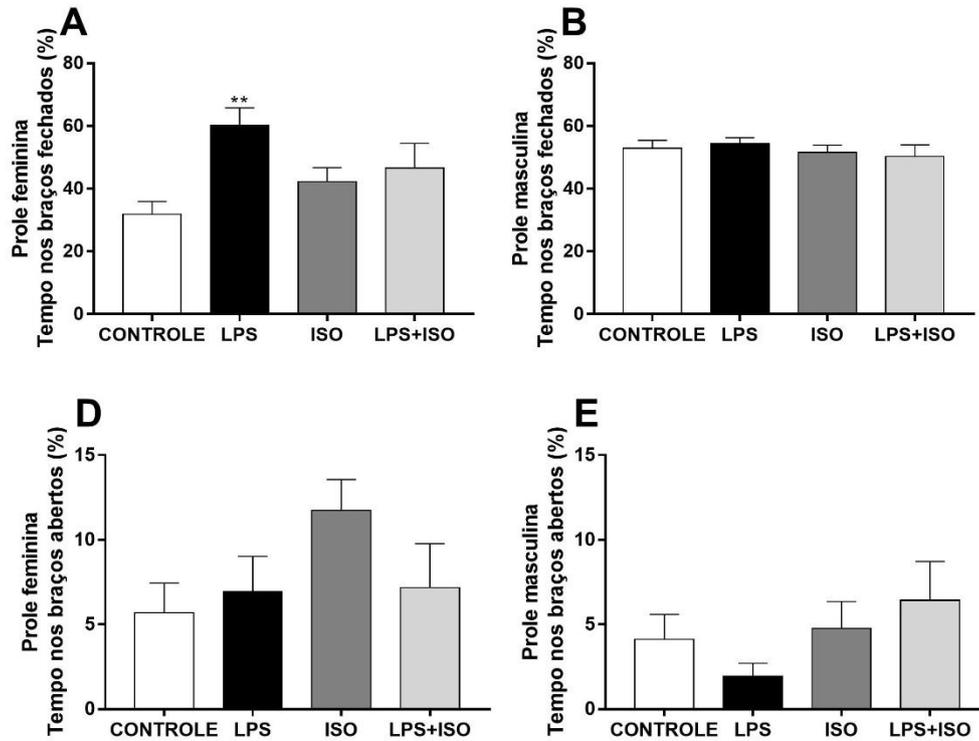
Os resultados do teste do labirinto em cruz elevado realizado com a prole adulta estão apresentados na Figura 30. Para a análise dos resultados foi utilizado ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*. Na prole feminina a exposição gestacional ao LPS causou efeito significativo na porcentagem de tempo despendido nos braços fechados ($p = 0,0421$), bem como foi observada interação entre a exposição ao LPS e o isolamento ($p = 0,421$). O grupo LPS apresentou aumento significativo nesse parâmetro ($p = 0,0065$ comparado ao grupo Controle), o que não foi observado no grupo LPS+ISO ($p = 0,2687$ comparado ao grupo Controle), indicando que o isolamento foi capaz de prevenir o efeito do LPS.

Na porcentagem de tempo despendida nos braços abertos do aparato, não foi observado efeito significativo do tratamento ou do isolamento ($p > 0,05$). Em relação ao ciclo reprodutivo no dia do teste, 52,17% das fêmeas estavam em diestro, 32,60% em metaestro, 10,86% em estro e 4,34% em proestro.

Na prole masculina a análise estatística não apontou efeitos significativos do tratamento ou do isolamento sobre o tempo despendido nos braços abertos e nos braços fechados do aparato ($p > 0,05$).

Foi realizada a comparação entre o tempo despendido pela prole feminina e pela prole masculina nos braços fechados ao aparato (Figura 31), utilizando a análise de variância de três vias (ANOVA *three-way*) seguida pelo pós-teste de *Turkey*. Foi identificado efeito significativo do sexo da prole nos resultados ($p = 0,0493$), bem como interação entre o tratamento e o sexo ($p = 0,0244$). Entretanto, pós-teste não apontou diferenças significativas entre os grupos analisados ($p > 0,05$).

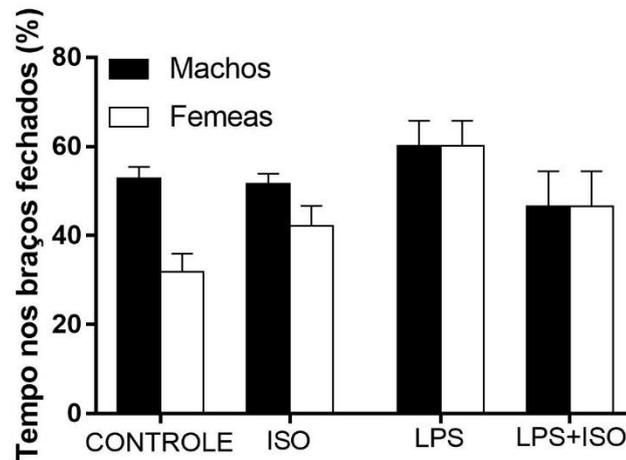
Figura 30 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental no tempo despedido nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental no tempo despedido nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado. A e C – Resultados na prole feminina; B e D – Resultados na prole masculina. N=10 em todos os grupos. **p= 0,0061 comparado ao grupo controle (ANOVA *Two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

Figura 31 – Comparação do tempo despendido nos braços fechados do labirinto em cruz elevado pela prole feminina e pela prole masculina.



Nota: Comparação do tempo despendido nos braços fechados do labirinto em cruz elevado pela prole feminina e pela prole masculina. N=10 em todos os grupos. Sem diferenças significativas entre os grupos (ANOVA *Three-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

6.4.4 Interação social

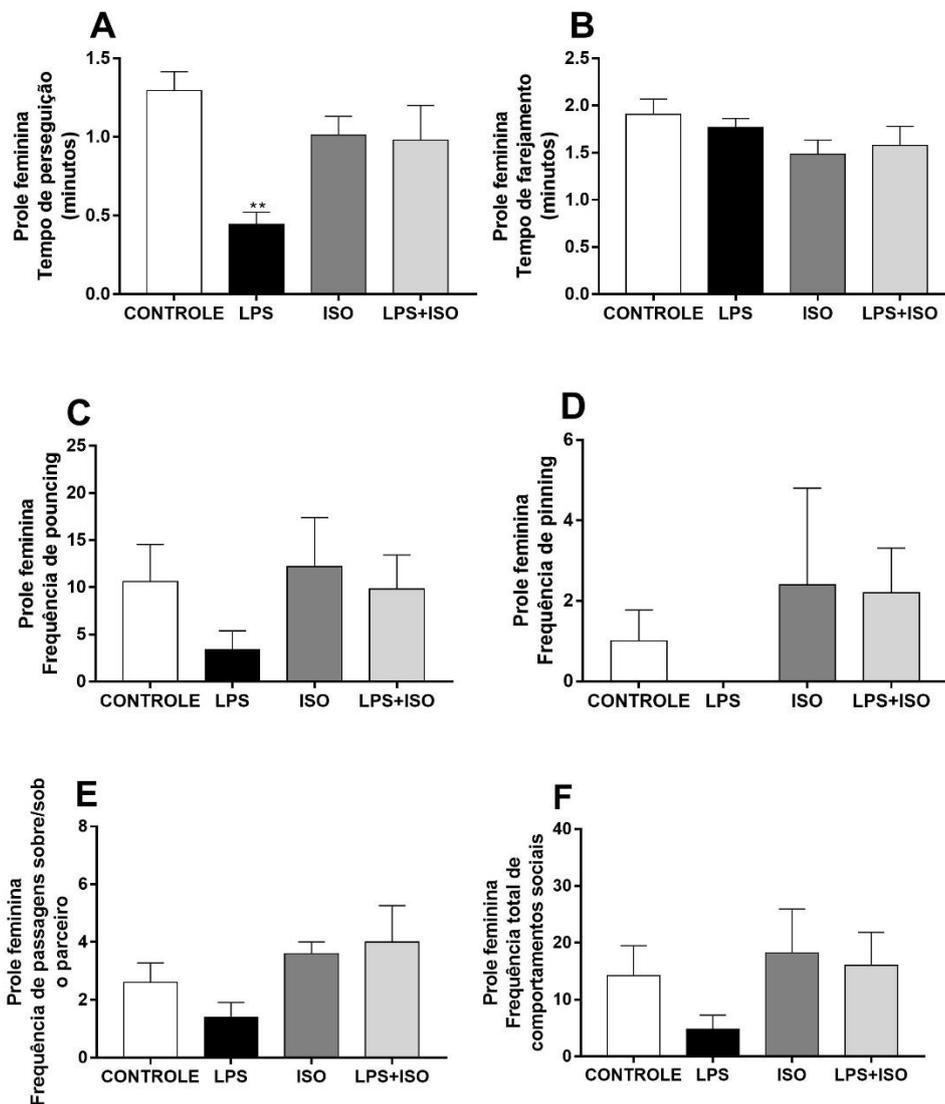
Os resultados do teste de interação social estão apresentados nas Figuras 32 (prole feminina) e 33 (prole masculina). Para a análise foi utilizada ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*. Na prole feminina houve efeito significativo da exposição ao LPS no tempo de perseguição ($p = 0,0076$), e interação entre a exposição ao LPS e o isolamento ($p = 0,0120$). O grupo LPS apresentou redução no tempo de perseguição ($p = 0,0037$ comparado ao grupo Controle), alteração que não foi observada no grupo LPS+ISO ($p = 0,4346$ comparado do grupo Controle), o que indica que o isolamento foi capaz de prevenir o efeito da exposição ao LPS.

Foi observado efeito do isolamento na frequência e passagens sob/sobre o parceiro ($p = 0,0362$), porém, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos nesse parâmetro ($p > 0,05$). Nos outros parâmetros não foram encontrados efeitos da exposição ao LPS ou do isolamento ($p > 0,05$). Com relação ao ciclo reprodutivo no dia do teste, 45,45% das fêmeas estavam em diestro, 20,45% em metaestro, 18,18% em estro e 15,90% em proestro.

Na prole masculina a exposição pré-natal ao LPS exerceu efeito significativo sobre a frequência de *pouncing* ($p = 0,0018$), com aumento significativo no grupo LPS nesse parâmetro ($p = 0,0277$ comparado ao grupo Controle). Esse resultado não foi observado no grupo

LPS+ISO ($p = 0,2556$ comparado ao grupo Controle), porém, não foi identificada interação entre a exposição ao LPS e o isolamento ($p = 0,4734$). A exposição ao LPS também teve efeito sobre a frequência total de comportamentos sociais ($p = 0,0230$), porém não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$). Em relação aos outros parâmetros, não houve efeito significativo do tratamento ou do isolamento ($p > 0,05$).

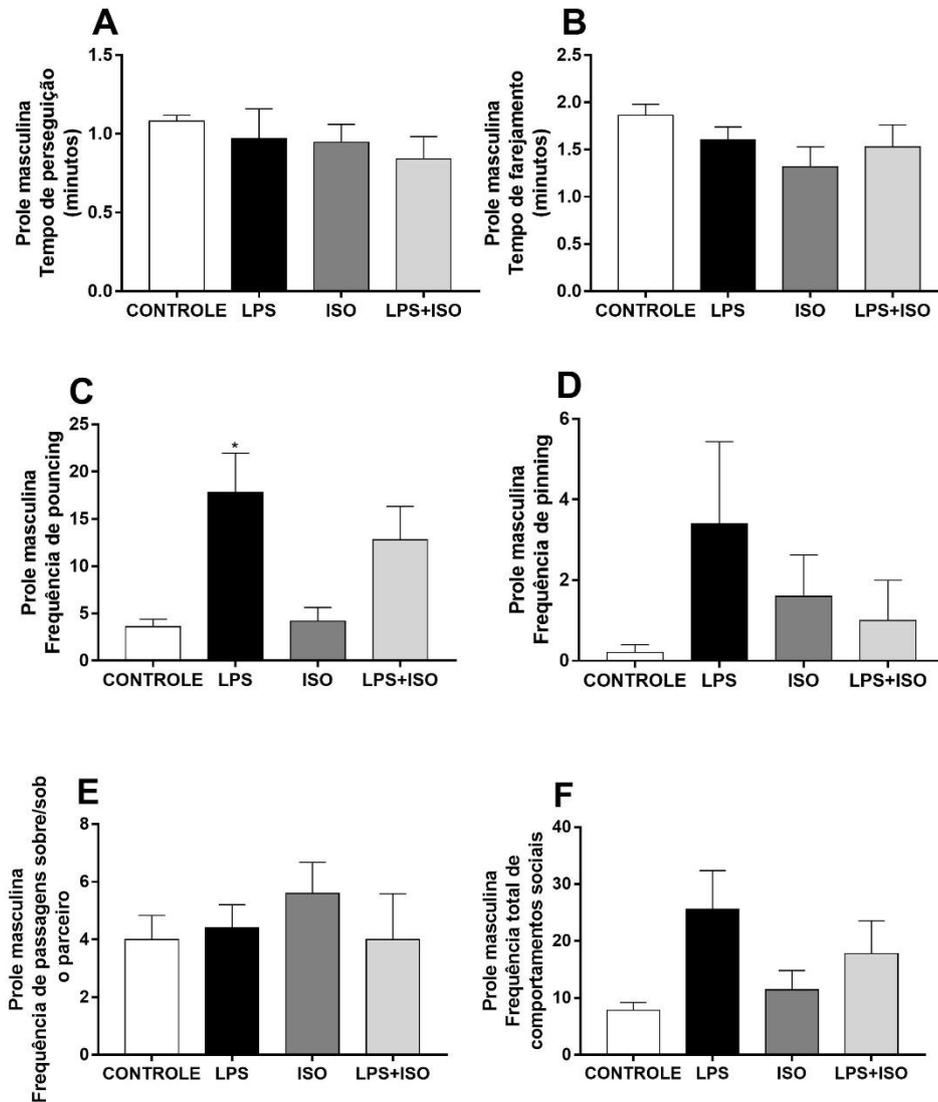
Figura 32 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental sobre os parâmetros da interação social na prole feminina.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental sobre os parâmetros da interação social na prole feminina. A= Tempo de perseguição; B= Tempo de farejamento; C= Frequência de *pouncing*; D= Frequência de *Pinning*; E= Frequência de passagens sobre/sob o parceiro; F= Frequência total de comportamentos sociais. N= 5 duplas em todos os grupos. ** $p = 0,0037$ comparado com o grupo controle (ANOVA *Two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

Figura 33 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental sobre os parâmetros da interação social na prole masculina.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental sobre os parâmetros da interação social na prole masculina. A= Tempo de perseguição; B= Tempo de farejamento; C= Frequência de *pouncing*; D= Frequência de *Pinning*; E= Frequência de passagens sobre/sob o parceiro; F= Frequência total de comportamentos sociais. N= 5 duplas em todos os grupos. *p= 0,0277 comparado ao grupo Controle (ANOVA *Two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média \pm erro padrão da média.

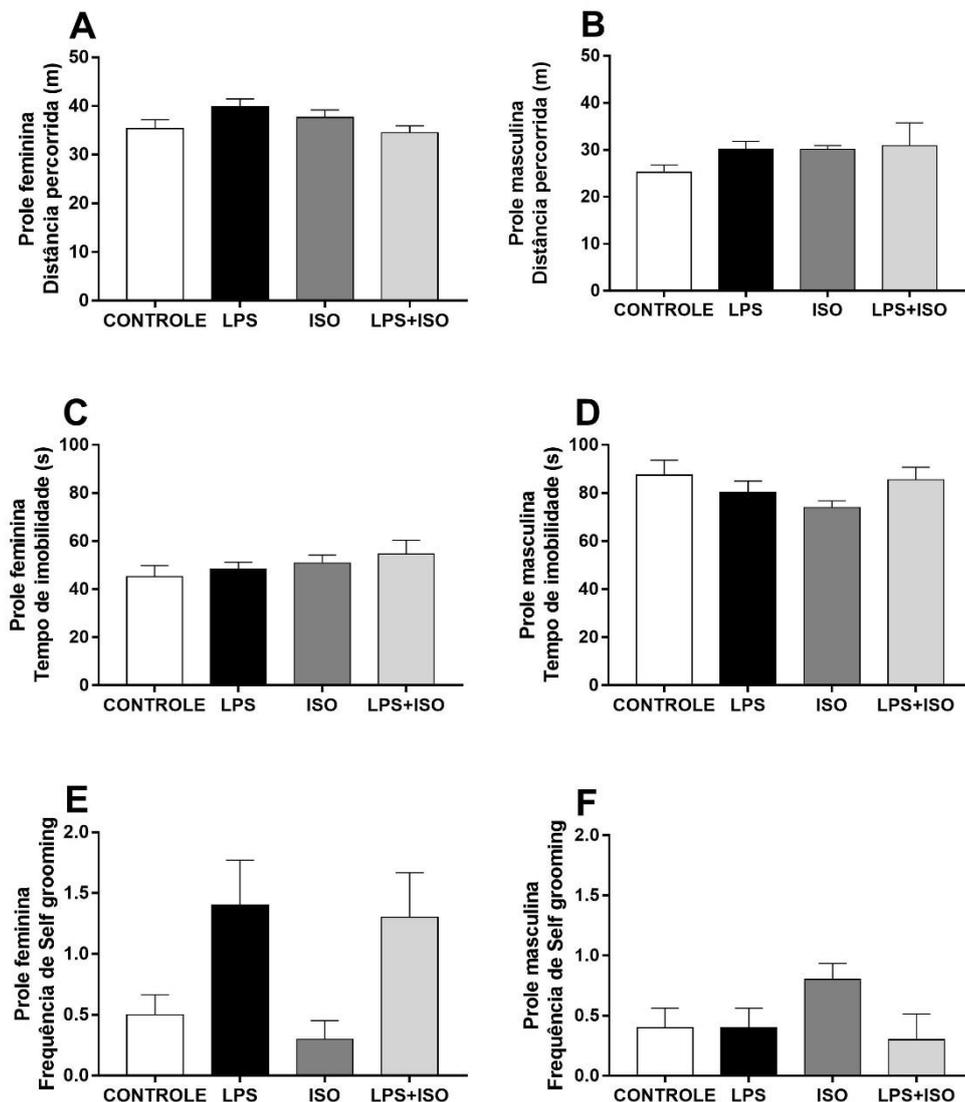
Fonte: Da autora.

6.4.5 Campo aberto

Os resultados do teste do campo aberto dos animais adultos está exposto na Figura 34. A exposição pré-natal ao LPS teve efeito significativo na frequência de *self grooming* na prole

feminina ($p = 0,0020$), mas não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$). Nos outros parâmetros não foi observado efeito significativo do tratamento ou do isolamento. Na prole masculina também não foi observado efeito significativo do tratamento ou do isolamento em nenhum dos três parâmetros analisados ($p > 0,05$ – ANOVA *two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*).

Figura 34 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental sobre os parâmetros do campo aberto.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental sobre os parâmetros do campo aberto. A, C e E – Resultados na prole feminina; B, D e F – Resultados na prole masculina. N= 10 em todos os grupos. Sem diferenças significativas entre os grupos (ANOVA *Two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

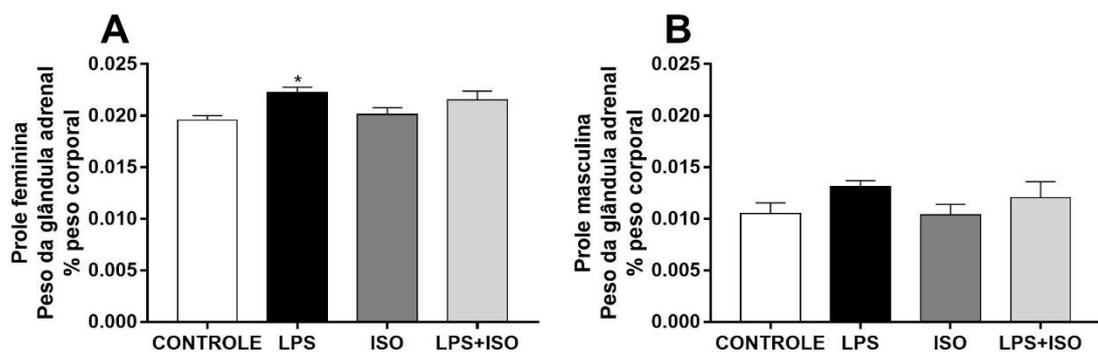
6.4.6 Peso da glândula adrenal

Os resultados da avaliação da porcentagem do peso corporal representada pela glândula adrenal estão apresentados na Figura 35. Para a análise foi utilizada ANOVA *two-way* seguida pelo pós-teste de *Turkey*.

A exposição gestacional ao LPS teve efeito significativo sobre o peso da glândula na prole feminina ($p = 0,0035$), tendo o grupo LPS apresentado aumento na porcentagem do peso corporal representada pela adrenal ($p = 0,0294$ comparado ao grupo Controle). Essa alteração não foi observada no grupo LPS+ISO ($p = 0,1697$ comparado ao grupo Controle), porém, não foi identificada interação entre a exposição ao LPS e o isolamento ($p = 0,3237$). Na prole masculina não foi observado efeito do tratamento ou do isolamento ($p > 0,05$).

A figura 36 apresenta a comparação entre o peso da glândula adrenal esquerda na prole masculina e na prole feminina. A análise de variância de três vias (ANOVA *Three-way*) indicou que o sexo da prole teve efeito sobre os resultados ($p < 0,0001$), porém não foi observada interação entre a exposição ao LPS e o sexo ($p = 0,8896$). O pós-teste indicou que a adrenal da prole feminina representou uma porcentagem significativamente maior do peso corporal quando comparado aos machos em todos os grupos analisados ($p < 0,0001$).

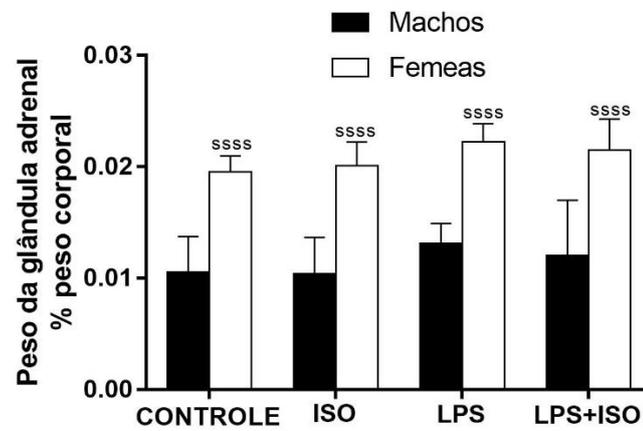
Figura 35 – Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental no peso da glândula adrenal na prole masculina e feminina.



Nota: Efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental no peso da glândula adrenal na prole masculina e feminina. A – Resultados na prole feminina; B – Resultados na prole masculina. N=10 em todos os grupos. * $p = 0,0294$ comparado ao grupo controle (ANOVA *Two-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média \pm erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

Figura 36 – Comparação dos efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental no peso da glândula adrenal na prole masculina e na feminina.



Nota: Comparação dos efeitos da administração de LPS no período gestacional e do empobrecimento ambiental no peso da glândula adrenal na prole masculina e na feminina. N=10 em todos os grupos. ^{SSSS}p < 0,0001 comparado à prole masculina do mesmo grupo (ANOVA *Three-way* seguido pelo pós-teste de *Turkey*). Valores representados em média ± erro padrão da média.

Fonte: Da autora.

7 DISCUSSÃO

7.1 COMPORTAMENTO DOENTIO MATERNO

Os resultados mostraram que as ratas gestantes apresentaram redução da mobilidade duas horas após a administração de LPS e redução do consumo de alimentos e do peso corporal nas 24 horas subsequentes à administração.

O comportamento doentio desencadeado pela administração de LPS está bem documentado na literatura (SAH et al, 2011; KOPF et al, 2010; OGIMOTO; HARRIS; WISSE, 2006). Esse padrão de comportamento é o resultado da neuroinflamação provocada pela liberação de citocinas inflamatórias (KELLEY et al, 2003; DANTZER, 2001), em especial IL-6, IL-1 β (HARDEN et al, 2011) e TNF α (D'MELLO; LE; SWAIN, 2009), se constituindo, portanto, um importante indicador de que ocorreram alterações no sistema imunológico materno.

Alguns estudos já estabeleceram o papel dessas citocinas na indução do TEA através do modelo de ativação do sistema imunológico materno. Ashdown et al (2006) avaliaram a alteração imunológica em ratas gestantes e nos fetos após a administração de LPS e relataram elevação significativa de IL-6, IL-1 β e TNF α nos tecidos maternos e na placenta, e elevação de IL-1 β no plasma fetal.

Outros trabalhos relataram resultados semelhantes. Beloosesky et al (2006) avaliaram a resposta imune desencadeada pela administração de LPS em ratas gestantes e encontraram aumento significativo na secreção de IL-6, bem como aumento de IL-6 no fluido amniótico. Toyama et al (2015) avaliaram camundongos gestantes após administração de LPS e relataram elevação de IL-1 β e TNF α no líquido amniótico.

O'Loughlin et al (2017) avaliaram a expressão de IL-6, IL-1 β e TNF α no cérebro fetal após administração de LPS em camundongos gestantes e encontraram aumento significativo 4 horas após a administração, com manutenção da alteração até o dia do nascimento dos filhotes. Além disso, na amígdala, a expressão dessas citocinas se manteve aumentada até o 40º dia de vida da prole, bem como houve aumento na expressão de receptores *toll-like* nessa região.

Smith et al (2007) demonstraram a relação entre a IL-6 e os prejuízos sociais na prole adulta. Os autores analisaram o comportamento social da prole de camundongos submetidos à administração gestacional de PolyI:C e relataram que a administração conjunta de um antagonista da IL-6 preveniu os prejuízos sociais provocados pela ativação do sistema imune materno. O mesmo resultado foi observado na prole de camundongos *knockout* para IL-6.

Carpentier, Dingman e Palmer (2011) analisaram o papel do TNF α nas alterações fetais provocadas pela ativação do sistema imune materno, utilizando camundongos gestantes *knockout* para o receptor de TNF α (TNFR1). De acordo com os autores, na prole dos animais que não possuíam o receptor não foram observados hipóxia e prejuízos da neuroproliferação, como observado nos animais que possuíam o receptor.

Esses dados indicam que as citocinas responsáveis pela mediação do comportamento doentio são capazes de alterar o ambiente fetal, de maneira que a anorexia e a redução da mobilidade materna são também indicadores de que a prole foi exposta à alteração imunológica capaz de induzir prejuízos do neurodesenvolvimento.

7.2 EFEITOS GERAIS DA ADMINISTRAÇÃO DE LPS NO PERÍODO GESTACIONAL E DO EMPOBRECIMENTO AMBIENTAL NO PESO E TAMANHO DAS NINHADAS

A literatura pesquisada apresenta resultados divergentes com relação ao efeito da ativação do sistema imune materno sobre o tamanho da ninhada e o peso dos filhotes.

Diversos trabalhos relataram que a exposição gestacional ao LPS levou a redução das ninhadas, com menor número de filhotes (ZAVAN et al, 2015; LOPEZ et al, 2014; CHESTER; DEMAS, 2013).

Com relação ao peso da prole, alguns trabalhos (BALLENDINE et al, 2015; ZAVAN et al, 2015) apontaram que a ativação do sistema imune materno levou à redução da ninhada, sem provocar alterações no peso do filhote. Já Vohees et al (2012) analisaram a prole exposta a PolyI:C no período gestacional e relataram que não houve alterações no tamanho da ninhada nem no peso dos filhotes. Por outro lado, French, Chester e Demas (2013) avaliaram a prole de hamsters siberianos expostos ao LPS no período gestacional e apontam que houve redução do número de filhotes e da massa corporal das ninhadas.

Bakos et al (2006) avaliaram a prole de ratas submetidas à administração de LPS durante a gestação e relataram que não houve alterações no peso das ninhadas no nascimento, porém, a partir do DPN14 foi observada uma redução significativa no crescimento, com manutenção dessa alteração até o último registro do peso no DPN 21. Contrastando a esses resultados, dois estudos (WEI; LI; ZHOU, 2007; NILSSON et al, 2001) apontaram elevação do consumo de alimentos, aumento do tecido adiposo, do peso corporal e da quantidade de leptina circulante na prole masculina exposta ao LPS no período gestacional.

Neste trabalho a exposição pré-natal ao LPS levou a redução do tamanho e do peso da ninhada apenas na prole das ratas responsivas ao LPS. Após a padronização, não foram encontradas alterações no peso das ninhadas em nenhum dos dias de pesagem.

Um estudo prévio realizado neste laboratório (VIEIRA, 2017) demonstrou que o efeito do LPS na prole é dose-dependente, uma vez que foi observada redução tanto no tamanho quanto no peso das ninhadas na dose de 500 μ g/kg, e não na dose de 100 μ g/kg. Os dados obtidos neste trabalho apontam que, além da dose do agente imunoestimulador, as alterações gerais nas ninhadas podem estar relacionadas também à sensibilidade individual dos animais gestantes ao LPS.

Foram encontrados na literatura três trabalhos que procuraram esclarecer o papel da sensibilidade materna ao desafio imunológico nas alterações causadas na prole.

Bronson et al (2011) avaliaram a prole de camundongos que ganharam peso e que perderam peso nas 24 horas subseqüentes a administração de PolyI:C. De acordo com os autores 52% dos animais perderam peso, e a perda de peso materna esteve relacionada à menor peso da prole feminina adulta e atenuação da resposta motora após administração de um antagonista do receptor NMDA e após a administração de anfetamina, independente do sexo da prole. Já o ganho de peso materno esteve relacionado a exacerbação da resposta motora na prole após administração de um antagonista do receptor NMDA. Os autores discutiram ainda os fatores possivelmente envolvidos na variação da sensibilidade materna à PolyI:C e apontaram a idade materna e o isolamento durante a gestação.

Vorhees et al (2012) também analisaram os efeitos da alteração de peso materna na prole de ratas submetidas à administração gestacional de PolyI:C e encontraram resultados semelhantes, tendo a prole de animais que perderam peso apresentado hiperatividade após administração de um antagonista do receptor NMDA e após administração de anfetamina.

O trabalho de Missault et al (2014) teve por objetivo avaliar a produção de citocinas em ratas gestantes que perderam e que ganharam peso após administração de PolyI:C, bem como as alterações na prole. Os autores observaram que 57% dos animais perderam peso, e a perda de peso esteve relacionada ao aumento significativo de TNF α , que não foi observado nas ratas que ganharam peso. Com relação às alterações na prole, animais provenientes de ratas que perderam peso demonstraram redução significativa na preferência por sacarose quando comparados aos animais controle. Os autores concluíram que as alterações comportamentais na prole são, ao menos em parte, relacionadas a resposta individual materna ao desafio imunológico.

Diferente desses resultados, neste trabalho a perda de peso materna esteve relacionada a redução do tamanho e peso das ninhadas, mas não foram observados efeitos sobre o comportamento da prole. Esse resultado pode estar relacionado ao agente causador do desafio imunológico, uma vez que todos os trabalhos prévios reportados na literatura utilizaram PolyI:C e não lipopolissacarídeo, à diversidade no dia gestacional de administração, bem como ao número de fêmeas responsivas obtidas neste estudo, que foi insuficiente para a obtenção de resultados estatísticos.

A despeito, porém, de os trabalhos terem utilizado agentes imunoestimuladores diferentes, a taxa de animais responsivos ao desafio imunológico foi semelhante, uma vez que neste trabalho foi observado que 55% dos animais perderam peso, e os trabalhos prévios reportaram taxas de 52% e 57%.

Com relação aos efeitos do isolamento precoce sobre o peso das ninhadas, a literatura pesquisada apresenta resultados divergentes. Alguns trabalhos (AMOS-KROOHS et al, 2016; YU et al, 2011; GUSTAFSSON et al, 2008; ZIMMERBER; ROSENTHAL; STARK, 2003; MCINTOSH; ANISMAN e MERALI, 1999) apontam que o isolamento neonatal está relacionado à redução do peso corporal. Outros estudos (SOLAS et al, 2010; RYU et al, 2009; WEISS et al, 2001) não encontraram diferenças significativas no peso corporal de animais isolados e não isolados. Já Vargas et al (2016) estudaram o peso e o metabolismo de ratos submetidos ao isolamento precoce e relataram que a separação materna esteve relacionada com aumento do ganho de peso e elevação dos níveis plasmáticos de glicose.

Neste trabalho o empobrecimento ambiental por isolamento não foi associado a qualquer alteração no peso das ninhadas, independente do tratamento. Esse dado indica que o protocolo de isolamento utilizado não causou prejuízos na alimentação dos animais lactentes. Esse resultado é de importância crítica, uma vez que a alteração na nutrição nas primeiras semanas de vida é capaz de alterar o neurodesenvolvimento (SCHNEIDER et al, 2018; DEONI et al, 2017), podendo interferir nos resultados dos testes comportamentais subsequentes.

Os resultados conflitantes encontrados na literatura pesquisada podem se dever a diversas razões, como a diversidade de linhagens de roedores utilizadas nos estudos, diferenças no tempo de duração do isolamento diário, no número total de dias de isolamento, e se o peso das ninhadas foi registrado em conjunto ou com separação por sexo, uma vez que os efeitos do isolamento podem apresentar diferenças sexuais (HENSLEIGHT; PRITCHARD, 2015). Neste trabalho, o registro do peso das ninhadas foi realizado em conjunto, sem separação da prole feminina e masculina, o que se constitui uma das limitações desse estudo, uma vez que não foi possível verificar se houveram diferenças relacionadas ao sexo.

7.3 COMPORTAMENTO MATERNO

Comportamento parental pode ser definido como um padrão de comportamento de indivíduos maduros de uma espécie, que objetiva garantir a sobrevivência dos filhotes até a maturidade. Como em mamíferos a mãe é a provedora primária do cuidado da prole, esse padrão de comportamento é chamado de comportamento materno (NUMAN; INSEL, 2003). Os cuidados prestados pela mãe têm um papel no neurodesenvolvimento dos filhotes, podendo a qualidade do cuidado impactar significativamente a resposta ao estresse (PRIEBE et al, 2006; FRANCIS et al, 1999) e o desenvolvimento emocional e cognitivo da prole (KAFFMAN; MEANEY, 2007).

Diversos estudos relataram alterações no comportamento materno causadas por estresse durante a gestação. Champagne e Meaney (2006) avaliaram o comportamento de ratas submetidas a sessões de restrição física durante os últimos sete dias da gestação e relataram redução nos comportamentos de lambar o filhote e *self groomig* nos primeiros seis dias após o parto. Meek et al (2001) avaliaram o comportamento materno de camundongos fêmeas expostas ao calor e à luz brilhante durante a gestação e relataram alterações no cuidado dos filhotes nos primeiros quatro dias após o parto.

A literatura apresenta alguns trabalhos que estudaram os efeitos da ativação imune materna durante a gestação sobre o comportamento materno.

Bernardi et al (2010) avaliaram o comportamento de ratas submetidas à administração de LPS no final da gestação (DG 21), e Soto et al (2013) avaliaram ratas submetidas ao LPS no início da gestação (DG 9). Nos dois trabalhos a avaliação do comportamento materno foi feita de maneira aguda, no 6º DL, e em ambos os estudos foi observada redução significativa do comportamento materno total.

Um trabalho prévio realizado neste laboratório (VIEIRA, 2017) encontrou resultados diferentes, com aumento do comportamento materno total no grupo de fêmeas submetidas à administração gestacional de LPS.

Dois trabalhos (BERGER et al, 2018; RONOVSKY et al, 2017) avaliaram o comportamento materno entre os dias de lactação 1 e 6 em camundongos fêmeas submetidas à administração gestacional de PolyI:C, e apontaram que a ativação do sistema imune materno esteve relacionada a redução do comportamento de lambar a prole e aumento do comportamento de construção do ninho. Em ambos os trabalhos os autores avaliaram também

o comportamento materno da prole (F1) e relataram que esse padrão de comportamento foi transmitido para a geração seguinte.

Divergindo desses resultados, Moraes et al (2018) também avaliaram o comportamento materno de camundongos fêmeas submetidas à administração gestacional de PolyI:C no 6º dia de lactação e relataram que a ativação do sistema imune durante a gestação não teve efeito sobre o cuidado materno.

Com relação ao isolamento da prole, a literatura apresenta resultados conflitantes. Orso et al (2018) avaliaram o comportamento materno de camundongos expostas ao isolamento da prole por 180 minutos diários entre os dias de lactação 2 e 7. A avaliação foi feita por 6 dias e os autores apontaram que a separação materna não provocou alterações no comportamento materno total.

Por outro lado, Zimmerberg, Rosenthal e Stark (2003) analisaram os efeitos do isolamento da prole no comportamento materno agudo de ratas. A avaliação foi consistiu em uma análise com duração de 5 minutos e de acordo com os autores, o isolamento neonatal por três ou seis horas por cinco dias consecutivos foi capaz de alterar o comportamento das mães, com aumento de comportamentos como lambe os filhotes e *self grooming*.

Um trabalho (BOERO et al, 2018) estudou os efeitos sobre o comportamento materno do estresse pré-natal (passagem de cânula intragástrica) combinado com o isolamento da prole por 3 horas diárias entre o DL 3 e 15. A avaliação do comportamento materno foi feita 4 vezes ao dia, durante 75 minutos por 18 dias. De acordo com os autores, a associação entre o estresse gestacional e a separação materna reduziram significativamente os comportamentos de cifo e lambe os filhotes.

Em contraste a esses resultados, neste trabalho não foram encontradas diferenças significativas no comportamento materno, relacionadas à ativação o sistema imune materno durante o período gestacional, ao isolamento da prole e ainda à combinação dos dois fatores. No presente estudo, a avaliação do comportamento materno foi realizada de maneira crônica, com duas observações diárias de 90 minutos durante 19 dias. Excetuando-se o trabalho de Boero et al (2018), todos os outros estudos encontrados na literatura foram realizados com a avaliação aguda do comportamento materno, ou, nos casos em que foi feita a avaliação crônica, essa foi realizada no período máximo de 7 dias. Assim, a diversidade nos protocolos experimentais utilizados pode estar relacionada à divergência nos resultados.

Foi observada também diversidade na linhagem de roedor utilizada, no agente imunoestimulador utilizado, bem como no dia da gestação em que foi realizada a administração, outros fatores que podem estar ligados à variabilidade nos resultados.

Estudos retrospectivos com humanos têm suportado a existência de um pódro de sintomas no TEA, em que a criança portadora do transtorno evoca menor interação com seus cuidadores (CHAWARSKA; MACARI; SHIC, 2013; JONES; KLIN, 2013; ELSABBAGH et al, 2012), podendo se traduzir em menor cuidado ou cuidado atípico, o que contribuiria para o desenvolvimento do fenótipo autista (GREEN et al, 2015; MANDY; LAI, 2016).

Nesse sentido, o objetivo principal de investigar o comportamento materno foi esclarecer se o modelo animal utilizado é capaz de mimetizar essa característica. Os dados obtidos neste trabalho indicam que, se os animais evocaram menor interação materna, isso não se traduziu em prejuízos no comportamento materno, de maneira que as alterações comportamentais observadas na prole não são resultado de menor interação materna ou interação atípica.

7.4 EXPERIMENTOS REALIZADOS COM A PROLE NA INFÂNCIA, ADOLESCENCIA E VIDA ADULTA.

Prejuízos na comunicação e no domínio da interação social, em conjunto com alterações na flexibilidade comportamental, constituem as principais características do fenótipo autista (GOH; PETERSON, 2011). A literatura apresenta uma série de trabalhos que exploram essas alterações em ratos submetidos à modelos de TEA.

Em relação à comunicação, a vocalização ultrassônica é o teste comumente utilizado para avaliar possíveis prejuízos nesse domínio (HARMON et al, 2008). A literatura indica que animais submetidos ao modelo de indução do TEA por exposição gestacional ao ácido valpróico apresentam redução no número de vocalizações (CEZAR et al, 2018; SERVADIO et al, 2016; GANDAL et al, 2010), demonstrando que esse modelo é capaz de mimetizar os déficits na comunicação observado no transtorno em humanos.

Alguns trabalhos estudaram a vocalização ultrassônica no modelo de ativação do sistema imune materno, porém, os resultados divergem. Kirsten et al (2012) avaliaram por 5 minutos o número de vocalizações emitidas por filhotes submetidos à exposição gestacional ao LPS no 11º DPN e encontraram redução significativa. Malkova et al (2012) avaliaram a prole de camundongos submetidas à administração gestacional de PolyI:C e relataram resultados semelhantes.

Já Baharnoori, Bhardwaj e Srivastava (2010), que analisaram a comunicação de ratos expostos ao LPS no período gestacional encontraram redução no número de vocalizações até o 6º DPN, porém, essa alteração não se manteve, de maneira que no 11º DPN não foram

observadas alterações entre o grupo que recebeu LPS e o grupo controle. Em concordância a esses resultados, Kirsten et al (2015) avaliaram a comunicação da prole submetida ao LPS gestacional e também não encontraram alterações no número de vocalizações no 11º DPN. Entretanto, os autores relataram diferenças significativas no padrão de comunicação, com aumento na duração dos intervalos entre as vocalizações.

Com relação ao isolamento, os resultados também são conflitantes. Yu et al (2011) avaliaram os efeitos do isolamento por 3 horas diárias entre o DPN 1 e 13 sobre filhotes de ratas e relataram redução significativa do número de vocalizações no 11º DPN. Por outro lado, Yin et al (2016), estudaram camundongos isolados por 3 ou 6 horas diárias entre o DPN 1 e 14 e observaram aumento significativo do número de vocalizações no 1º, 3º, 7º e 8º DPN. Esses resultados porém não se mantiveram, de maneira que no PND 14 não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos isolados e não isolados.

Neste trabalho, a administração gestacional de LPS, o empobrecimento ambiental por isolamento e ainda a combinação dos dois fatores não provocaram alterações no número de vocalizações. É necessário ressaltar que neste estudo foi verificado o número de vocalizações, sem análise do padrão em que os animais vocalizam.

O uso de diferentes doses de LPS e a administração em dias gestacionais diferentes são fatores que podem estar relacionados à variabilidade nos resultados encontrados. Outra variável é o próprio protocolo experimental utilizado, uma vez que os trabalhos prévios encontrados na literatura apresentam diferenças no tempo de isolamento do filhote antes do teste e no tempo de registro das vocalizações. Assim, novos estudos são necessários para esclarecer se o modelo de indução ao TEA pela administração de LPS na dose 500µg/kg no 16º DG é capaz de mimetizar alterações na comunicação detectáveis pelo teste de vocalização ultrassônica.

O domínio da interação social foi analisado utilizando três testes diferentes: o teste de preferência pelo odor do ninho (*Homing response*), o teste do comportamento de brincar (*Play behavior*) e o teste de interação social.

A capacidade de reconhecimento e preferência pelo odor do ninho é um indicador da motivação social em roedores (SCHNEIDER; PRZEWLOCKI, 2005) utilizado em diversos modelos animais de TEA.

De acordo com Servadio et al (2016) a prole masculina de animais submetidos a administração gestacional de ácido valpróico apresentaram maior tempo de latência para alcançar a área da maravalha do ninho e permaneceram menos tempo nessa área. Batista, Giusti-Paiva e Vilela (2018) avaliaram animais submetidos à um modelo de indução do TEA por restrição proteica materna no período gestacional e também relataram aumento no tempo de

latência e redução do tempo na área da maravalha do ninho, tanto na prole masculina quanto na prole feminina.

A literatura apresenta alguns estudos de preferência pelo odor do ninho no modelo de ativação imune materna. Foley et al (2014) avaliaram a motivação pela busca do ninho na prole de ratas submetidas a administração gestacional de ácido valpróico ou LPS, e relataram aumento na latência para encontrar o ninho na prole exposta ao ácido valpróico, independente de sexo. Entretanto, a prole exposta ao LPS pré-natal não apresentou alterações na latência para encontrar o ninho.

Em contraste a esses resultados, Penteadó et al (2014) investigaram a preferência pelo odor materno na prole masculina da segunda geração de ratas submetidas à administração de LPS durante a gestação e relataram redução no tempo despedido na maravalha com odor materno, indicando redução transgeracional na motivação social desses animais. Allarde et al (2017) avaliaram a prole de ratas submetidas à administração de *Streptococcus* do grupo B durante a gestação e observaram elevação no tempo de latência para alcançar a fonte de odor do ninho na prole masculina, mas não na feminina. Um estudo prévio realizado neste laboratório (VIEIRA, 2017), avaliou a prole submetida ao LPS no período gestacional e encontrou os mesmos resultados.

Corroborando com esses dados, neste trabalho a prole masculina exposta ao LPS gestacional demonstrou aumento na latência para alcançar a maravalha materna, enquanto na prole feminina não foram observadas alterações, confirmando que o modelo utilizado é capaz de reduzir a motivação social apenas na prole masculina, e portanto, confirmando também a existência de uma dependência sexual nesse prejuízo.

O teste do comportamento de brincar, utilizado para avaliar a performance social de animais adolescentes (TERRANOVA; LAVIOLA, 2005) foi amplamente utilizado para analisar os prejuízos sociais da prole masculina adolescente no modelo de TEA por exposição ao ácido valpróico, com resultados divergentes. Alguns estudos relataram redução no comportamento social (CEZAR et al, 2018; BERTELSEN et al, 2017; AHN et al, 2014; WANG et al, 2013) ou alteração no padrão do comportamento de brincar (RAZA et al, 2015), em um trabalho não foram observadas alterações significativas (WELLMAN; VARLINSKAYA; MOONEY, 2014) e um estudo indicou aumento na sociabilidade (COHEN et al, 2013).

Alguns estudos investigaram o comportamento de brincar no modelo de ativação do sistema imune materno. O comportamento social no modelo de exposição gestacional ao LPS foi investigado na prole masculina por Kirsten et al (2010 e 2015) e na prole feminina por Kirsten et al (2012). Esses trabalhos indicaram redução significativa na sociabilidade da prole

masculina, sem alterações na prole feminina. Um estudo prévio realizado neste laboratório (VIEIRA, 2017) também analisou a prole exposta ao LPS no período gestacional e obteve resultados semelhantes, com prejuízos na sociabilidade apenas na prole masculina, demonstrando que, assim como na preferência pelo odor do ninho, os prejuízos no comportamento de brincar nesse modelo também apresentam dependência sexual.

Em conformidade com esses achados, neste trabalho foi observada uma tendência a redução na frequência de comportamentos sociais na prole masculina exposta ao LPS e não na feminina, entretanto, esse resultado não foi estatisticamente significativo ($p=0,0560$).

De acordo com Kirsten et al (2010 e 2015) os prejuízos sociais observados na prole masculina exposta ao LPS gestacional no teste do comportamento de brincar foram mantidos até a idade adulta, demonstrado pela redução do comportamento social no teste de interação social. Assim, neste trabalho também foi utilizado o teste de interação social para verificar se o padrão de sociabilidade observado no teste do comportamento de brincar se manteria até a idade adulta.

Diferente do esperado, os resultados mostraram que na vida adulta, a prole masculina exposta ao LPS demonstrou aumento no comportamento social, com elevação significativa na frequência de *pouncing*. Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos por Harvey e Boska (2014). Os autores também avaliaram a prole masculina exposta ao LPS gestacional e relataram aumento significativo no comportamento social na idade adulta.

Aavani et al (2015) encontraram resultados semelhantes. Os autores estudaram sociabilidade da prole de camundongos exposta à administração gestacional de Poly:IC e relataram que enquanto na adolescência tanto a prole masculina como a prole feminina apresentaram redução significativa, na vida adulta esse resultado não se manteve, com os dados mostrando inclusive uma tendência de aumento na prole masculina.

Esses dados indicam que em vez da simples redução na sociabilidade, a prole masculina submetida ao modelo de ativação do sistema imune materno pode desenvolver um desajuste social, no qual na infância os animais apresentam redução do comportamento normal de brincar, e na idade adulta apresentam um comportamento social inapropriado.

Em contraste aos estudos anteriores que indicaram alterações na sociabilidade na idade adulta apenas na prole masculina, neste trabalho o teste de interação social indicou redução da sociabilidade na prole feminina exposta ao LPS no período gestacional, com redução significativa no tempo de perseguição e tendência de redução nos comportamentos de *pouncing* e *pinning*.

Para avaliar a flexibilidade comportamental foram utilizados dois testes: teste da tábua-de-buracos e avaliação da frequência de *self grooming* no teste do campo aberto na prole adolescente e na prole adulta.

O teste da tábua-de-buracos é utilizado tanto para avaliar o comportamento exploratório, quanto é capaz de identificar comportamento repetitivo e estereotipado (MAKANJUOLA et al, 1977). Dois estudos utilizaram esse teste para avaliar o comportamento de animais submetidos ao modelo de autismo por exposição gestacional ao ácido valpróico, e encontraram redução no número de mergulhos nos buracos (KUMAR; SHARMA; SHARMA, 2015; BRINGAS et al, 2013). Por outro lado, estudos realizados com outros modelos relataram elevação, como no modelo de indução ao TEA por má-nutrição materna (BATISTA; GIUSTI-PAIVA; VILELA, 2018) e no modelo de indução por depleção do gene Shank2 (HA et al, 2016).

Vieira (2017) utilizou o teste no modelo de indução ao TEA por exposição gestacional ao LPS e relatou que não houveram diferenças estatisticamente significativas no número de mergulhos. Corroborando com esse resultado, e em contraste aos resultados encontrados em outros modelos animais, neste trabalho também não foram encontradas diferenças no comportamento dos animais no teste da tábua de buracos.

A análise do *self grooming* pode ser utilizada para verificar a existência de comportamentos repetitivos em modelos de TEA (KALUEFF et al, 2016). Kang e Kim (2015) e Du et al (2017) utilizaram a análise do tempo de *self grooming* para verificar a existência de prejuízos na flexibilidade comportamental em animais submetidos ao modelo de TEA por exposição gestacional ao ácido valproico e obtiveram resultados positivos.

No modelo de ativação do sistema imune materno, Kirsten e Bernardi (2017) avaliaram o tempo, a frequência e a microestrutura do *self grooming* na prole masculina de ratas submetidas ao LPS gestacional e relataram aumento significativo no tempo e na frequência, bem como alterações na microestrutura do comportamento, demonstrando que os animais apresentaram comportamento repetitivo, restrito e estereotipado. Zager, Menecier e Palermo-Neto (2012) também avaliaram o efeito da exposição gestacional ao LPS e relataram aumento no tempo do *self grooming* na prole de camundongos.

Em contraste a esses resultados, Schwartzer et al (2013) avaliaram a prole de camundongos submetidos à administração pré-natal de PolyI:C e não observaram alteração significativa no tempo do *self grooming*.

Neste trabalho não foram encontradas diferenças significativas na frequência de *self grooming* independente do sexo da prole. É necessário ressaltar, porém, algumas limitações desse estudo. Primeiro, foi realizada apenas a análise da frequência do comportamento,

diferente dos estudos prévios que analisaram outros parâmetros como o tempo de duração. Segundo, a duração do teste foi de 5 minutos, um tempo consideravelmente menor que nos estudos anteriores. E por fim, a gravação do teste foi realizada utilizando uma câmera de teto, o que se constitui em uma limitação na medida em que não permite perfeita visualização do comportamento. Assim, novos estudos são necessários para determinar se o modelo utilizado é capaz de reproduzir os prejuízos na flexibilidade comportamental observados no TEA.

Alterações neuropsiquiátricas são frequentemente observadas em associação ao TEA (DUARTE et al, 2016), sendo a ansiedade uma das mais prevalentes (WHITE et al, 2009). Assim, além dos três principais domínios afetados pelo transtorno, este estudo também teve por objetivo estudar a existência de comportamentos do tipo ansioso na prole. Para isso, foi utilizado o teste do labirinto em cruz elevado, extensivamente utilizado para estudos de ansiedade (DAWSON; TRICKLEBANK, 1995).

Estudos prévios indicam que o modelo de indução ao TEA por exposição gestacional ao ácido valpróico é capaz de provocar comportamentos do tipo ansioso na prole masculina, demonstrado pela redução do tempo despendido nos braços abertos no teste do labirinto elevado (YAMAGUCHI et al, 2017; SCHNEIDER et al, 2008).

Esse teste também foi utilizado para avaliar comportamentos do tipo-ansioso em animais submetidos ao modelo de ativação do sistema imune materno, com resultados divergentes.

Babri, Doosti e Salari (2014) e Depino (2015), que avaliaram a prole masculina submetida à exposição gestacional ao LPS, relataram redução no tempo despendido nos braços abertos. Hsueh et al (2017) utilizaram como parâmetro a frequência de alternância entre os braços abertos e fechados e observaram redução. Em contraste a esses resultados, Vuillermot et al (2017) e Wischhof et al (2015), que também avaliaram a prole masculina de animais submetidos ao LPS gestacional não encontraram alterações significativas no teste do labirinto em cruz elevado.

Neste trabalho também não foram encontradas alterações na prole masculina no teste do labirinto elevado, tanto na adolescência quanto na idade adulta. Entretanto, na prole feminina exposta ao LPS foi observada a redução significativa no tempo despendido nos braços fechados na adolescência e o aumento significativo na vida adulta, o que sugere que a ativação do sistema imune materno é capaz de provocar comportamento do tipo ansioso na prole feminina na idade adulta, mas não na prole masculina.

Estudos prévios na literatura encontraram os mesmos resultados. Wang et al (2010) avaliaram fêmeas adultas submetidas à exposição gestacional ao LPS e encontraram alterações

no teste do campo aberto, com maior número de cruzamentos e maior tempo na periferia do aparato, um padrão de comportamento que indica ansiedade. Wischhof et al (2015), utilizaram o labirinto em cruz elevado e também encontraram comportamento do tipo ansioso em fêmeas adultas expostas ao LPS pré-natal, com redução significativa do tempo nos braços abertos e aumento significativo do tempo nos braços fechados.

Esses resultados estão coerentes com a prevalência do transtorno da ansiedade em humanos, uma vez que mulheres apresentam um risco maior de desenvolvimento do transtorno em relação aos homens, bem como maior gravidade nos sintomas, maior cronicidade e maior prejuízo funcional (KINRYS; WYGANT, 2005). O fato de, neste trabalho, o comportamento do tipo ansioso ter sido observado apenas na prole feminina adulta, e não no início da adolescência, indica a possível participação do ciclo hormonal feminino no distúrbio de ansiedade, conforme já apontado na literatura (MORAGA-AMARO et al, 2018; LI; GRAHAM, 2017; MARQUES et al, 2016; MALENG; MILAD, 2015; MUELLER; GRISSON; DOHANICH, 2014; REDMOND, 1997).

Além das diferenças hormonais, trabalhos prévios indicam que existem diferenças no desenvolvimento pré e pós natal de machos e fêmeas, bem como diferenças sexuais na resposta ao estresse precoce, que podem contribuir para a compreensão da maior susceptibilidade de machos ao TEA e de fêmeas aos transtornos de humor, como a ansiedade (DAVIS; PFAFF, 2014). Essas diferenças incluem diferenças imunológicas entre placentas de fetos do sexo masculino e fetos do sexo feminino, com maior expressão de citocinas nas placentas de fetos femininos (CLIFTON; MURPHY, 2004), e a capacidade de modulação das vias de dopamina no cérebro de fetos masculinos exercida pelo gene SRY, cuja desregulação pode estar relacionada ao maior risco de transtornos do neurodesenvolvimento em machos (LOKE; HARLEY; LEE, 2015).

Além da ansiedade, este trabalho também se propôs a estudar se a ativação do sistema imune materno é capaz de alterar a resposta ao estresse, através da avaliação da glândula adrenal. Diversos estudos apontam que exposição ao estresse precoce é capaz de provocar alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (MANIAN; ANTONIADIS; MORRIS, 2014; TOFOLI et al, 2011; BRAASTAD, 1998; SANDMAN et al, 1997), porém, a literatura apresenta resultados divergentes com relação a correlação entre essas alterações no eixo HHA e alterações no peso da glândula adrenal.

Bakos et al (2014) avaliaram o peso da adrenal e a secreção de corticosterona da prole de ratas submetidas a administração gestacional de LPS e não encontraram alterações significativas. Os autores concluíram que embora o desafio imunológico precoce leve a

alterações comportamentais até a idade adulta, a secreção basal de hormônio na prole não é alterada.

Em contraste a esses resultados, Nilsson et al (2001) investigaram alterações no eixo HHA de ratos submetidos à exposição gestacional ao LPS e encontraram aumento no peso da glândula adrenal e aumento nos níveis basais de corticosterona. Lemaire et al (2000) em um estudo com a prole de ratas submetidas ao estresse gestacional por restrição física também observaram aumento do peso da glândula adrenal. Os autores concluíram que o estresse pré-natal leva a uma hiperatividade crônica do eixo HHA.

Neste trabalho, a exposição pré-natal ao LPS esteve relacionada ao aumento significativo no peso da glândula adrenal na prole feminina, mas não na masculina.

A literatura apresenta evidências de que o transtorno da ansiedade está relacionado com alterações no eixo HHA (FAVAVELLI et al, 2012; GRAEF; ZANGROSSI JUNIOR, 2010), e de acordo com File e Seth (2003), a redução da sociabilidade no teste de interação social é um indicador de ansiedade. Assim, em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho com a prole feminina adulta exposta ao LPS no período gestacional (prejuízos sociais no teste de interação social, aumento do tempo nos braços fechados no teste do labirinto em cruz elevado e aumento no peso da glândula adrenal) indicam que a exposição gestacional ao LPS na dose 500µg/kg no 16º dia de gestação pode ter implicações no desenvolvimento de um modelo animal de transtorno da ansiedade.

Neste trabalho, além da análise da glândula adrenal, também foi utilizado o teste de exposição ao odor de gato para avaliar a resposta ao estresse. Kirsten et al (2011) avaliaram a prole masculina de ratos submetidos à administração gestacional de LPS no teste do odor aversivo, e relataram que os animais exibiram menor ansiedade frente ao odor do predador do que os animais controle, com maior frequência de aproximações e maior tempo de contato com a fonte do odor. De acordo com os autores, entretanto, esse comportamento pode não ser devido à redução da ansiedade, mas a uma redução da capacidade de reconhecer estímulos olfatórios, uma vez que foram observadas alterações neuroquímicas no bulbo olfatório desses animais.

Divergindo desses resultados, nesse trabalho tanto a prole feminina quanto a prole masculina exposta ao odor aversivo do predador se mostraram sensíveis ao estímulo olfatório, com redução do tempo de contato e do número de aproximações da fonte do odor e aumento do tempo de abrigo em relação ao grupo exposto ao odor neutro. Esses resultados mostram que no teste de preferência pelo odor do ninho, o aumento da latência para alcançar a fonte do odor se deve à redução da motivação social, e não a redução da capacidade de reconhecimento do estímulo olfatório.

É provável que esses resultados conflitantes estejam relacionados a diferença no dia gestacional de administração do LPS, e na dose utilizada, uma vez que intensidade da resposta inflamatória ao agente imunológico é dependente do período gestacional (AGUIAR-VALES; LUHESHI, 2011), e existem evidências de que as alterações comportamentais observadas na prole são dose-dependentes (VIEIRA, 2017).

Na segunda etapa do teste, foi avaliada a resposta ao contexto, com a reexposição dos animais ao mesmo aparato, porém, sem o odor aversivo do predador. Os resultados indicaram que tanto a prole masculina quanto a prole feminina exposta ao LPS gestacional apresentaram elevação significativa dos comportamentos de medo e ansiedade.

Esses dados estão alinhados com um estudo prévio do medo no modelo de exposição gestacional ao ácido valpróico (MAKRAM et al, 2009), que observou que animais submetidos a esse modelo de indução ao TEA não apresentaram alterações na etapa de aquisição do medo quando comparados aos controles, porém, na etapa de contexto houve aumento significativo na ansiedade, bem como atraso na extinção do medo.

Uma vez que a exacerbação da expressão de medo está relacionada tanto ao TEA (KANNER, 1943) quanto ao transtorno da ansiedade (CUTHBERT et al, 2003), os resultados obtidos neste teste, em conjunto com os outros resultados observados neste trabalho, sugerem que o aumento da expressão de medo esteja relacionado a mecanismos diferentes na prole masculina e na prole feminina, de maneira que na prole feminina podem estar relacionados ao aumento da ansiedade, e na prole masculina, ao TEA.

Trabalhos prévios que investigaram a expressão do medo em modelos de ativação do sistema imune materno apresentaram resultados divergentes. Sangha et al (2014) analisaram a prole de animais submetidos à administração de PolyI:C no período gestacional e relataram normalidade na aquisição do medo e aumento no medo condicionado. Por outro lado, outros estudos (LABOUESSE; LANGHANS; MEYER, 2015; ZUCKERMAN; WEINER, 2005) não encontraram diferenças significativas na expressão de medo entre animais submetidos ao modelo de PolyI:C durante a gestação e animais controle, e um estudo (VUILLERMOT et al, 2017) observou redução na expressão do medo e redução na aquisição do medo condicionado ao contexto em animais expostos a PolyI:C no período gestacional.

Em humanos, o TEA frequentemente se apresenta associado à prejuízos cognitivos (PAULA; BELISÁRIO-FILHO; TEIXEIRA, 2016; GOH; PETERSON, 2011). Uma série de trabalhos relataram alterações cognitivas e prejuízos na memória de animais submetidos ao modelo de ativação do sistema imune materno.

Coyle et al (2009) avaliaram a memória da prole de camundongos submetidos a administração gestacional de LPS através do teste de reconhecimento de objetos e relataram prejuízos na memória desses animais. Wischhof et al (2014) analisaram o comportamento da prole de ratas submetidas ao LPS durante a gestação e encontraram os mesmos resultados no teste de reconhecimento de objetos. Os autores concluíram que a exposição pré-natal ao LPS leva a déficits cognitivos na prole, e essas alterações se mantêm até a idade adulta.

O teste do labirinto aquático de Morris foi utilizado em alguns trabalhos que investigaram a prole de animais submetidos a administração de LPS no período gestacional (BATINIC et al, 2016; CHLODZINSKA et al, 2011; HAO et al, 2010), e os resultados indicam que o modelo é capaz de provocar prejuízos na aquisição de memória espacial e no aprendizado.

Em contraste à esses resultados, neste trabalho não foram encontradas alterações significativas em nenhum dos parâmetros analisados no teste do labirinto aquático na prole masculina. Na prole feminina, entretanto, os animais submetidos ao LPS no período pré-natal demonstraram maior tempo de latência para chegar ao local onde ficava posicionada a plataforma na etapa de treinos, entretanto, não houve diferença no tempo despendido no quadrante onde ficava a plataforma.

De maneira geral, chama a atenção a diversidade de resultados comportamentais encontrada nos estudos com o modelo de ativação do sistema imune materno nos mais variados testes. Conforme já apontado, os estudos também divergem na linhagem de animais utilizada, dia gestacional de administração do agente imunoestimulador, tipo de agente utilizado e dose, sendo essas variações as prováveis causas dos resultados conflitantes. Porém, dado a grande variação no fenótipo do TEA (SCHLIKMANN; FORTUNATO, 2013), a variação nos resultados encontrada no modelo animal pode ser um fator positivo, uma vez que se aproxima das características do transtorno em humanos.

A capacidade de modulação positiva do fenótipo do TEA pelo enriquecimento do ambiente pós-natal está bem documentada na literatura (BRENES et al, 2016; GARBUGINO; CENTOFANTE; D'AMATO, 2016; WOO et al, 2015; REYNOLDS; URRUELA; DEVINE, 2013; YANG et al, 2011), porém, não foram encontrados trabalhos que esclareçam se o empobrecimento ambiental pode modular negativamente o fenótipo quando associados a modelos de indução ao TEA.

Diversos estudos com animais relataram prejuízos provocados pelo isolamento social precoce, como disfunção endotelial e aumento do risco para doenças cardiovasculares (HO et al, 2016), aumento da susceptibilidade à ocorrência de eventos convulsivos (AMINI-KHOEI et al, 2015), prejuízos na cognição (GARCIA et al, 2013) e na memória (COUTO et al, 2012),

comportamento do tipo ansioso, do tipo depressivo e hiperatividade (GEORGE et al, 2010), alterações na morfologia neuronal (MONROY; HERNÁNDEZ-TORRES; FLORES, 2010), prejuízos na neurogênese e desordens sinápticas (WU et al, 2014) e hiperatividade do eixo HHA (VARGAS et al, 2016; AISA et al, 2017).

De fato, alguns estudos têm utilizado o isolamento social precoce como modelo de indução ao TEA em roedores, sendo capaz de provocar o padrão de comportamento característico do transtorno, com prejuízos na sociabilidade e comportamentos repetitivos, além de comportamento do tipo ansioso e do tipo depressivo (TAN et al, 2018; BAHI, 2016; WU et al, 2014).

Em contraste à esses resultados, neste trabalho o empobrecimento ambiental por isolamento não provocou alterações significativas em nenhum dos testes comportamentais realizados, independente do sexo da prole. Ainda mais surpreendentemente, o grupo de animais expostos ao LPS no período gestacional e submetidos ao isolamento não apresentou nenhuma das alterações apresentadas pelos animais expostos apenas ao LPS, com exceção apenas de um parâmetro na etapa de contexto do teste de exposição ao odor de gato na prole feminina.

Além disso, no teste de preferência pelo odor do ninho da prole masculina e no labirinto em cruz elevado realizado na idade adulta com a prole feminina, foi identificada interação significativa entre a administração de LPS e o isolamento, indicando que o isolamento foi capaz de prevenir os prejuízos associados à exposição gestação ao LPS.

Duas hipóteses podem explicar esses resultados. Primeiro, os animais submetidos ao isolamento foram manipulados duas vezes ao dia entre o 2º e o 16º DPN, quando eram colocados e quando eram retirados do aparato de isolamento. Já os animais não isolados foram manipulados apenas nos dias de realização de experimentos.

Os efeitos positivos da manipulação diária nas primeiras semanas de vida estão bem documentados na literatura, com melhora no aprendizado e memória espacial (DASKALAKIS et al, 2009), redução da ansiedade, da expressão de medo condicionado ao contexto (RIO-ÁLAMOS et al, 2015) e da resposta ao estresse (RAINEKI; LUCION; WEINBERG, 2014), reversão dos prejuízos comportamentais causados pela exposição gestacional ao álcool (HANNIGAN; O'LEARY-MOORE; BERMAN, 2007; LEE; RABE, 1999), reversão dos prejuízos na memória e cognição causados por exposição ao estresse pré-natal (ZHANG et al, 2012), melhora na memória e aprendizado após dano cerebral moderado (CHOU et al, 2001) e redução no comportamento do tipo-depressivo (COSTELA et al, 1995).

Nota-se que esses efeitos são opostos aos efeitos do isolamento neonatal, sendo, portanto, possível que a manipulação tenha prevenido o desenvolvimento das alterações provocadas pelo isolamento.

Além disso, existem evidências de que a manipulação precoce exerce efeito modulador no sistema imune. Bilbo et al (2007) analisaram ratos submetidos a administração neonatal de *Escherichia coli* e à manipulação diária entre o 4º e o 20º DPN. A manipulação consistiu na transferência do animal da caixa moradia para uma caixa individual, onde o animal permaneceu isolado por 15 minutos, após os quais foi novamente transferido para a caixa moradia. Na vida adulta, os animais foram submetidos à um desafio imunológico (administração de LPS). De acordo com os autores, a manipulação precoce foi capaz de prevenir o aumento na expressão e nos níveis de IL-1 β no cérebro após o desafio imunológico, bem como preveniu prejuízos na memória.

Assim, é possível que a manipulação diária dos animais no protocolo de isolamento tenha exercido um efeito modulador na neuroinflamação causada pela exposição gestacional ao LPS, impedindo o desenvolvimento de algumas alterações comportamentais observadas nos animais não isolados.

A segunda hipótese, é a chamada hipótese de incompatibilidade, ou *mismatch*, segundo a qual a exposição ao estresse durante as fases mais plásticas do desenvolvimento é capaz de provocar uma programação fisiológica, através de mecanismos adaptativos, para a sobrevivência do organismo em um ambiente posterior similar, ou seja, também de alto estresse. De acordo com essa hipótese, os distúrbios ocorreriam quando acontece uma incompatibilidade entre a programação fisiológica e o ambiente (NEDERHOF; SCHMIDT, 2012; SANTARELLI et al, 2014).

Santarelli et al (2014) realizaram um estudo objetivando testar a hipótese da incompatibilidade em um modelo de desordens neuropsiquiátricas. Os autores criaram ambientes de alto e baixo estresse neonatal, e ambientes de alto e baixo estresse na vida adulta. Os animais submetidos a condições compatíveis, de alto ou baixo estresse tanto neonatal quanto na vida adulta, apresentaram parâmetros comportamentais diferentes dos animais submetidos a condições incompatíveis. De acordo com os autores, esses resultados suportam a hipótese da incompatibilidade.

No modelo de indução ao TEA por exposição gestacional ao LPS, a prole em desenvolvimento é submetida a um ambiente pré-natal de alto estresse imunológico. O estresse induzido pelo isolamento provocaria então, um ambiente pós-natal compatível com o ambiente pré-natal, enquanto os animais expostos ao LPS gestacional, porém não isolados, encontrariam

um ambiente pós-natal de baixo estresse, incompatível com o ambiente pré-natal. A incompatibilidade seria, neste caso, o gatilho para o desenvolvimento do fenótipo do TEA.

É necessário ressaltar, porém, que essa hipótese não é capaz de explicar o motivo pelo qual os animais do grupo ISO não apresentaram prejuízos comportamentais. Além disso, os trabalhos prévios sobre essa hipótese se referem a compatibilidade ou incompatibilidade entre o ambiente pré e/ou neonatal e o ambiente do animal adulto, não a incompatibilidade entre o ambiente pré-natal e o ambiente neonatal.

Novos estudos são necessários, portanto, para identificar se uma das duas hipóteses pode ajudar a esclarecer a prevenção de alguns efeitos da exposição gestacional ao LPS pelo empobrecimento ambiental por isolamento, e a ausência de efeitos negativos do isolamento observada neste estudo.

8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que a administração de LPS na dose de 500 μ g/kg no 16º dia de gestação foi capaz de provocar o comportamento doentio materno. Os dados indicaram também a existência de diferenças na susceptibilidade individual ao LPS. A responsividade ao LPS esteve associada à redução do tamanho e peso das ninhadas, porém, novos estudos são necessários para determinar se existe relação entre a responsividade ao LPS e alterações no comportamento da prole.

Tanto a administração gestacional de LPS quanto o empobrecimento ambiental não provocaram alterações no comportamento materno, indicando que os prejuízos comportamentais observados na prole exposta ao LPS durante a gestação não são devidos à menor interação materna ou interação atípica.

Os resultados dos testes comportamentais mostraram um claro dimorfismo sexual nos efeitos da exposição prenatal ao LPS. Os dados sugerem que a exposição gestacional ao LPS é capaz de provocar comportamentos do tipo autista na prole masculina e comportamentos do tipo ansioso na prole feminina.

O empobrecimento ambiental por isolamento individualmente não esteve relacionado à alterações significativas no comportamento da prole, porém, quando associado a exposição gestacional ao LPS, foi capaz de prevenir alguns dos prejuízos comportamentais observados na prole exposta ao LPS.

Foram propostas duas hipóteses para explicar esse resultado: a hipótese de que a manipulação diária foi capaz de evitar os efeitos negativos e a hipótese de incompatibilidade. Novos estudos são necessários para esclarecer os mecanismos pelos quais o empobrecimento ambiental por isolamento foi capaz de prevenir alguns dos efeitos da exposição ao LPS no período pré-natal.

REFERENCIAS

- AGUIAR-VALLES, A.; LUHESHI, G. N. Alterations in cognitive function and behavioral response to amphetamine induced by prenatal inflammation are dependent on the stage of pregnancy. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, p. 634-648, 2011.
- AHN, Y. et al. The ketogenic diet modified social and metabolic alterations identified in the prenatal valproic acid model of autism spectrum disorder. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 36, n. 5, p. 371-380, 2014.
- AISA, B. et al. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, p. 256-266, 2007.
- AL-AMIN, M. et al. Astaxanthin ameliorates prenatal LPS-exposed behavioral deficits and oxidative stress in adult offspring. **BMC Neuroscience**, v. 17, n. 11, p. 1-10, 2016.
- ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. 4ª ed., Artmed: Porto Alegre: 2004.
- ALDO, P. B. et al. Trophoblast induces monocyte differentiation into CD14+/CD16+ macrophages. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 72, n. 3, p. 270-284, 2014.
- ALLARDE, M. et al. A sexually dichotomous, autistic-like phenotype is induced by group B *Streptococcus* maternofetal immune activation. **Autism Research**, v. 10, n. 2, p. 233-245, 2017.
- AMINI-KHOEI, H. et al. Experiencing neonatal maternal separation increased the seizure threshold in adult male mice: involvement of the opioid system. **Epilepsy & Behavior**, v. 52, p. 37-41, 2015.
- AMOS-KROOHS, R. M. et al. Developmental stress and lead (Pb): effects of maternal separation and/or Pb on corticosterone, monoamine, and blood Pb in rats. **Neurotoxicology**, v. 54, p. 22-33, 2016.
- ANDRADE, A. A.; TEODORO, M. L. M. Família e autismo: uma revisão de literatura. **Contextos Clínicos**, v. 5, n. 2, p. 133-142, 2012.
- APS – AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM 5. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. 5º ed. Artmed: Porto Alegre, 2014.
- ASHDOWN, H. et al. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 11, p. 47-55, 2006.

ASIAEI, M.; SOLATI, J.; SALARI, A. A. Prenatal exposure to LPS leads to long-lasting physiological consequences in male offspring. **Developmental Psychobiology**, v. 53, p. 828-838, 2011.

ATLADÓTIR, H. O. et al. Autism after infection, febrile episodes and antibiotic use during pregnancy: an exploratory study. **Pediatrics**, v. 130, n. 6, p. 1447-1456, 2012.

AUTISM SPEAKS. 2012 Annual report. Disponível em <
http://www.autismspeaks.org/sites/default/files/documents/autism_speaks_2012_annual_report.pdf> Acesso em 13 set. 2016.

AVANI, T. et al. Maternal immune activation produces cerebellar hyperplasia and alterations in motor and social behavior in male and female mice. **Cerebellum**, v. 14, n.5, p. 491-505, 2015.

BABRI, S.; DOOSTI, M.; SALARI, A. Strain-dependent effects of prenatal immune activation on anxiety- and depression-like behaviors in offspring. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 37, p. 164-176, 2014.

BAHARNOORI, M.; BHARDWAJ, S. K.; SRIVASTAVA, L. K. Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: a prenatal infection model for developmental neuropsychiatry disorders. **Schizophrenia Bulletin**, v. 38, n.3, p. 444-456, 2010.

BAHI, A. Sustained lentiviral-mediated overexpression of microRNA124a in the dentate gyrus exacerbates anxiety- and autism-like behaviors associated with neonatal isolation in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 311, p. 298-308, 2016.

BAKOS, J. et al. Prenatal immune challenge affects growth, behavior, and brain dopamine in offspring. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1018, p. 281-287, 2006.

BALE, T. L. et al. Early life programming and neurodevelopmental disorders. **Biological Psychiatry**, v. 68, p. 314-319, 2010.

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. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 57, p. 155-165, 2015.

BATINIC, B. et al. Lipopolysaccharide exposure during late embryogenesis results in diminished locomotor activity and amphetamine response in females and spatial cognition impairment in males in adult, but not adolescent rat offspring. **Behavioural Brain Research**, v. 299, p. 72-80, 2016.

BATISTA, T. H.; GIUSTI-PAIVA, A.; VILELA, F. C. Maternal protein malnutrition induces autism-like symptoms in rat offspring. **Nutritional Neuroscience**. Publicação online – Jan. 2018. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29375017>>. Acesso em: 21 fev. 2018.

BELOOSESKY, R. et al. N-acetyl-cysteine suppresses amniotic fluid and placenta inflammatory cytokine responses to lipopolysaccharide in rats. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 194, p. 268-273, 2006.

BERGER, S.; RONOVSKY, M.; HORVATH, O.; BERGER, A.; POLLAK, D. D. Impact of maternal immune activation on maternal care behavior, offspring emotionality and intergenerational transmission in C3H/He mice. **Brain, Behavior and Immunity**. Artigo aceito em fev. 2018. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29481858>>. Acesso em: 04 abr. 2018.

BERTELSEN, F. et al. Suppressed play behaviour and decreased oxytocin receptor binding in the amygdala after prenatal exposure to low-dose valproic acid. **Behavioural Pharmacology**, v. 28, n. 6, p. 450-457, 2017.

BILBO, S. D. et al. Differential effects of neonatal handling on early life infection-induced alterations in cognition in adulthood. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 21, p. 332-342, 2007.

BOERO, G. et al. Combined effect of gestational stress and postpartum stress on maternal care in rats. **Physiology and Behavior**, v. 184, p. 172-178, 2018.

BRAASTAD, B. O. Effects of prenatal stress on behaviour of offspring of laboratory and farmed mammals. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 61, p. 159-180, 1998.

BRENES, J. C. et al. Differential effects of social and physical environmental enrichment on brain plasticity, cognition, and ultrasonic communication in rats. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 542, p. 1586-1607, 2016.

BRINGAS, M. E. et al. Rearrangement of the dendritic morphology in limbic regions and altered exploratory behavior in a rat model of autism spectrum disorder. **Neuroscience**, v. 241, p. 170-187, 2013.

BRITO, A. R.; VASCONCELOS, M. M. Conversando sobre o autismo – reconhecimento precoce e possibilidades terapêuticas. In: CAMINHA, V. L.; HUGUENIN, J.; ASSIS, L. M.; ALVES, P. P. Autismo: **vivências e caminhos**. Edgar Blücher: São Paulo, 2016.

BRONSON, S. L. et al. Individual differences in maternal response to immune challenge predict offspring behavior: contribution of environmental factors. **Behavioural Brain Research**, v. 220, n.1, p. 55-64, 2011.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Estrutura celular. In: JAWETZ, E. **Jawetz, Melnick & Adelberg Microbiologia médica**. 21^a ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.

BROWN, A. S. et al. Maternal exposure to respiratory infections and adult schizophrenia spectrum disorders: a prospective birth cohort study. **Schizophrenia Bulletin**, v. 26, n.2, p. 287-295, 2000.

BUKA, S. L. et al. Maternal infection and subsequent psychosis among offspring. **Archives of General Psychiatry**, v. 58, n.11, p. 1032-1037, 2001.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. What is the placenta? **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 213, Supl.4, p. 1-8, 2015.

CALABRESEC, V. et al. Hormesis, cellular stress response, and redox homeostasis in autism spectrum disorders. **Journal of Neuroscience Research**. Manuscript accepted in August 2016. Available at:
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jnr.23893/abstract;jsessionid=8A6687460F77163A932CACA4F93C2D48.f01t04>> Accessed on 15 September 2017.

CARPENTIER, P. A.; DINGMAN, A. L.; PALMER, T. D. Placental TNF- α signaling in illness-induced complications of pregnancy. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n.6, p. 2802-2810, 2011.

CARVEY, P. M. et al. Prenatal exposure to the bacteriotoxin lipopolysaccharide leads to long-term losses of dopamine neurons in offspring: a potential new model of Parkinson's disease. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, p. 826-837, 2003.

CEZAR, L. C. et al. Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. **Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. Manuscript accepted in February 2018. Available at <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027858461730859X?via%3Dihub>>
Accessed on 23 April 2018.

CHADMAN, K. K. Animal models for autism in 2017 and the consequential implications to drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n.12, p. 1187-1194, 2017.

CHAMPAGNE, F. A.; MEANEY, M. J. Stress during gestation alters postpartum maternal care and the development of the offspring in a rodent model. **Biological Psychiatry**, v. 59, p. 1227-1235, 2006.

CHAWARSKA, K.; MACARI, S.; SHIC, F. Decreased spontaneous attention to social scenes in 6-month-old infants later diagnosed with autism spectrum disorders. **Biological Psychiatry**, v. 74, n.3, p. 195-203, 2013.

CHLODZINSKA, N. et al. Lipopolysaccharide injected to pregnant mice affects behavior of their offspring in adulthood. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 71, n.4, p. 519-527, 2011.

CHOCYK, A. et al. Early-life stress increases the survival of midbrain neurons during postnatal development and enhances reward-related and anxiolytic-like behaviors in a sex-dependent fashion. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 44, p. 33-47, 2015.

CHOMIAK, T.; TURNER, N.; HU, B. What we have learned about autism spectrum disorder from valproic acid. **Pathology Research International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

CHOU, I. et al. Behavioral/environmental intervention improves learning after cerebral hypoxia-Ischemia in rats. **Stroke**, v. 32, p. 2192-2197, 2001.

CHRISTENSEN, J. et al. Prenatal valproat exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. **Journal of the American Medical Association**, v. 309, n.16, p. 1696-1703, 2013.

CLIFTON, V. L.; MURPHY, V. E. Maternal asthma as a model for examine sex-specific on maternal physiology and placental mechanisms that regulate human fetal growth. **Placenta**, v. 18, p. 45-52, 2004.

COHEN, O. S. et al. Acute prenatal exposure to a moderate dose of valproic acid increases social behavior and alters gene expression in rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 31, n.8, p. 740-750, 2013.

CONCEIÇÃO, I. et al. Variantes genéticas estruturais numa população de indivíduos com Perturbações do Espectro do Autismo (PEA): caracterização genómica, heritabilidade e correlações clínicas. **Boletim Epidemiológico Observações**, vol.2, n.5, p. 10-13, 2013.

CONNOR, S. A. et al. Altered cortical dynamics and cognitive function upon haploinsufficiency of the autism-linked excitatory synaptic suppressor MGDA2. **Neuron**, vol.91, p. 1052-1068, 2016.

COSTA, H. H. V. C.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Continuous central infusion of cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases maternal care in lactating rats: consequences for fear conditioning in adult males. **Behavioral Brain Research**, v. 257, p. 31-38, 2013.

COSTELA, C. et al. Effect of neonatal handling on learned helplessness model of depression. **Physiology & Behavior**, v. 57, n.2, p. 407-410, 1995.

COUTO, F. S. et al. Escitalopram improves memory deficits induced by maternal separation in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 695, p. 71-75, 2012.

COYLE, P. et al. Maternal dietary zinc supplementation prevents aberrant behavior in a object recognition task in mice offspring exposed to LPS in early pregnancy. **Behavioural Brain Research**, v. 197, p. 210-218, 2009.

CRUZ, A. P. M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. In: LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; FUKUSIMA, S. **Métodos em Neurociência**. Manole: São Paulo, 2012.

CRUZ-MACHADO, S. S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFkB. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40-43, 2010.

CUTHBERT, B. N. et al. The psychophysiology of anxiety disorder: fear memory imagery. **Psychophysiology**, v. 40, n.3, p. 407-422, 2003.

CZERMAINSKI, F. R.; BOSA, C. A.; SALLES, J. F. Funções executivas em crianças e adolescentes com transtorno do espectro do autismo: uma revisão. **Psico**, v. 44, n.4, p. 518-525, 2013.

DAMIANI, D.; SOUSA, U. C. F.; DAMIANI, D. Neuroendócrino-imunomodulação: a complexa expressão das respostas integradas ao estresse. **Pediatria Moderna**, v. 42, n.3, p. 105-114, 2006.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? **Brain, Behavior and Immunity**, v. 15, p. 7-24, 2001.

DASKALAKIS, N. P. et al. Environmental and tactile stimulation modulates the neonatal handling effect on adult rat spatial memory. **International Journal of Neurodevelopmental Neuroscience**, v. 27, p. 747-755, 2009.

DAVIS, E. P.; PFAFF, D. Sexually dimorphic response to early adversity: implications for affective problems and autism spectrum disorder. **Psychoneuroendocrinology**, v. 49, n.1, p. 11-25, 2014.

DAWSON, G. R.; TRICKLEBANK, M. D. Use of elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. **Current Techniques**, v. 16, p. 33-36, 1995.

DEONI, S. et al. Early nutrition influences developmental myelination and cognition in infants and young children. **NeuroImage**. Manuscrito aceito em dez. 2017. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29277402>>. Acesso em 18 abr. 2018.

DEPINO, A. M. Early prenatal exposure to LPS results in anxiety-and-depression-related behaviors in adulthood. **Neuroscience**, v. 299, p. 56-65, 2015.

DEVERMAN, B. E.; PATTERSON, P. H. Cytokines and CNS development. **Neuron**, v. 64, Issue 1, p. 61-78, 2009.

D'MELLO, C.; LE, T.; SWAIN, M. G. Cerebral microglia recruits monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor α signaling during peripheral organ inflammation. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n.7, p. 2089-2102, 2009.

DOUKKALI, Z. et al. Evaluation of anxiolytic activity of methanolic extract of *urtica urens* in a mice model. **Behavioral and Brain functions**, v. 11, n.19, p. 1-5, 2015.

DU, L. et al. Behavioral improvements in a valproic acid rat model of autism following vitamin D supplementation. **Psychiatry Research**, v. 253, p. 28-32, 2017.

DUARTE, C. P. et al. Diagnóstico e prevenção precoce do transtorno do espectro do autismo: relato de um caso. In: CAMINHA, V. L. et al. **Autismo: vivências e caminhos**. Edgar Blücher: São Paulo, 2016.

ELSABBAGH, M. et al. Infant neuronal sensitivity to dynamic eye gaze is associated with later emerging autism. **Current Biology**, v. 22, n.4, p. 338-342, 2012.

ENAYATI, M. et al. Maternal infection during late pregnancy increases anxiety-like and depression-like behaviors with increasing age in male offspring. **Brain Research Bulletin**, v. 87, p. 295-302, 2012.

ESTES, M. L.; MCALLISTER, K. Maternal immune activation: implications for neuropsychiatric disorders. **Science**, v. 353, n.6301, p. 772-777, 2017.

FARAVELLI, C. et al. The role of life events and HPA axis in anxiety disorder: a review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, p. 5663-5674, 2012.

FATEMI, S. H. et al. Maternal infection leads to abnormal gene regulation and brain atrophy in mouse offspring: implications for genesis of neurodevelopmental disorders. **Schizophrenia Research**, v. 99, p. 56-70, 2008.

FILE, S. E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 35-53, 2003.

FLORES-PAJOT, M. C. et al. Childhood autism spectrum disorders and exposure to nitrogen dioxide and particulate matter air pollution: a review and meta-analysis. **Environmental Research**, v. 151, 2016.

- FOLEY, K. A. et al. Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to propionic acid and lipopolysaccharide on social behavior in neonatal, adolescent and adult rats: implications for autism spectrum disorders. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 39, p. 68-78, 2014.
- FONE, K. C. F.; PORKESS, M. V. Behavioral and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents – relevance to developmental neuropsychiatric disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, p. 1087-1102, 2008.
- FRANCIS, D. et al. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. **Science**, v. 286, p. 1155-1158, 1999.
- FRENCH, S. S.; CHESTER, E. M.; DEMAS, G. E. Maternal immune activation affects litter size success, size and neuroendocrine responses related to behavior in adult offspring. **Physiology & Behavior**, v. 119, p. 175-184, 2013.
- GANDAL, M. J. et al. Validating gamma oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. **Biological Psychiatry**, v. 68, n.12, p. 1100-1106, 2010.
- GARBUGINO, L.; CENTOFANTE, E.; D'AMATO, F. R. Early social enrichment improves social motivation and skills in a monogenic mouse model of autism, the Oprm1 (-/-) mouse. **Neural Plasticity**, p. 1-11, 2016.
- GARCIA, V. A. et al. Modafinil ameliorates cognitive impairments induced by maternal separation and sleep deprivation. **Behavioural Brain Research**, v. 253, p. 274-279, 2013.
- GEORGE, E. D. et al. Maternal separation with early weaning: a novel mouse model of early life neglect. **BCM Neuroscience**, v. 11, n.123, p. 1-14, 2010.
- GHIANI, C. A. et al. Early effects of lipopolysaccharide-induced inflammation on foetal brain development in rat. **ASN Neuro**, v. 3, n.4, p. 233-245, 2011.
- GIDAYA, N. B. et al. In utero exposure to selective serotonin reuptake inhibitors and risk for autism spectrum disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 44, n.10, p. 2558-2567, 2014.
- GOH, S.; PETERSON, B. S. Transtornos do Espectro do Autismo. In: ROWLAND, L. P.; PEDLEY, T. A. **Tratado de Neurologia**. 12^a ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2011.
- GOINES, P. et al. Autoantibodies to cerebellum in children with autism associate with behaviour. **Brain, Behaviour and Immunity**, v. 25, n.3, p. 514-523, 2011.

GOULD, T. D.; DAO, D. T.; KOVACSICS, C. E. The open field test. In: GOLD, T. D. **Mood and anxiety related phenotypes in mice: characterization using behavioral tests**. 1^a ed. Humana Press: New York, 2009.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI JUNIOR, H. Z. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anxiety and panic. **Psychology & Neuroscience**, v. 3, n.1, p. 3-8, 2010.

GREEN, J. et al. Parent mediated intervention versus no intervention for infants at high risk of autism: a parallel, single-blind, randomised trial. **Lancet Psychiatry**, v. 2, p. 133-140, 2015.

GUSTAFSSON, L. et al. The impact of postnatal environment on opioids peptides in young and adult male Wistar rats. **Neuropeptides**, v. 42, p. 177-191, 2008.

HA, S. et al. Cerebellar Shank2 regulates excitatory synapse density, motor coordination and specific repetitive and anxiety-like behavior. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n.48, p. 12129-12143, 2016.

HANNIGAN, J. H.; O'LEARY-MOORE, S. K.; BERMAN, R. F. Postnatal environmental or experiential amelioration of neurobehavioral effects of perinatal alcohol exposure in rats. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v. 31, p. 202-211, 2007.

HAO, L. Y. et al. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in cognitive deficits in age-increase offspring rats. **Neuroscience**, v. 166, p. 663-670, 2010.

HARDEN, L. M. et al. Differences in the relative involvement of peripherally released interleukin (IL)-6, brain IL-1 β and prostanooids in mediating lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, p. 608-622, 2011.

HARMON, K. M. et al. Rats selectively bred for low levels of 50 kHz ultrasonic vocalizations exhibit alterations in early social motivation. **Developmental Psychobiology**, v. 50, n.4, p. 322-331, 2008.

HARMON, K. M. et al. The effects of prenatal stress on motivation in the rat pup. **Stress**, v. 12, n.3, p. 250-258, 2009.

HARVEY, L.; BOSKA, P. Additive effects of maternal iron deficiency and prenatal immune activation on adult behavior in rat offspring. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 40, p. 27-37, 2014.

HEALY, D.; LE NOURY, J.; MANGIN, D. Links between serotonin reuptake inhibitors during pregnancy and neurodevelopmental delay/spectrum disorders: a systematic review of epidemiological and physiological evidence. **International Journal of Risk and Safe Medicine**, v. 28, n.3, p. 125-141, 2016.

HENSLEIGHT, E.; PRITCHARD, L. M. Maternal separation increases methamphetamine-induced damage in the striatum in male, but not female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 295, p. 3-8, 2015.

HO, D. H. et al. Early life stress in male mice induces superoxide production and endothelial dysfunction in adulthood. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 309, n.9, p. 1267-1274, 2016.

HOERTON, C.; BALE, T. L. Prenatal programming: at the intersection of maternal stress and immune activation. **Hormones and Behavior**, v. 63, p. 237-242, 2012.

HOMS, A. et al. Genetic and epigenetic methylation defects and implication of the ERMN gene in autism spectrum disorders. **Translational Psychiatry**, v. 6, p. 1-10, 2016.

HSUEH, P. et al. Expression of cerebral serotonin related to anxiety-like behaviors in C57BL/6 offspring induced by repeated subcutaneous prenatal exposure to low-dose lipopolysaccharide. **PLoS One**, v. 12, n.6, p. 1-26, 2017.

HUTTER, J. Does rubella cause autism: a 2015 reappraisal? **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 10, p. 1-15, 2016.

JOHNSON, M. V.; BLUE, M. E. Neurobiologia do autismo. In: RAPIN, I.; TUCHMAN, R. **Autismo: abordagem neurobiológica**. 1ª ed. Artmed: Porto Alegre, 2009.

JONES, W.; KLIN, A. Attention to eyes is present but decline in 2-6-month-old infants later diagnosed with autism. **Nature**, v. 504, n.7480, p. 427-431, 2013.

KAFFMAN, A.; MEANEY, M. J. Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 43, n.3, p. 224-244, 2007.

KALUEFF, A. V. et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n.1, p. 45-59, 2016.

KANG, J.; KIM, E. Suppression of NMDA receptor function in mice prenatally exposed to valproic acid improves social deficits and repetitive behaviors. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, p. 1-9, 2015.

KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **Nervous Child**, v. 2, p. 217-250, 1943.

KELLEY, K. W. et al. Cytokine induced sickness behavior. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 17, p. 112-118, 2003.

KIM, K. C. et al. Clinical and neurobiological relevance of current animal models of autism spectrum disorders. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 24, n.3, p. 207-243, 2016.

KINRYS, G.; WYGANT, L. E. Transtorno de ansiedade em mulheres: gênero influencia o tratamento? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 27, Supl.2, p. 43-50, 2005.

KIRSTEN, T. B. Lipopolissacarídeo no início do período pré-natal como modelo experimental de autismo e prejuízos dopaminérgicos estriatais. 2012. 195 f. Tese. [Doutorado em patologia experimental e comparada]. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

KIRSTEN, T. B.; BERNARDI, M. M. Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: repetitive self grooming and stereotypies. **Behavioural Brain Research**, v. 331, p. 25-29, 2017.

KIRSTEN, T. B. et al. Prenatal LPS exposure reduces olfactory perception in neonatal and adult rats. **Physiology & Behavior**, v. 104, p. 417-422, 2011.

KIRSTEN, T. B. et al. Prenatal zinc prevents communication impairments and BDNF disturbance in rat model of autismo induced by prenatal lipopolysaccharide exposure. **Life Sciences**, v. 1, n.130, p. 12-17, 2015.

KIRSTEN, T. B. et al. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, p. 240-251, 2010.

KLIN, A. Autismo e síndrome de Asperger: uma visão geral. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 28, Supl.1, p. 3-11, 2006.

KOPF, B. S. et al. Serotonin 2G receptor signaling in a diffuse neuronal network is necessary for LPS anorexia. **Brain Research**, n.1306, p. 77-84, 2010.

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. **Neurochemistry International**, v. 91, p. 34-45, 2015.

KUMPEL, B. M.; MANOUSSAKA, M. S. Placental immunology and maternal alloimmune responses. **Vox Sanguinis**, v. 102, n.1, p. 2-12, 2012.

KWAK-KIM, J. Y.; GILMAN-SACKS, A.; KIM, C. E. T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortion and infertility of repeated implantation failures. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 88, p. 64-69, 2005.

LABOUESSE, M. A.; LANGHANS, W.; MEYER, U. Abnormal context-rewards associations in an immune-mediated neurodevelopmental mouse model with relevance to schizophrenia. **Translational Psychiatry**, v. 5, p. 1-9, 2015.

LANDRIGAN, P. J. What causes autism? Exploring the environmental contribution. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 22, p. 219-225, 2010.

LEE, M. H.; RABE, A. Infantile handling eliminates reversal learning deficits in rat prenatally exposed to alcohol. **Alcohol**, v. 18, n.1, p. 49-53, 1999.

LEAL, M. et al. Terapia nutricional em crianças com transtorno do espectro autista. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 1, n.13, p. 1-13, 2015.

LEMAIRE, V. et al. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 97, n.20, p. 11032-11037, 2000.

LI, M. et al. The association of maternal obesity and diabetes with autism and other developmental disabilities. **Pediatrics**, v. 137, n.2, p. 1-12, 2016.

LI, S. H.; GRAHAM, B. M. Why woman are so vulnerable to anxiety, trauma-related and stress-related disorders? The potential role of sex hormones. **Lancet Psychiatry**, v. 4, n.1, p. 73-82, 2017.

LIMA, E. C. et al. Indicadores sobre o cuidado a crianças e adolescentes com autismo na rede de CAPSi da região metropolitana do Rio de Janeiro. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n.3, p. 715-739, 2014.

LYALL, K. et al. Pregnancy complications and obstetric suboptimality in association with autism spectrum disorders in children of the nurses' health study II. **Autism Research**, v. 5, n.1, p. 21-30, 2012.

LIN, Y.; WANG, S. Prenatal Lipopolysaccharide exposure increases depression-like behaviors and reduces hippocampal neurogenesis in adult rats. **Behavioral Brain Research**, v. 259, p. 24-34, 2014.

LOKE, H.; HARLEY, V.; LEE, J. Biological factors underlying sex differences in neurological disorders: focus on SRY. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 65, p. 139-150, 2015.

LOPEZ, Y. P. et al. Effects of subcutaneous LPS injection on gestational length and intrauterine and neonatal mortality in mice. **Neuroimmunomodulation**, v. 22, p. 274-278, 2015.

MAES, M. et al. Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. **BMC Medicine**, v. 10, n.66, p. 1-19, 2012.

MALENG, L. Y.; MILAD, M. R. Sex differences in anxiety disorders: interactions between fear, stress and gonadal hormones. **Hormones and Behavior**, v. 76, p. 106-117, 2015.

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

MAKANJUOLA, R. O. A. et al. An automated method for studying exploratory and stereotyped behavior in rats. **Psychopharmacology**, v. 52, p. 271-277, 1977.

MANDY, W.; LAI, M. C. Annual research review: the role of environment in the developmental psychopathology of autism spectrum condition. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 57, n.3, p. 271-292, 2016.

MANIAN, J.; ANTONIADIS, C.; MORRIS, M. J. Early-life stress, HPA axis adaptation, and mechanisms contributing to later health outcomes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, p. 1-17, 2014.

MARKAM, J. A.; KOENING, J. I. Prenatal stress: role in psychotic and depressive diseases. **Psychopharmacology**, v. 214, p. 89-106, 2011.

MARKRAM, K. et al. Abnormal fear conditioning and amygdala processing in a animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 901-912, 2008.

MARQUES, A. A. et al. Gender differences in the neurobiology of anxiety: focus on adult hippocampal neurogenesis. **Neural Plasticity**, v. 2016, p. 1-14, 2016.

MARQUES, A. H.; CIZZA, G.; STERNBERG, E. Interações imunocerebrais e implicações nos transtornos psiquiátricos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, Supl.1, p. 27-32, 2007.

MASKI, K. P.; JESTE, S. S.; SPENCE, S. J. Common neurological co-morbidities in autism spectrum disorders. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 23, n.6, p. 609-615, 2011.

MCINTOSH, J.; ANISMAN, H.; MERALI, Z. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affects anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. **Developmental Brain Research**, v. 113, p. 97-106, 1999.

MEEK, L. R. et al. Effects os stress during pregnancy on maternal behavior in mice. **Physiology & Behavior**, v. 72, p. 473-479, 2001.

MELTZER, A.; WATER, J. V. The role of immune system in autism spectrum disorders. **Neuropsychopharmacology**. Manuscrito aceito em ago. 2016. Disponível em:

<<http://www.nature.com/npp/journal/vaop/ncurrent/full/npp2016158a.html>> Acesso em 21 set. 2016.

MEYER, U. et al. Towards an immuno-precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v. 29, p. 913-947, 2005.

MIKULECKÁ, A. et al. Consequences of early postnatal benzodiazepines exposure in rats. I. Cognitive-like behaviour. **Frontiers in behavioral Neuroscience**, v. 8, p. 1-9, 2014.

MINETTO, M. F.; LÖRH, S. S. Crenças e práticas educativas de mães de crianças com desenvolvimento atípico. **Educação em Revista**, n.59, p. 49-64, 2016.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INFORMAÇÃO. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a utilização de Animais para fins científicos e didáticos – DBCA. Brasília, 2013.

MISSAULT, S. et al. The risk for behavioral deficits is determined by maternal immune response to prenatal immune challenge in a neurodevelopmental model. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 42, p. 138-146, 2014.

MONROY, E.; HERNÁNDEZ-TORRES, E.; FLORES, G. Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus and nucleus accumbens in male offspring. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 40, n.2, p. 93-101, 2010.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 8ª ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2008.

MOR, G. et al. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. **Annals of the New York Academy of Sciences**. V. 1221, n.1, p. 80-87, 2011.

MORAGA-AMARO, R. et al. Sex steroids hormones and brain function: PET imaging as a tool for research. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 30, n.2, p. 1-12, 2018.

MORAIS, L. H. et al. Strain differences in the susceptibility to the gut-brain axis and neurobehavioural alterations induced by maternal immune activation in mice. **Behavioural Pharmacology**, v. 29, p. 181-198, 2018.

MORRIS, R. G. et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, v. 297, p. 681-683, 1982.

MOURIK, M. S. M.; MACKLON, N. S.; HEIJNEN, C. J. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules and immune cells in establishing an implantation environment. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, p. 4-19, 2009.

MUELLER, S. C.; GRISSOM, E. M.; DOHANICH, G. P. Assessing gonadal hormone contributions to affective psychopathologies across humans and animal models. **Psychoneuroendocrinology**, v. 46, p. 114-128, 2014.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 6^a ed. Elsevier: São Paulo, 2010.

MUSTAFA, G. A.; AL-AYADHI, L. Y. The relationship between the increased frequency of serum antineuronal antibodies and the severity of autism in children. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 16, n.5, p. 464-468, 2012.

NASCIMENTO, A. F. et al. Lipopolysaccharide-induced sickness behaviour in lactating rats decreases ultrasonic vocalizations and exacerbates immune system activity in male offsprings. **Neuroimmunomodulation**, v. 22, p. 213-221, 2015.

NEDERHOF, E.; SCHMIDT, M. V. Mismatch or cumulative stress: toward an integrated hypothesis of programming effects. **Physiology & Behavior**, v. 106, p. 691-700, 2012.

NG, S. C. et al. Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in woman with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 48, p. 77-86, 2002.

NIJLAND, R.; ROFLAND, T.; STRIJP, J. A. G. V. Recognition of LPS by TLR4: potential for anti-inflammatory therapies. **Marine Drugs**, v. 12, n.7, p. 4260-4273, 2014.

NILSSON, C. et al. Maternal endotoxemia results in obesity and insulin resistance in adult male offspring. **Endocrinology**, v. 146, p. 2622-2630, 2001.

NING, H. et al. Maternally-administered lipopolysaccharide (LPS) increases tumor necrosis factor alpha in fetal liver and brain: its suppression by low-dose LPS pretreatment. **Toxicology Letters**, v. 176, p. 13-19, 2008.

NORWITZ, E. R. et al. Molecular regulation of parturition: the role of the decidual clock. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n.11, p. 1-20, 2015.

NUMAN, M.; INSEL, T. R. **The neurobiology of parental behavior**. 1^a ed. Springer: New York, 2003.

NUNES, H. C.; PEZZATO, F. A.; HOSHINO, K. Self-grooming, experimental anxiety and paradoxical sleep deprivation in rats. **Sleep Science**, v. 5, n.1, p. 19-23, 2012.

OGIMOTO, K.; HARRIS, M. K.; WISSE, B. E. MyD88 is a key mediator of anorexia, but not weight loss, induced by lipopolysaccharide and interleukin-1 β . **Endocrinology**, v. 147, n.9, p. 4445-4453, 2006.

O'LOUGHLIN, E. et al. Acute in utero exposure to lipopolysaccharide induces inflammation in the pre- and postnatal brain and alters the glial cytoarchitecture in the developing amygdala. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n.212, p. 1-12, 2017.

ORNOY, A.; WEINSTEIN-FUDIM, L.; ERGAZ, Z. Genetic syndromes, maternal diseases and antenatal factors associated with autism spectrum disorders. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, p. 1-21, 2016.

ORSO, R. et al. Maternal behavior of the mouse dam toward pups: implications for maternal separation model of early life stress. **Stress**, v. 21, n.1, p. 19-27, 2018.

ORTE, B. R. Envolvimento de receptores neurocinérgicos NK1 do septo lateral na modulação da ansiedade experimental avaliada no teste do odor de gato. 2009. 85 f. Dissertação. [Mestrado em Farmacologia] Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

PALM, M. et al. Involvement of inflammation in normal pregnancy. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 92, p. 601-605, 2013.

PAULA, C. S.; BELISÁRIO FILHO, J. F.; TEIXEIRA, M. C. T. V. Estudantes de psicologia concluem a graduação com uma boa formação em autismo? **Psicologia: Teoria e Prática**, v. 18, n.1, p. 206-221, 2016.

PENTEADO, S. H. W. et al. Prenatal lipopolysaccharide disrupts maternal behavior, reduces nest odor preference in pups and induces anxiety: studies of F1 and F2 generations. **European Journal of Pharmacology**, v. 738, p. 342-351, 2014.

PEREIRA, A.; RIESGO, R. S.; WAGNER, M. B. Autismo infantil: tradução e validação da Childhood Autism Rating Scale para uso no Brasil. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n.6, p. 487-494, 2008.

PETERSON, P. H. et al. Maternal immune activation, cytokines and autism. In: ZIMMERMAN, A. W. **Autism: current theoris and evidence**. Humana Press: New York, 2008.

PRIEBE, K. et al. Maternal influences on adult stress and anxiety-like behavior in C57BL/6J and BALB/CJ mice: a cross-fostering study. **Developmental Psychobiology**, v. 47, n.4, p. 95-96, 2006.

PRINS, J. R. et al. Microglia, the missing link in maternal immune activation and fetal neurodevelopment; and a possible link in preeclampsia and disturbed neurodevelopment? **Journal of Reproductive Immunology**, v. 126, p. 18-22, 2018.

RACICOT, K. et al. Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 72, p. 107-116, 2014.

RAINEKI, C.; LUCION, A. B.; WEINBERG, J. Neonatal handling: an overview of the positive and negative effects. **Developmental Psychobiology**, v. 56, n.8, p. 1613-1625, 2014.

RATNAYAKE, U. et al. Cytokines and the neurodevelopmental basis of mental illness. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, p. 1-9, 2013.

RAVI, S. et al. Maternal and birth risks factors for children screening positive for autism spectrum disorders on M-CHAT-R. **Asian Journal of Psychiatry**. Manuscrito aceito em abr. 2016. Disponível em: <[http://www.asianjournalofpsychiatry.com/article/S1876-2018\(16\)30169-1/pdf](http://www.asianjournalofpsychiatry.com/article/S1876-2018(16)30169-1/pdf)> Acesso em 09 set. 2016.

RAZA, S. et al. Effects of prenatal exposure to valproic acid on the development of juvenile typical social play in rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 26, n.8, p. 707-719, 2015.

REDMOND, G. Mood disorders in female patient. **International Journal of fertility and woman's medicine**, v. 42, n.2, p. 67-72, 1997.

REINWALD, J. R. et al. Neural mechanisms of early-stress as a developmental risk factor for severe psychiatric disorders. **Biological Psychiatry**, 2018. Publicado online prévio à impressão. Disponível em: <[http://www.biologicalpsychiatryjournal.com/article/S0006-3223\(17\)32317-X/pdf](http://www.biologicalpsychiatryjournal.com/article/S0006-3223(17)32317-X/pdf)> Acesso em 30 abr. 2018.

REYNOLD, S.; URRUELA, M.; DEVINE, D. P. Effects of environmental enrichment on repetitive behaviours in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. **Autism Research**, v. 6, n.5, p. 337-343, 2013.

RIBEIRO, I. P.; FREITAS, M.; OLIVA-TELES, N. As perturbações do espectro do autismo: avanços da biologia molecular. **Revista de Pediatria do Centro Hospitalar do Porto**, v. 22, n.1, p. 19-24, 2013.

RIO-ÁLAMOS, C. et al. Neonatal handling decreases unconditioned anxiety, conditioned fear and improves two-way avoidance acquisition: a study with inbred Roman high (RHA-I)- and low-avoidance (RLA-I) rats of both sexes. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 9, p. 1-13, 2015.

ROCCA, C. et al. The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward fetus. **Immunology Letters**, v. 161, p. 41-48, 2014.

RODIER, P. M. et al. Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 370, p. 247-261, 1996.

RONOVSKY, M. et al. Maternal immune activation transgenerationally modulates maternal care and offspring depression like-behavior. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 63, p. 127-136, 2017.

SADOCK, B. J.; SADOCK, V. A. **Compêndio de Psiquiatria. Ciência do comportamento e psiquiatria clínica**. 9ª ed. Artmed: Porto Alegre, 2007.

SAH, S. P. et al. Effect of quercetin on lipopolysaccharide induced-sickness behavior and oxidative stress in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 43, n.2, p. 192-196, 2011.

SANDERS, J. et al. A review of neuropsychological and neuroimaging research in autistic spectrum disorders: attention, inhibition and cognitive flexibility. **Research in Autism Spectrum Disorders**, v. 2, p. 1-16, 2008.

SANDMAN, C. A. et al. Maternal stress, HPA activity and fetal/infant outcome. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 814, p. 266-275, 1997.

SANGHA, S. et al. Heightened fear in response to a safety cue and extinguished fear cue in a rat model of maternal immune activation. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, p. 1-11, 2014.

SATARELLI, S. et al. V. Evidencing supporting the match/mismatch hypothesis of psychiatric disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 907-918, 2014.

SANTOS, A. L. V. et al. Diagnóstico precoce do autismo: dificuldades e importância. **Revista Norte Mineira de Enfermagem**, v. 4, Ed. Especial, p. 23-24, 2015.

SCHILIKMANN, E.; FORTUNATO, J. J. O uso de ácido valproico para a indução de modelos animais de autismo: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 62, n.2, p. 153-159, 2013.

SCHNEIDER, J. et al. Nutrient intake in the first two weeks of life and brain growth in preterm neonates. **Pediatrics**, v. 14, n.3, p. 1-13, 2018.

SCHNEIDER, T.; PRZEWLOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 80-89, 2005.

SCHNEIDER, T. et al. Gender-specific behavioral and immunological alterations in animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, p. 728-740, 2008.

SCHWARTZER, J. J. et al. Maternal immune activation and strain specific interactions in the development of autism-like behaviors in mice. **Translational Psychiatry**, v. 3, n.3, p. 1-9, 2013.

SERVADIO, M. et al. Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autistic-like symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid. **Translational Psychiatry**, v. 6, n.9, p. 1-11, 2016.

SERVADIO, M.; VANDERSCHUREN, L. J. M. J.; TREZZA, V. Modeling autism-relevant behaviour phenotypes in rats and mice: do ‘autistic’ rodents exist? **Behavioural Pharmacology**, v. 26, p. 522-540, 2015.

SHAFAI, T. et al. Association of early weaning and formula feeding with autism spectrum disorders. **Breastfeeding Medicine**, v. 9, n. 5, 2014.

SHELTON, J. F. et al. Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: the charge study. **Environmental Health Perspectives**, v. 122, n.10, p. 1103-1110, 2014.

SHMIDT, C. Transtornos do espectro do autismo na escola – protagonismos no processo inclusivo. 3ª Reunião Anual da ANPED. Porto de Galinhas, 2012. Disponível em <http://w3.ufsm.br/eeda/images/ARTIGOS/GT15-1786_int.pdf> Acesso em set. 2016.

SILVERMAN, J. L. et al. Repetitive self-grooming behavior in the BTBR mouse model of autism is blocked by the mGluR5 antagonist MPEP. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n.1, p. 976-989, 2009.

SIMÕES, L. R. et al. Maternal immune activation induced by lipopolysaccharide triggers immune response in pregnant mother and fetus, and induced behavioral impairment in adult rats. **Journal of Psychiatric Research**, v. 100, p. 71-83, 2018.

SMITH, S. E. P. et al. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n.40, p. 10695-10702, 2007.

SOARES, A. M. A. Implementações metodológicas para o estudo eletrofisiológico e comportamental de um modelo animal de autismo. 2015. 69 f. Dissertação. [Mestrado em Neurociência]. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

SOLAS, M. et al. Interactions between age, stress and insulin on cognition: implications for alzheimer’s disease. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n.8, p. 1664-1673, 2010.

SOLEK, C. M. et al. Maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. **Developmental Dynamics**, v. 247, n.4, p. 588-619, 2018.

SOTO, A. M. S. et al. Single early prenatal lipopolysaccharide exposure impairs striatal monoamines and maternal care in female rats. **Life Sciences**, v. 92, p. 852-858, 2013.

SOUZA, M. A. et al. Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference. **Physiology & Behavior**, v. 105, n.3, p. 850-855, 2012.

SPENCE, H. R. et al. Vocal coselection in rat pup ultrasonic vocalizations. **Ecology and Evolution**, v. 6, n.7, p. 1922-1929, 2016.

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

SVENSSON, J. et al. Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. **The Journal of Immunology**, v. 187, n.7, p. 3671-3682, 2011.

SZACHTA, P. et al. Immune related factors in pathogenesis of autism spectrum disorders. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 20, p. 3060-3072.

TABUSHI, K. et al. A neuroglin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. **Science**, v. 318, n.5847, p. 71-76, 2007.

TAN, T. et al. Low-frequency rTMS ameliorates autistic-like behaviors in rats induced by neonatal isolation through regulating the synaptic GABA transmission. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, p. 1-12, 2018.

TERRANOVA, M. L.; LAVIOLA, G. Scoring of social interactions and play in mice during adolescence. **Current Protocols in Toxicology**, chapter 13, suppl.26, p. 1-11, 2005.

THIEL, C. M. et al. High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. **Neuroscience**, v. 93, n.1, p. 243-251, 1999.

TOFOLI, S. M. C. et al. Early life stress, HPA axis and depression. **Psychology & Neuroscience**, v. 4, n.2, p. 229-234, 2011.

TORDJMAN, S. et al. Gene x environment interactions in autism spectrum disorders: role of epigenetic mechanisms. **Frontiers in Psychiatry**, v. 5, p. 1-17, 2014.

TOYAMA, R. P. et al. Dose-dependent sickness behavior, abortion and inflammation induced by systemic LPS injection in pregnant mice. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 28, Issue 4, p. 1-5, 2015.

VARGAS, J. et al. Early life stress increases metabolic risk, HPA axis reactivity, and depressive-like behaviour when combined with postweaning social isolation in rats. **Plos One**, v. 11, n.9, p. 1-21, 2016.

VIEIRA, F. V. Exposição pré-natal ao lipopolissacarídeo como modelo translacional de transtorno do espectro autista. 2017. 99 f. Dissertação. [Mestrado em Ciências Fisiológicas]. Universidade Federal de Alfenas. Alfenas, 2017.

VORHEES, C. V. et al. Prenatal immune challenge in rats: altered responses to dopaminergic and glutamatergic agents, prepulse inhibition of acoustic startle, and reduce route-based learning as a function of maternal body weight gain after prenatal exposure to Poly IC. **Synapse**, v. 66, n.8, p. 725-737, 2012.

VUILLERMOT, S. et al. Vitamin D treatment during pregnancy prevents autism-related phenotypes in a mouse model of maternal immune behavior. **Molecular Autism**, v. 8, n.9, p. 1-13, 2017.

YANG, M. et al. Social peers rescue autism-relevant sociability deficits in adolescent mice. **Autism Research**, v. 4, n.1, p. 17-27, 2011.

YENKOYAN, K. et al. Advances in understanding the pathophysiology of autism spectrum disorders. **Behavioral Brain Research**, v. 331, p. 92-101, 2017.

YAMAGUSHI, H. et al. Environmental enrichment attenuates behavioral abnormalities in valproic acid-exposed autism model mice. **Behavioural Brain Research**, v. 333, p. 67-73, 2017.

YIN, X. et al. Maternal deprivation influences pup ultrasonic vocalizations of C57BL/6J mice. **PLoS One**, v. 11, n.8, p. 1-20, 2016.

YU, P. et al. The effect of repeated early deprivation on ultrasonic vocalizations and ontogenic development in mandarin vole pups. **Behavioural Processes**, v. 88, n.3, p. 162-167, 2011.

WAN, M. W. et al. Parent-infant interactions in infant siblings at risk of autism. **Research in Developmental Disabilities**, v. 33, p. 924-932, 2012.

WANG, C. et al. 5-HT_{1A}-receptor agonist modified amygdala activity and amygdala-associated social behavior in valproate-induced rat autism model. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, p. 2027-2039, 2013.

WANG, H. et al. Age- and gender-dependent impairments of neurobehaviors in mice whose mothers were exposed to lipopolysaccharide during pregnancy. **Toxicology Letters**, v. 192, p. 245-251, 2010.

WEISS, I. C. et al. Early social isolation, but not maternal separation, affects behavioral sensitization to amphetamine in male and female adult rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 70, p. 397-409, 2001.

WELLMAN, K. A.; VARLINSKAYA, E. I.; MOONEY, S. M. D-cycloserine ameliorates social alterations that results from prenatal exposure to valproic acid. **Brain Research Bulletin**, v. 108, p. 1-9, 2014.

WERNER, E. et al. Variation in early developmental course in autism and its relation with behavioral outcome at 3-4 years of age. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 35, n.3, p. 337-350, 2005.

WHITE, S. W. et al. Anxiety in children and adolescents with autism spectrum disorder. **Clinical Psychology Review**, v. 29, p. 216-229, 2009.

WILCONSON, J. S. et al. Behavioral inhibition and impaired spatial learning and memory in hypothyroid mice lacking thyroid hormone receptor alpha. **Behavioural Brain Reserach**, v. 177, n.1, p. 109-116, 2007.

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

WEI, Y.; LI, X.; ZHOU, J. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in increases in blood pressure in blood pressure and body weight in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n.5, p. 651-656, 2007.

WOLFF, A. R.; BILKEY, D. K. The maternal immune activation (MIA) model os schizophrenia produces pre-pulse inhibition (PPI) deficits in both juvenile and adult rats but this effects are not associated with maternal weight loss. **Behavioral Brain Research**, v. 213, p. 323-327, 2010.

WOO, C. C. et al. Environmental enrichment as a therapy for autism: a clinical trial replication and extension. **Behaviour Neuroscience**, v. 129, n.4, p. 412-422, 2015.

WU, X. et al. Lithium ameliorates autistic-like behaviours induced by neonatal isolation in rats. **Frontiers in Behavioural Neuroscience**, v. 8, p. 1-12, 2014.

ZAGER, A.; MENNECIER, G.; PALERMO-NETO, J. Maternal immune activation in late gestation enhances locomotor response to acute but not chronic amphetamine treatment in mice offspring: role of the D1 receptor. **Behavioural Brain Research**, v. 232, p. 30-36, 2012.

ZANON, R. B.; BACKES, B.; BOSA, C. A. Identificação dos primeiros sintomas do autismo pelos pais. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, vol.30, n.1, p. 25-33, 2014.

ZAVAN, B. et al. Cox-2 plays a role in angiogenic DBA+ uNK cell subset ativation and pregnancy protection in LPS-exposed mice. **Placenta**, v. 44, p. 34-45, 2015.

ZHANG, Z. et al. Neonatal handling and environmental enrichment increase the expression of GAP-43 in the hippocampus and promote cognitive abilities in prenatally stressed rat offspring. **Neuroscience Letters**, v. 522, p. 1-5, 2012.

ZIMMERBERG, B.; ROSENTHAL, A. J.; STARK, A. C. Neonatal social isolation alters both maternal and pup behaviors in rat. **Developmental Psychobiology**, v. 42, p. 52-63, 2003.

ZUCKERMAN, L.; WEINER, I. Maternal immune activation leads to behavioral and pharmacological changes in the adult offspring. **Journal of Psychiatry Research**, v. 39, p. 311-323, 2005.

APÊNDICE

APENDICE A – Valores de F

Tabela 1 – Análise de Variância de uma via do peso e tamanho das ninhadas antes da padronização.

Parâmetro	Valor de F	Valor de P
Peso das ninhadas	F (3,55) = 4,163	P = 0,0100
Número de filhotes nascidos vivos	F (3,55) = 4,256	P = 0,0090

Tabela 2 – Análise de Variância de duas vias do peso das ninhadas após a padronização e do peso do animal adulto.

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Peso das ninhadas no DPN 1	F (1, 36) = 0,8261	P=0,3694	F (1, 36) = 2,421	P=0,1285	F (1, 36) = 0,4281	P=0,5171
Peso das ninhadas no DPN 7	F (1, 36) = 0,474	P=0,4956	F (1, 36) = 0,4444	P=0,5092	F (1, 36) = 2,261	P=0,1414
Peso das ninhadas no DPN 13	F (1, 36) = 1,137	P=0,2934	F (1, 36) = 0,01062	P=0,9185	F (1, 36) = 2,806	P=0,1026
Peso das ninhadas no DPN 21	F (1, 36) = 0,8497	P=0,3628	F (1, 36) = 0,1506	P=0,7003	F (1, 36) = 1,81	P=0,1869
Peso médio da fêmea adulta	F (1, 36) = 0,006652	P=0,9355	F (1, 36) = 10,79	P=0,0023	F (1, 36) = 0,008197	P=0,9284
Peso médio do macho adulto	F (1, 36) = 7,366e-006	P=0,9978	F (1, 36) = 3,249	P=0,0798	F (1, 36) = 0,8465	P=0,3637

Tabela 3 – Análise de Variância de três vias do comportamento materno no período matutino.

Parâmetros	Dia de lactação		Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Comportamento materno total	F (18,18) = 23,81	P < 0,0001	F (1,18) = 1,956	P=0,1624	F (1,18) = 9,389	P=0,0023	F (18, 18) = 0,79	P=0,7134
Alimentando	F (18, 18) = 10,84	P<0,0001	F (1, 18) = 0,6707	P=0,4131	F (1, 18) = 7,988	P=0,0048	F (18, 18) = 0,7984	P=0,7035
Explorando	F (18, 18) = 1,29	P=0,1865	F (1, 18) = 3,989	P=0,0462	F (1, 18) = 4,919e-005	P=0,9944	F (18, 18) = 1,239	P=0,2234
Não explorando	F (18, 18) = 13,86	P<0,0001	F (1, 18) = 3,218	P=0,0733	F (1, 18) = 4,23	P=0,0401	F (18, 18) = 0,9901	P=0,4690
Lambendo	F (18, 18) = 4,492	P<0,0001	F (1, 18) = 7,107	P=0,0079	F (1, 18) = 10,2	P=0,0015	F (18, 18) = 1,174	P=0,2769
Cifose	F (18, 18) = 17,9	P<0,0001	F (1, 18) = 0,01371	P=0,9068	F (1, 18) = 1,082	P=0,2986	F (18, 18) = 0,6803	P=0,8325
Sobre os filhotes	F (18, 18) = 1,398	P=0,1250	F (1, 18) = 2,47	P=0,1165	F (1, 18) = 0,4432	P=0,5058	F (18, 18) = 0,3723	P=0,9921
Posição passiva	F (18, 18) = 1,772	P=0,0249	F (1, 18) = 1,569	P=0,2108	F (1, 18) = 0,5073	P=0,4765	F (18, 18) = 0,7561	P=0,7527
Construindo o ninho	F (18, 18) = 3,675	P<0,0001	F (1, 18) = 0,01305	P=0,9091	F (1, 18) = 0,7975	P=0,3721	F (18, 18) = 0,8191	P=0,6786
<i>Self grooming</i>	F (18, 18) = 2,575	P=0,0004	F (1, 18) = 1,448	P=0,2292	F (1, 18) = 0,2463	P=0,6199	F (18, 18) = 0,7014	P=0,8116

Tabela 4 – Análise de Variância de três vias do comportamento materno no período vespertino.

Parâmetros	Dia de lactação		Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Comportamento materno total	F (18, 18) = 15,77	P<0,0001	F (1, 18) = 2,299	P=0,1300	F (1, 18) = 34,65	P<0,0001	F (18, 18) = 0,5183	P=0,9504
Alimentando	F (18, 18) = 7,843	P<0,0001	F (1, 18) = 1,841	P=0,1753	F (1, 18) = 0,4861	P=0,4859	F (18, 18) = 1,286	P=0,1891
Explorando	F (18, 18) = 4,934	P<0,0001	F (1, 18) = 2,296	P=0,1302	F (1, 18) = 1,043	P=0,3075	F (18, 18) = 1,131	P=0,3162
Não explorando	F (18, 18) = 7,821	P<0,0001	F (1, 18) = 0,416	P=0,5192	F (1, 18) = 32,41	P<0,0001	F (18, 18) = 0,4256	P=0,9827
Lambendo	F (1, 18) = 10,79	P=0,0011	F (1, 18) = 0,5905	P=0,4425	F (18, 18) = 5,586	P<0,0001	F (18, 18) = 0,9707	P=0,4921
Cifose	F (18, 18) = 14,37	P<0,0001	F (1, 18) = 0,7613	P=0,3832	F (1, 18) = 17,16	P<0,0001	F (18, 18) = 0,8327	P=0,6620
Sobre os filhotes	F (18, 18) = 1,336	P=0,1583	F (1, 18) = 1,414	P=0,2349	F (1, 18) = 0,5942	P=0,4411	F (18, 18) = 1,423	P=0,1134
Posição passiva	F (18, 18) = 2,447	P=0,0008	F (1, 18) = 5,391	P=0,0205	F (1, 18) = 0,004756	P=0,9450	F (18, 18) = 0,8857	P=0,5965
Construindo o ninho	F (18, 18) = 4,895	P<0,0001	F (1, 18) = 0,7508	P=0,3865	F (1, 18) = 3,797	P=0,0517	F (18, 18) = 0,7734	P=0,7328
<i>Self grooming</i>	F (18, 18) = 1,333	P=0,1595	F (1, 18) = 0,0616	P=0,8041	F (1, 18) = 3,408	P=0,0653	F (18, 18) = 0,9907	P=0,4683

Tabela 5 – Análise de Variância de duas vias do teste de vocalização da prole masculina e da prole feminina.

Sexo da prole	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Prole feminina	F (1, 36) = 0,2987	P=0,5881	F (1, 36) = 8,001	P=0,0076	F (1, 36) = 0,1633	P=0,6885
Prole masculina	F (1, 36) = 5,227	P=0,0282	F (1, 36) = 0,3709	P=0,5463	F (1, 36) = 0,274	P=0,6039

Tabela 6 – Análise de Variância de duas vias do teste de *Homing response* da prole feminina.

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Tempo de latência para alcançar a maravalha do ninho	F (1, 36) = 0,3492	P=0,5583	F (1, 36) = 0,07097	P=0,7915	F (1, 36) = 0,04482	P=0,8335
Número de saídas da maravalha do ninho	F (1, 36) = 0,639	P=0,4293	F (1, 36) = 0,3408	P=0,5630	F (1, 36) = 0,9481	P=0,3367

Tabela 7 – Análise de Variância de duas vias do teste de *Homing response* da prole masculina.

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Tempo de latência para alcançar a maravalha do ninho	F (1, 36) = 6,086	P=0,0185	F (1, 36) = 1,237	P=0,2735	F (1, 36) = 6,396	P=0,0160
Número de saídas da maravalha do ninho	F (1, 36) = 0,06727	P=0,7968	F (1, 36) = 2,611	P=0,1149	F (1, 36) = 0,7177	P=0,4025

Tabela 8 – Análise de Variância de três vias do parâmetro de latência para alcançar o ninho do teste de *Homing response* da prole feminina e da prole masculina.

Parâmetro	Sexo		Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Tempo de latência para alcançar a maravalha do ninho	F (1, 1) = 1,191	P=0,2787	F (1, 1) = 8,146	P=0,0056	F (1, 1) = 4,209	P=0,0439	F (1, 1) = 4,056	P=0,0477

Tabela 9 – Análise de Variância de duas vias do teste de campo aberto da prole feminina.

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Distância percorrida	F (1, 36) = 1,821	P=0,1856	F (1, 36) = 0,5806	P=0,4510	F (1, 36) = 0,3755	P=0,5438
Tempo de Imobilidade	F (1, 36) = 1,03	P=0,3169	F (1, 36) = 0,1962	P=0,6605	F (1, 36) = 0,2983	P=0,5883
Frequência de <i>Self grooming</i>	F (1, 36) = 0,06569	P=0,7992	F (1, 36) = 1,642	P=0,2082	F (1, 36) = 1,642	P=0,2082

Tabela 10 - Análise de Variância de duas vias do teste de campo aberto da prole masculina.

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Distância percorrida	F (1, 36) = 0,8697	P=0,3573	F (1, 36) = 2,317	P=0,1367	F (1, 36) = 1,822	P=0,1854
Tempo de Imobilidade	F (1, 36) = 3,267	P=0,0791	F (1, 36) = 2,939	P=0,0951	F (1, 36) = 2,097	P=0,1562
Frequência de <i>Self grooming</i>	F (1, 36) = 0,2812	P=0,5991	F (1, 36) = 0,2812	P=0,5991	F (1, 36) = 0,2812	P=0,5991

Tabela 11 - Análise de Variância de duas vias do teste de *Play behavior* da prole feminina.

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Tempo de perseguição	F (1, 24) = 0,06817	P=0,7963	F (1, 24) = 0,02269	P=0,8815	F (1, 24) = 4,748	P=0,0394
Tempo de farejamento	F (1, 24) = 1,113	P=0,3019	F (1, 24) = 2,118	P=0,1585	F (1, 24) = 0,05413	P=0,8180
Frequência de <i>Pouncing</i>	F (1, 24) = 2,474	P=0,1288	F (1, 24) = 2,742	P=0,1108	F (1, 24) = 1,249	P=0,2748
Frequência de <i>Pinning</i>	F (1, 24) = 1,956	P=0,1748	F (1, 24) = 7,201	P=0,0130	F (1, 24) = 0,1729	P=0,6813
Frequência de passagens sob/sobre o parceiro	F (1, 24) = 5,108	P=0,0332	F (1, 24) = 2,323	P=0,1405	F (1, 24) = 3,782	P=0,0636
Frequência total de comportamentos sociais	F (1, 24) = 2,914	P=0,1007	F (1, 24) = 3,879	P=0,0605	F (1, 24) = 0,09387	P=0,7620

Tabela 12 - Análise de Variância de duas vias do teste de *Play behavior* da prole masculina.

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Tempo de perseguição	F (1, 24) = 0,0001322	P=0,9909	F (1, 24) = 0,03729	P=0,8485	F (1, 24) = 6,331e-005	P=0,9937
Tempo de farejamento	F (1, 24) = 0,7361	P=0,3994	F (1, 24) = 0,6603	P=0,4244	F (1, 24) = 0,02401	P=0,8781
Frequência de <i>Pouncing</i>	F (1, 24) = 5,072	P=0,0337	F (1, 24) = 6,409	P=0,0183	F (1, 24) = 2,414	P=0,1333
Frequência de <i>Pinning</i>	F (1, 24) = 3,605	P=0,0697	F (1, 24) = 3,14	P=0,0891	F (1, 24) = 0,004005	P=0,9501
Frequência de passagens sob/sobre o parceiro	F (1, 24) = 1,189	P=0,2863	F (1, 24) = 0,004115	P=0,9494	F (1, 24) = 3	P=0,0961
Frequência total de comportamentos sociais	F (1, 24) = 6,472	P=0,0178	F (1, 24) = 4,409	P=0,0465	F (1, 24) = 1,821	P=0,1898

Tabela 13 - Análise de Variância de duas vias do teste do labirinto em cruz elevado da prole feminina.

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Tempo despedido nos braços abertos	F (1, 36) = 0,01508	P=0,9030	F (1, 36) = 0,7387	P=0,3958	F (1, 36) = 1,679	P=0,2034
Tempo despedido nos braços fechados	F (1, 36) = 9,194	P=0,0045	F (1, 36) = 2,155	P=0,1508	F (1, 36) = 2,679	P=0,1104

Tabela 14 - Análise de Variância de duas vias do teste do labirinto em cruz elevado da prole masculina.

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Tempo despedido nos braços abertos	F (1, 36) = 0,1261	P=0,7245	F (1, 36) = 5,047	P=0,0309	F (1, 36) = 2,079	P=0,1580
Tempo despedido nos braços fechados	F (1, 36) = 0,04767	P=0,8284	F (1, 36) = 2,963	P=0,0937	F (1, 36) = 0,4637	P=0,5002

Tabela 15 - Análise de Variância de três vias da porcentagem de tempo despendido nos braços fechados do labirinto em cruz elevado pela prole feminina e pela prole masculina.

Parâmetro	Sexo		Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Tempo despedido nos braços fechados	F (1, 1) = 14,54	P=0,0003	F (1, 1) = 8,011	P=0,0060	F (1, 1) = 0,1428	P=0,7066	F (1, 1) = 1,477	P=0,2282

Tabela 16 - Análise de Variância de duas vias do teste da tábua-de-buracos da prole feminina e da prole masculina.

Sexo da prole	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Número de mergulhos - Prole feminina	F (1, 36) = 0,1079	P=0,7444	F (1, 36) = 0,1686	P=0,6838	F (1, 36) = 0,1079	P=0,7444
Número de mergulhos - Prole masculina	F (1, 36) = 3,684	P=0,0629	F (1, 36) = 0,3007	P=0,5868	F (1, 36) = 0,03341	P=0,8560

Tabela 17 - Análise de Variância de três vias da etapa de treinos do teste do labirinto aquático de Morris (prole feminina).

Parâmetro	Dia de treino		Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Latência para alcançar a plataforma (média de 4 ensaios)	F (4, 4) = 105,1	P<0,0001	F (1, 4) = 2,316	P=0,1298	F (1, 4) = 0,01371	P=0,9069	F (4, 4) = 1,383	P=0,2415

Tabela 18 - Análise de Variância de três vias da etapa de treinos do teste do labirinto aquático de Morris (prole masculina).

Parâmetro	Dia de treino		Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Latência para alcançar a plataforma (média de 4 ensaios)	F (4, 4) = 64,87	P<0,0001	F (1, 4) = 0,5965	P=0,4409	F (1, 4) = 0,9344	P=0,3350	F (4, 4) = 0,5633	P=0,6896

Tabela 19 - Análise de Variância de duas vias do teste do labirinto aquático de Morris da prole feminina.

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Latência para atingir o local onde ficava a plataforma na etapa de treinos	F (1, 36) = 4,297	P=0,0454	F (1, 36) = 2,199	P=0,1468	F (1, 36) = 3,296	P=0,0778
Tempo no quadrante alvo	F (1, 36) = 0,8158	P=0,3724	F (1, 36) = 6,092	P=0,0185	F (1, 36) = 0,6205	P=0,4360
Distância percorrida	F (1, 36) = 3,262	P=0,0793	F (1, 36) = 0,01097	P=0,9172	F (1, 36) = 0,4123	P=0,5249

Tabela 20 - Análise de Variância de duas vias do teste do labirinto aquático de Morris da prole masculina.

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Latência para atingir o local onde ficava a plataforma na etapa de treinos	F (1, 36) = 0,1755	P=0,6778	F (1, 36) = 1,455	P=0,2356	F (1, 36) = 1,164	P=0,2878
Tempo no quadrante alvo	F (1, 36) = 0,04389	P=0,8352	F (1, 36) = 0,116	P=0,7354	F (1, 36) = 2,161	P=0,1502
Distância percorrida	F (1, 36) = 0,4122	P=0,5249	F (1, 36) = 5,845	P=0,0208	F (1, 36) = 1,739	P=0,1957

Tabela 21 - Análise de Variância de três vias do tempo de latência para atingir o local onde ficava a plataforma na etapa de treinos do labirinto aquático de Morris (prole masculina e feminina).

Parâmetro	Sexo		Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Latência para atingir o local onde ficava a plataforma na etapa de treinos	F (1, 1) = 4,058	P=0,0477	F (1, 1) = 3,378	P=0,0702	F (1, 1) = 0,1492	P=0,7005	F (1, 1) = 0,09433	P=0,7596

Tabela 22 - Análise de Variância de uma via da etapa do teste de exposição ao odor de gato (etapa odor) da prole feminina.

Parâmetros	Valor de F	Valor de P
Tempo de abrigamento	F (4, 45) = 27,33	P<0,0001
Nº de aproximações do tecido	F (4, 45) = 74,03	P<0,0001
Tempo próximo ao tecido	F (4, 45) = 34,01	P<0,0001

Tabela 23 - Análise de Variância de uma via da etapa do teste de exposição ao odor de gato (etapa odor) da prole masculina.

Parâmetros	Valor de F	Valor de P
Tempo de abrigamento	F (4, 45) = 9,318	P<0,0001
Nº de aproximações do tecido	F (4, 45) = 37,79	P<0,0001
Tempo próximo ao tecido	F (4, 45) = 21,78	P<0,0001

Tabela 24 - Análise de Variância de uma via da etapa do teste de exposição ao odor de gato (etapa contexto) da prole feminina.

Parâmetros	Valor de F	Valor de P
Tempo de abrigamento	F (4, 36) = 2,026	P=0,1115
Nº de aproximações do tecido	F (4, 36) = 4,277	P=0,0062
Tempo próximo ao tecido	F (4, 36) = 0,5843	P=0,6760

Tabela 25 - Análise de Variância de uma via da etapa do teste de exposição ao odor de gato (etapa contexto) da prole masculina.

Parâmetros	Valor de F	Valor de P
Tempo de abrigamento	F (4, 45) = 4,241	P=0,0054
Nº de aproximações do tecido	F (4, 45) = 2,446	P=0,0600
Tempo próximo ao tecido	F (4, 45) = 3,771	P=0,0099

Tabela 26 - Análise de Variância de duas vias do teste do labirinto em cruz elevado na prole feminina adulta.

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Tempo despedido nos braços abertos	F (1, 36) = 0,6308	P=0,4323	F (1, 36) = 2,283	P=0,1395	F (1, 36) = 1,924	P=0,1740
Tempo despedido nos braços fechados	F (1, 36) = 8,333	P=0,0065	F (1, 36) = 0,07529	P=0,7854	F (1, 36) = 4,444	P=0,0421

Tabela 27 - Análise de Variância de duas vias do teste do labirinto em cruz elevado na prole masculina adulta.

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Tempo despedido nos braços abertos	F (1, 36) = 0,02722	P=0,8699	F (1, 36) = 2,504	P=0,1223	F (1, 36) = 1,407	P=0,2434
Tempo despedido nos braços fechados	F (1, 36) = 0,05028	P=0,8239	F (1, 36) = 2,123	P=0,1538	F (1, 36) = 1,439	P=0,2381

Tabela 28 – Análise de Variância de três vias da porcentagem de tempo despendida nos braços fechados no teste do labirinto em cruz elevado pela prole feminina adulta e pela prole masculina adulta.

Parâmetro	Sexo		Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Tempo despedido nos braços fechados	F (1, 1) = 3,998	P=0,0493	F (1, 1) = 5,285	P=0,0244	F (1, 1) = 1,386	P=0,2430	F (1, 1) = 0,5906	P=0,4447

Tabela 29 - Análise de Variância de duas vias do teste de interação social da prole feminina.

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Tempo de perseguição	F (1, 16) = 9,32	P=0,0076	F (1, 16) = 0,7488	P=0,3996	F (1, 16) = 8,017	P=0,0120
Tempo de farejamento	F (1, 16) = 0,02123	P=0,8860	F (1, 16) = 3,783	P=0,0696	F (1, 16) = 0,5308	P=0,4768
Frequência de <i>Pouncing</i>	F (1, 16) = 1,549	P=0,2312	F (1, 16) = 1,076	P=0,3151	F (1, 16) = 0,3872	P=0,5425
Frequência de <i>Pinning</i>	F (1, 16) = 0,1895	P=0,6692	F (1, 16) = 1,705	P=0,2101	F (1, 16) = 0,08421	P=0,7754
Frequência de passagens sob/sobre o parceiro	F (1, 16) = 0,2581	P=0,6184	F (1, 16) = 5,226	P=0,0362	F (1, 16) = 1,032	P=0,3247
Frequência total de comportamentos sociais	F (1, 16) = 1,048	P=0,3212	F (1, 16) = 1,799	P=0,1986	F (1, 16) = 0,4037	P=0,5342

Tabela 30 – Análise de Variância de duas vias do teste de interação social da prole masculina.

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Tempo de perseguição	F (1, 16) = 0,671	P=0,4248	F (1, 16) = 0,999	P=0,3324	F (1, 16) = 0,0005083	P=0,9823
Tempo de farejamento	F (1, 16) = 0,01775	P=0,8957	F (1, 16) = 2,962	P=0,1045	F (1, 16) = 1,688	P=0,2123
Frequência de <i>Pouncing</i>	F (1, 16) = 14	P=0,0018	F (1, 16) = 1,028	P=0,3257	F (1, 16) = 0,5391	P=0,4734
Frequência de <i>Pinning</i>	F (1, 16) = 1,08	P=0,3142	F (1, 16) = 0,1597	P=0,6947	F (1, 16) = 2,307	P=0,1483
Frequência de passagens sob/sobre o parceiro	F (1, 16) = 0,2869	P=0,5996	F (1, 16) = 0,2869	P=0,5996	F (1, 16) = 0,7968	P=0,3853
Frequência total de comportamentos sociais	F (1, 16) = 6,318	P=0,0230	F (1, 16) = 0,1903	P=0,6685	F (1, 16) = 1,402	P=0,2537

Tabela 31 - Análise de Variância de duas vias do teste de campo aberto da prole feminina.

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Distância percorrida	F (1, 36) = 0,172	P=0,6808	F (1, 36) = 0,8681	P=0,3577	F (1, 36) = 5,421	P=0,0256
Tempo de Imobilidade	F (1, 36) = 0,6303	P=0,4324	F (1, 36) = 1,984	P=0,1676	F (1, 36) = 0,009056	P=0,9247
Frequência de <i>Self grooming</i>	F (1, 36) = 11,16	P=0,0020	F (1, 36) = 0,2784	P=0,6010	F (1, 36) = 0,03093	P=0,8614

Tabela 32 - Análise de Variância de duas vias do teste de campo aberto da prole masculina

Parâmetros	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Distância percorrida	F (1, 36) = 1,083	P=0,3049	F (1, 36) = 1,05	P=0,3124	F (1, 36) = 0,565	P=0,4571
Tempo de Imobilidade	F (1, 36) = 0,2037	P=0,6544	F (1, 36) = 0,7019	P=0,4077	F (1, 36) = 3,717	P=0,0618
Frequência de <i>Self grooming</i>	F (1, 36) = 2,143	P=0,1519	F (1, 36) = 0,7714	P=0,3856	F (1, 36) = 2,143	P=0,1519

Tabela 33 - Análise de Variância de duas vias da porcentagem da glândula adrenal em relação ao peso corporal da prole masculina e da prole feminina.

Sexo da prole	Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Peso da glândula adrenal na prole feminina	F (1, 36) = 9,801	P=0,0035	F (1, 36) = 0,02196	P=0,8830	F (1, 36) = 0,9928	P=0,3257
Peso da glândula adrenal na prole masculina	F (1, 36) = 3,756	P=0,0605	F (1, 36) = 0,327	P=0,5710	F (1, 36) = 0,1822	P=0,6720

Tabela 34 - Análise de Variância de três vias da comparação entre a porcentagem do peso da glândula adrenal em relação ao peso corporal entre a prole feminina e a prole masculina.

Parâmetro	Sexo		Exposição gestacional ao LPS		Isolamento		Interação	
	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P	Valor de F	Valor de P
Peso da glândula adrenal	F (1, 1) = 213	P<0,0001	F (1, 1) = 10,63	P=0,0017	F (1, 1) = 0,3223	P=0,5720	F (1, 1) = 0,0194	P=0,8896