

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG

**WESLEY FERNANDES FONSECA**

Influência dos glicocorticoides no comportamento doentio  
induzido pelo LPS de *E. coli* em camundongos prenhes

Alfenas/MG

2014

**WESLEY FERNANDES FONSECA**

Influência dos glicocorticoides no comportamento doentio  
induzido pelo LPS de *E. coli* em camundongos prenhes

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas  
pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas  
da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade  
Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro  
Junior.

Alfenas/MG

2014

WESLEY FERNANDES FONSECA

Influência dos glicocorticoides no comportamento doentio  
induzido pelo LPS de *E. coli* em camundongos prenhes

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas  
pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas  
da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade  
Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro  
Junior.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Assinatura:

Prof. Dr. Luciano Freitas Felício

Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

Assinatura:

Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Assinatura:

Dedico à Deus, autor de toda a vida e que deu a vida  
para nos salvar.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me despertar para a vocação de defesa e valorização da vida, sendo biólogo para trabalhar em prol do Reino. Agradeço a Deus, criador de todas as coisas, por terdes me criado e por sempre me amar.

Agradeço aos meus pais, Enio e Ana, por serem exemplos de dedicação, amor, fidelidade, compaixão e perdão. Por sempre se esforçarem para que os meus sonhos se tornassem realidade, enfrentando com esperança e ardor no coração todo obstáculo e dificuldade. Agradeço pelas correções fraternas, pelos ensinamentos baseados nas atitudes e pelo amor com quem me olham nos olhos me fazendo nascer e renascer a cada novo olhar.

Agradeço à Évila por ser minha incentivadora mor, minha inspiração e minha companheira de trabalho e de vida. Obrigado por me aceitar me entender, mesmo quando não sou digno de tais atitudes. Obrigado por me amar da maneira mais doce, pura e sutil, mesmo quando não mereço ser amado. Obrigado por estar ao meu lado mesmo quando minhas atitudes não são condizentes com o amor que sinto.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Jr pelos ensinamentos, pelas histórias infinitas que me fazem rir, pelas viagens em prol da realização de sonhos, sejam seus, meus ou nossos. Agradeço pela coragem e perseverança em continuar fazendo pesquisa, mesmo quando a maré se torna revolta e as águas parecem querer naufragar os planos. Agradeço pela ética e transparência que me fazem com que seja um exemplo não só profissional, mas também pessoal. Agradeço pelas conversas longas e duradouras que motivam, alegam, dão força e tornam o convívio pessoal e profissional leve e saudável. Agradeço pelas quartas de futebol, pelas sextas na PA e pelas segundas de bom humor que inspiram a semana toda.

Agradeço também ao co-orientador desse trabalho e coordenador do Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas na Nucleadora na Universidade Federal de Alfenas, Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva. Obrigado por cada ensinamento, cada orientação e contribuição que foram vitais para a realização do presente trabalho. Obrigado pelas correções, pela solicitude para com o tratamento, pela atenção e dedicação no que concerne aos questionamentos e dúvidas, sejam elas pertinentes ao trabalho ou em relação à Pós-Graduação. Obrigado pela confiança, pelo respeito e por ensinar tanto sobre tantas coisas que ficarão, absolutamente, guardadas na lembrança.

Agradeço ainda à Thaila Viana por ser peça fundamental no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por todos os momentos felizes e alegres, por tantos finais de semana dedicados com esmero e tamanha vontade que me motivavam mais ainda a conclusão do projeto. Agradeço por compartilhar felicidades, dificuldades, alegrias e tristezas e por estar junto na celebração dos resultados obtidos. Obrigado por ser mais que uma companheira de trabalho, mas uma amiga sempre disposta a ouvir e ajudar.

Agradeço também à Elisraily da Silva por ser um presente de Deus em minha vida, sendo dedicada e esforçada, mesmo quando os compromissos eram sufocantes. Agradeço pelo empenho, pelo comprometimento, pela preocupação com os prazos e resultados e pela vontade visível de crescer e saber ainda mais. Sem a ajuda preciosa e seu trabalho valoroso esse trabalho não seria dessa magnitude.

Agradeço, de maneira particular, ao Bruno Zavan por ser um companheiro, pelas viagens, pelas histórias partilhadas, pelos ensinamentos e pelas motivações. Agradeço por estar sempre ao meu lado sendo sempre solícito e gentil em todos os momentos em que necessitei.

Agradeço à profa. Dra. Fabiana Vilela por contribuir com preciosas orientações a respeito de metodologias pertinentes ao trabalho e por ainda ser tão amiga e companheira. Obrigado por me ensinar tanto profissionalmente e pessoalmente. Obrigado pela sua força interior que motiva a todos que a cercam. Força essa que é contagiante e faz brilhar os olhos. Você é exemplo de perseverança, de luta, de entrega, de crescimento e fortalecimento.

Agradeço à Prof. Dra. Andrea M. do Amarante Paffaro pela instrução, pelo carinho, pela ajuda e por ser “mãe” de todos, sendo dentro e fora do laboratório. Agradeço pelo cuidado, pelo esforço e pelas lutas em momentos no passado enquanto fora minha orientadora de iniciação científica para tentar me ajudar.

Agradeço aos parceiros de sonhos e missões: Felipe Rodrigues, Ygor Lacerda, Paulo Felipe, Willian Soares e Yago Santos. Que sejamos unidos até depois do fim. A vida não teria graça se não tivéssemos amigos. Minha vida seria vazia se não tivesse vocês!

Agradeço ao Alex por ser o irmão que o Senhor me deu e por conviver comigo por tanto tempo, proporcionando histórias de amizade e cumplicidade.

Agradeço aos membros do LABAInt Fernando Felicioni, Simone Hanneman, Rodrigo Pereira, Rodolfo Cabral, Leilane Sales, Camila Miranda Pernambuco, Glícia Greco, João Gabriel de Almeida e Renato Horvath, pelos momentos de convivência e alegria.

Obrigado também aos técnicos e funcionários do LABAInt, sobretudo à Isabel Passos e à Neusa Hipólito por serem tão carinhosas, preocupadas e atenciosas.

Agradeço à secretaria do Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Maria Antonieta Nogueira Alvarenga, pela educação e solicitude.

Agradeço ao Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas pela criação e manutenção do programa que visa formar profissionais capacitados na área da Fisiologia, aptos para ingressarem no campo do ensino e da pesquisa, oferecendo a oportunidade de aprendizado em diferentes centros.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro e à Universidade Federal de Alfenas por oferecer o suporte adequado para a realização deste trabalho.

Agradeço também a todos aqueles que embora não tenham sido citados nominalmente foram importantes para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

“Porque Deus amou o mundo de tal maneira que deu o seu Filho unigênito, para que todo aquele que nele crê não pereça, mas tenha vida eterna” (João 3,16)

## RESUMO

A administração do LPS de *Escheria coli* gera resposta imunológica e endócrina, como a produção de citocinas pró-inflamatórias, produção de prostaglandinas. Além disso, a endotoxemia promove mudanças neuro-endócrinas, como alterações no metabolismo da noradrenalina e serotonina no cérebro além da ativação do eixo HPA provocando comportamento doentio evidenciado por quadros de redução da capacidade exploratória e locomotora, anorexia, piroxia, anedonia, sonolência, redução do comportamento social e sexual, comportamento semelhante à ansiedade e depressão. Já foi demonstrado na literatura que endotoxemia é capaz de provocar hipotermia em animais prenhes além de apresentar significativa taxa de aborto e falhas gestacionais. Além disso, foi evidenciado também que fêmeas gestantes também apresentam o comportamento doentio diante da administração do LPS com mudanças nos componentes da interface materno-fetal importantes para o estabelecimento da homeostase uterina. Como a ativação do eixo HPA é uma das respostas mais proeminentes da endotoxemia, o presente estudo investigou a interferência de glicocorticoides no comportamento doentio em fêmeas prenhes. Para tanto, foi utilizado glicocorticoide exógeno, a dexametasona, bem como, inibidores da síntese de glicocorticoide, metirapona e mifepristone. A metirapona é um inibidor da enzima 11- $\beta$ -hidroxilase, a qual inibe o passo final de precursores da corticosterona. A mifepristone é um antagonista de receptores de glicocorticoide e ligante de receptores de progesterona. Fêmeas de camundongos SWISS no 10º dia de gestação foram pré-tratadas com as referidas drogas, 30 minutos antes do tratamento com LPS. Após duas horas, a temperatura retal foi aferida e foram realizados testes comportamentais a fim de investigar comportamentos semelhante à ansiedade, depressão, além de observar a capacidade exploratória e retenção de informações a curto prazo. A viabilidade gestacional também foi averiguada observando, para isso, o número de filhotes nascidos por ninhada. Foi observado que o tratamento com LPS provocou hipotermia nos animais prenhes sendo que o pré-tratamento com dexametasona foi o único capaz de evitar tal efeito através da redução da síntese de TNF- $\alpha$ . Tais achados fornecem indícios para o uso da dexametasona como antipirético em quadros de endotoxemia durante a gestação. Além disso, foi observado que o tratamento com LPS, independente do pré-tratamento utilizado, provocou um comportamento doentio evidenciado pela redução da capacidade exploratória e locomotora nos animais prenhes submetidos aos testes comportamentais. Os presentes achados comportamentais vão de encontro com a vasta literatura, indicando, adicionalmente, que o comportamento doentio é dependente de citocina pró-inflamatória e que o pré-tratamento com glicocorticoide ou inibidores de sua síntese não são capazes de prevenir o comportamento doentio. O pré-tratamento com metirapona foi o único capaz de evitar o aborto causado pelo LPS através da elevação dos níveis plasmáticos de progesterona, a qual, por sua vez, protege o feto contra ataques imunológicos maternos durante a gestação e assegura o parto. Desse modo, a metirapona pode ser usada a fim de prevenir abortos imunológicos provocados pela administração do LPS. Tais achados são significativos a fim de evitar perdas gestacionais provocadas pela endotoxemia evidenciando a metirapona como importante agente farmacológico. O pré-tratamento com mifepristone, com ou sem exposição ao LPS, provocou perda total da gestação. Tais achados vão de encontro com a literatura científica e caracterizam a mifepristone como potente agente abortivo capaz de interromper a gestação mesmo quando administrado após o período de implantação embrionária.

Palavras chave: Comportamento doentio. Gestação. Hipotermia. Aborto. Glicocorticoide

## ABSTRACT

Administration of LPS from *Escherichia coli* generates endocrine and immune response, such as the production of proinflammatory cytokines and prostaglandin production. Furthermore, endotoxemia promotes neuroendocrine changes such as alteration on the metabolism of norepinephrine and serotonin in the brain beyond the activation of HPA axis resulting in sickness behavior evidenced by the reduction of exploratory locomotor ability and anorexia, pyrexia, anhedonia, drowsiness, reduction behavior social and sexual behavior similar to anxiety and depression. Has been shown in the literature that endotoxemia is able to cause hypothermia in pregnant animals as well as presenting significant abortion and pregnancy failure. In addition, it has been shown that pregnant animals also exhibit the sickness behavior in response to LPS administration with important changes in the components of the maternal-fetal interface for establishing uterine homeostasis. Since the activation of the HPA axis is one of the most prominent responses of endotoxemia, the present study investigated the interference of glucocorticoids in sickness behavior in pregnant females. For this purpose, we used exogenous glucocorticoid, dexamethasone, as well as glucocorticoid synthesis inhibitors, metyrapone and mifepristone. The metyrapone is an inhibitor of the enzyme 11- $\beta$ -hydroxylase, which inhibits the last step of precursors of corticosterone. The mifepristone is an antagonist of glucocorticoid receptors, and progesterone receptor binding. SWISS female mice at 10th day of pregnancy were pre-treated with said drug, 30 minutes before the LPS treatment. Two hours after, the rectal temperature was measured and behavioral tests were performed to investigate the behavior like anxiety, depression, addition to observing the exploratory ability and short-term information retention. Gestational viability was also investigated observing, for this, the number of pups born per litter. It was observed that the treatment with LPS caused hypothermia in pregnant animals and that pretreatment with dexamethasone was the only one able to avoid this effect by reducing TNF- $\alpha$  synthesis. These findings provide evidence for use of dexamethasone as an antipyretic in endotoxemia frames during pregnancy. Furthermore, was noted that the LPS treatment, regardless of pretreatment employed provoked sickness behavior evidenced by the reduction in the exploratory and locomotor ability in the pregnant animals subjected to behavioral testing. Behavioral study findings corroborate with the vast literature, indicating additionally that sickness behavior is dependent on proinflammatory cytokine, and that pretreatment with glucocorticoids, or inhibitors of its synthesis are not able of preventing sickness behavior. Pretreatment with metyrapone was the only one capable of preventing abortion caused by LPS through elevated plasma levels of progesterone, which in turn protects the fetus from maternal immune attack during pregnancy and assures delivery. Thereby metyrapone can be used to prevent immunological abortions caused by LPS administration. These findings are significant to prevent pregnancy loss caused by endotoxemia indicating metyrapone an important pharmacological agent. Pretreatment with mifepristone, with or without exposure to LPS provoked a total loss of the pregnancy. These findings run counter to scientific literature and characterize the mifepristone as powerful abortive agent able to interrupt pregnancy even when administered after a period of embryo implantation.

Key words: Sickness behavior. Pregnancy. Hypothermia. Abortion. Glucocorticoid

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>HPA</b>	–	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
<b>LPS</b>	–	Lipopolissacarídeo de <i>Escheria coli</i>
<b>SI</b>	–	Sistema Imune ou Sistema Imunológicos
<b>SN</b>	–	Sistema Nervoso
<b>SNC</b>	–	Sistema Nervoso Central
<b>ACTH</b>	-	Hormônio Adenocorticotrófico
<b>IL-1</b>	–	Interleucina 1
<b>IL-6</b>	–	Interleucina 6
<b>TNF</b>	–	Fator de necrose tumoral
<b>IFN</b>	-	Interferon
<b>COX 2</b>	–	Ciclooxigenase 2
<b>GR</b>	–	Glicocorticoide receptor
<b>IL-1B</b>	–	Interleucina 1 beta
<b>IL-5</b>	–	Interleucina 5
<b>IL-8</b>	–	Interleucina 8
<b>GM-CSF</b>	–	Fator estimulado de colônia
<b>TNF-β</b>	–	Fator de necrose tumoral beta
<b>TNF-α</b>	–	Fator de necrose tumoral alfa
<b>CRF</b>	-	Hormônio Liberador de Corticotrofina
<b>CRH</b>	-	Hormônio Liberador de Corticotrofina
<b>IL-2</b>	-	Interleucina 2
<b>DOCA</b>	-	11-desoxicortisol
<b>PGE2</b>	-	Prostaglandina
<b>PFG</b>	–	Prostaglandinas F
<b>RU-38486</b>	-	Mifepristone
<b>PG</b>	–	Prostaglandina
<b>CEUA</b>	–	Comitê de Ética em Uso e Experimentação Anima
<b>LABAInt</b>	–	Laboratório de Biologia Animal Integrativa

**MET -** Metirapona  
**MIFE -** Mifepristone  
**DEXA -** Dexametasona  
**LCE –** Labirinto em cruz elevado  
**CA –** Campo aberto  
**SAL -** Salina  
**EPM –** Erro padrão da média  
**uNK -** Célula natural killer uterina

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Gráfico referente à temperatura retal das fêmeas no 10º dg.....	49
Figura 2-	Gráficos referentes ao tempo de exploração e frequência média de entradas no Labirinto em cruz elevado.....	51
Figura 3-	Gráfico referente ao comportamento dos animais prenhes no teste do Labirinto em cruz elevado.....	53
Figura 4-	Gráficos referentes à análise comportamental dos animais prenhes expostos ao teste do campo aberto.....	56
Figura 5-	Gráfico referente ao tempo de latência, em segundos, para o primeiro cruzamento no teste do campo aberto.....	57
Figura 6-	Gráficos referentes aos padrões comportamentais de camundongos prenhes expostos ao teste do campo aberto.....	58
Figura 7-	Gráficos relativos ao teste de reconhecimento espontâneo de objetos.....	60
Figura 8-	Teste do Nado Forçado.....	62
Figura 9-	Análise da ninhada.....	63
Figura 10-	Gráfico referente à temperatura retal das fêmeas no 10º dg.....	65
Figura 11-	Gráficos referentes ao tempo de exploração e frequência média de entradas no Labirinto em cruz elevado.....	66
Figura 12-	Gráfico referente ao comportamento dos animais prenhes no teste do Labirinto em cruz elevado.....	68
Figura 13-	Gráficos referentes à análise comportamental dos animais prenhes expostos ao teste do campo aberto.....	71
Figura 14-	Gráfico referente ao tempo de latência, em segundos, para o primeiro cruzamento no teste do campo aberto.....	73
Figura 15-	Gráficos referentes aos padrões comportamentais de camundongos prenhes expostos ao teste do campo aberto.....	74

Figura 16-	Gráficos relativos ao teste de reconhecimento espontâneo de objetos.....	76
Figura 17-	Teste do Nado Forçado.....	78
Figura 18-	Análise da ninhada.....	80
Figura 19-	Gráfico referente à temperatura retal das fêmeas no 10° dg.....	82
Figura 20-	Gráfico referente ao comportamento dos animais prenhes no teste do Labirinto em cruz elevado.....	84
Figura 21-	Gráfico referente ao comportamento dos animais prenhes no teste do Labirinto em cruz elevado.....	86
Figura 22-	Gráficos referentes aos padrões comportamentais de camundongos prenhes expostos ao teste do campo aberto.....	89
Figura 23-	Gráfico referente ao tempo de latência, em segundos, para o primeiro cruzamento no teste do campo aberto.....	90
Figura 24-	Gráficos referentes aos padrões comportamentais de camundongos prenhes expostos ao teste do campo aberto.....	91
Figura 25-	Gráficos relativos ao teste de reconhecimento espontâneo de objetos.....	93
Figura 26-	Teste do Nado Forçado.....	95
Figura 27-	Análise da ninhada.....	96

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
2.1	NEUROIMUNOMODULAÇÃO E COMPORTAMENTO DOENTIO.....	19
2.2	O COMPORTAMENTO DOENTIO.....	24
2.3	GLICOCORTICOIDES NA GESTAÇÃO.....	30
2.4	INIBIDOR DA SÍNTESE DE GLICOCORTICOIDES.....	34
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
4.1	ANIMAIS.....	41
4.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	41
4.3	ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	43
<b>4.3.1</b>	<b>Análise do comportamento semelhante à ansiedade.....</b>	<b>43</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Análise do comportamento semelhante à depressão.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Análise do comportamento semelhante à ansiedade e análise da locomoção .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Análise de memória.....</b>	<b>45</b>
4.4	ANÁLISE DOS NEONATOS.....	47
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
5.1	ANÁLISES REFERENTES AOS GRUPOS EXPERIMENTAIS PRÉ-TRATADOS COM DEXAMETASONA SEGUIDAS OU NÃO DA APLICAÇÃO DE LPS .....	48
<b>5.1.1</b>	<b>Análises da Temperatura Retal.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Análise Comportamental.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1.2.1</b>	<b>Labirinto em Cruz Elevado.....</b>	<b>49</b>
5.1.2.2	Teste do Campo Aberto.....	54
5.1.2.3	Teste de Reconhecimento Espontâneo dos Objetos.....	59
5.1.2.4	Teste do Nado Forçado.....	62
5.1.2.5	Análise da ninhada.....	63
5.2	ANÁLISES REFERENTES AOS GRUPOS EXPERIMENTAIS PRÉ-TRATADOS COM METIRAPONA SEGUIDAS OU NÃO DA APLICAÇÃO DE LPS.....	64
<b>5.2.1</b>	<b>Análise da temperatura retal.....</b>	<b>64</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Análise comportamental.....</b>	<b>65</b>
5.2.2.1	Teste do labirinto em cruz elevado.....	65
5.2.2.1	Teste do campo aberto.....	70
5.2.2.3	Teste de reconhecimento espontâneo dos objetos.....	75
5.2.2.2	Teste do Nado Forçado.....	77
<b>5.2.3</b>	<b>Análise da ninhada.....</b>	<b>79</b>
5.3	ANÁLISES REFERENTES AOS GRUPOS EXPERIMENTAIS PRÉ-TRATADOS COM MIFEPRISTONE SEGUIDAS OU NÃO DA APLICAÇÃO DE LPS.....	81

<b>5.3.1</b>	<b>Análise da temperatura retal.....</b>	<b>81</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Análise comportamental.....</b>	<b>82</b>
5.3.2.1	Teste do Labirinto em cruz elevado.....	82
5.3.2.2	Teste do campo aberto.....	87
5.3.2.3	Teste do reconhecimento espontâneo de objetos.....	92
5.3.2.4	Teste do nado forçado.....	94
<b>5.3.3</b>	<b>Análise da ninhada.....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>97</b>
6.1	ANÁLISE DA TEMPERATURA RETAL.....	97
6.2	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO.....	101
6.3	ANÁLISE DA NINHADA MEDIANTE O PRÉ-TRATAMENTO COM DEXAMETASONA, METIRAPONA E MIFEPRISTONE.....	119
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>123</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>125</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema imune e o sistema nervoso central interagem entre si de forma mútua e bidirecional, de modo que a ativação do sistema imune produzirá mudanças neuroendócrinas e neurovegetativas, ao mesmo passo que a estimulação, seja elétrica ou química, do sistema nervoso central surtirá em alterações do funcionamento do sistema imune. A ciência destinada a estudar a interação entre estes dois grandes sistemas, seja no campo anatômico, funcional ou comportamental, pode ser chamado de Neuroimunologia, Neuroimunomodulação ou ainda Psiconeuroimunologia. Os primeiros estudos realizados nesse sentido demonstraram que diante de um desafio imunológico havia um aumento de até três vezes da concentração de corticosterona, com concomitante aumento da produção de anticorpos, demonstrando, portanto, que a ativação do sistema imune influencia na atividade cerebral de modo que haja uma maior produção de corticosterona, um hormônio secretado através da ativação do eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA). O sentido contrário, ou seja, a estimulação do sistema nervoso central influenciando o sistema imune também fora provado. Demonstrou-se que um aumento da atividade elétrica no hipotálamo ventromedial produzia um pico da resposta de anticorpos na imunização primária.

Através de experimentos no campo da Neuroimunologia foi possível concluir que uma das principais respostas do sistema nervoso central frente à estimulação e ativação do sistema imune é a ativação do eixo HPA e produção final de glicocorticoides. Estes, por sua vez, desempenham a função de controle do sistema imune através de sua característica funcional anti-inflamatória, uma vez que apresentam função de inibição da migração e da quimiotaxia de eosinófilos e neutrófilo, interfere na funcionalidade de macrófagos e ainda diminui a transcrição de inúmeras citocinas pró-inflamatórias.

Uma das formas mais utilizadas pela metodologia científica com finalidade de ativação do sistema imune consiste na aplicação do lipopolissacarídeo de *Escheria coli* (LPS), um componente celular de bactérias gram-negativas, a qual causará a mimetização da inflamação/infecção sem, no entanto, apresentar o patógeno invasor ao hospedeiro. A aplicação do LPS causará a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como a interleucina 1 $\beta$ , a interleucina 6, o fator de necrose tumoral alfa, dentre outros. A administração de LPS causará

ainda modificações neuro-endócrinas de modo a aumentar a secreção de serotonina e noradrenalina, além de promover a ativação do eixo HPA culminando no aumento da concentração plasmática de glicocorticoides.

O LPS é capaz de causar ainda modificações a nível comportamental nos animais promovendo quadros de anorexia, pirexia, anedonia, sonolência, redução da atividade locomotora/exploratória, redução do comportamento social e sexual, comportamento semelhante à depressão. Tais alterações comportamentais são características do chamado comportamento doentio, uma vez que tratam-se de alterações adaptativas e/ou motivacionais características dos animais doentes.

Em nossos estudos anteriores foi demonstrado que mesmo durante a gestação, momento no qual há atenuação das respostas comportamentais frente aos estímulos estressores devido a diminuição do eixo HPA, há a evidência do comportamento doentio após a aplicação do LPS. A sugestão para tal evento concerne no fato da indução da enzima ciclooxigenase-2 e da prostaglandina microssomal sintase 1 nas células vasculares do cérebro promovendo aumento da secreção dos hormônios liberador de corticotrofina e adrenocorticotrofo, tendo, por consequência, aumento da secreção de glicocorticoides. Além disso, foi relatado que o tratamento com LPS causa alterações imunológicas durante a gravidez, uma vez que ocorreu o aparecimento de grande quantidade de células natural killer uterinas morfológicamente alteradas no útero de camundongos prenhes. Cabe ressaltar que a gestação é considerada um momento ímpar do ponto de vista imunológico uma vez que o organismo deve permitir um estado de tolerância na interface materno-fetal para que o embrião seja reconhecido como própria pelo sistema imunológico da mãe promovendo, posteriormente, a implantação e manutenção do concepto até o momento do nascimento. Portanto, alterações imunes durante o período gestacional são cruciais na determinação da sobrevivência ou não do embrião, podendo causar, em casos drásticos, processos abortivos.

De posse dos resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa *ab anteriori*, levantou-se a questão sobre a interferência dos inibidores da síntese de glicocorticoides sobre o comportamento doentio induzido mediante aplicação do LPS, além de especular a respeito do comportamento do animal prenhe diante à aplicação de um glicocorticoide exógeno sintético frente à exposição ao LPS. Com o anseio de responder aos questionamentos levantados foi desenvolvido o presente estudo com o fito de observar o comportamento de camundongos no estado gestacional

submetidos ao anti-inflamatório dexametasona com e sem a administração do LPS, além de se utilizar a metirapona e a mifepristona com e sem o tratamento do LPS. Buscou-se investigar a interferência dos glicocorticoides nos efeitos causados pelo LPS sobre o comportamento e sobre a homeostasia gestacional.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

A fim de aprofundar os conhecimentos acerca do tema a ser estudado foi proposta a presente revisão da literatura científica com a perspectiva histórica sobre a neuroimunomodulação, o comportamento doentio, bem como, a interferência de glicocorticoides sobre o processo gestacional.

### **2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO E COMPORTAMENTO DOENTIO**

A integração entre os sistemas imune (SI) e o sistema nervoso central (SNC) já é objeto de estudo da ciência há muito tempo. Nesse sentido, o ramo destinado a estudar a interação, seja anatômica, funcional e comportamental é chamado de Neuroimunologia. Com base na literatura científica encontramos outras nomenclaturas destinadas ao referido estudo. Outras terminologias empregadas para se referir à área podem ser Psiconeuroimunologia, Neuroimunomodulação ou ainda Imunoendocrinologia. Embora sejam diferentes em suas alcunhas todas visam estudar as interações mútuas e bidirecionais entre os grandes sistemas Imune e Nervoso (ALVES; PALERMO-NETO, 2007; KINOSHITA, 2007; ZAVAN, 2011).

Ader, no ano de 2000, afirmou que a Psiconeuroimunologia é a ciência que estuda as interações entre o comportamento, as funções neurais e endócrinas correlacionando intrinsecamente com os processos imune (ADER, 2000).

Os primeiros estudos relacionando os dois grandes sistemas observando, especificamente, a influência do sistema neuroendócrino sobre o sistema imune foram procedidos pelo pesquisador Hans Selye (1956) o qual expôs animais a estímulos nocivos como frio, injúria tecidual, exercício extenuante e intoxicações, como relatado por Reiche et al (2004). Segundo eles os resultados

obtidos permitem afirmar que alterações como hipertrofia das glândulas adrenais, úlceras gástricas e atrofia de órgãos linfoides como timo, baço e linfonodos estavam diretamente relacionados com as injúrias, demonstrando existir correlações entre o sistema nervoso, o qual percebia os insultos gerados, e o sistema imune que respondia de acordo. Seyle (1956) afirmou que as alterações encontradas mediante às injúrias, independente do estímulo que fora empregado, caracterizavam uma resposta orgânica, o que foi por ele denominado de Síndrome de adaptação geral, posteriormente chamado de estresse (REICHE; NUNES; MORIMOTO, 2004; SEYLE, 1956).

Juntamente com outros estudos, estas observações indicam que a comunicação no sentido bidirecional existe entre os sistemas nervoso, em seu ramo predominantemente neuroendócrino, e o sistema imune. Ainda nesse sentido, Madden; Felten (1995) afirmam que mecanismos neuroendócrinos podem modular a atividade do sistema imune, sendo o contrário também verdadeiro, uma vez que o sistema imune é capaz de influenciar na atividade neuroendócrina.

Há muitos trabalhos procedidos que visam o estudo de componentes do sistema imune influenciando diretamente o sistema nervoso, afetando, concomitantemente, respostas a nível comportamental e neuroendócrina (KINOSHITA, 2007). O primeiro estudo data do ano de 1975 quando Besedovsky mostrou um aumento na produção de anticorpos acompanhado por um aumento de até três vezes da concentração plasmática de corticosterona diante de um desafio imunológico provocado pela inoculação de hemácias de carneiro em ratos (ADER, 2000; BESEDOVSKY et al, 1975; COHN, 2003). Posteriormente, o mesmo autor demonstrou existir um aumento na atividade elétrica de neurônios no núcleo ventromedial do hipotálamo de ratos durante o pico da resposta de anticorpos formados devido à uma imunização primária (BESEDOVSKY et al, 1977; COHN, 2003) sendo tais observações replicadas posteriormente por Saphier et al em 1987.

Outra pesquisa referencial nesse contexto histórico da Neuroimunomodulação foi realizada por Blalock e Smith (1980) que demonstraram que linfócitos constituíam fontes de hormônios pituitários (ACTH) e também peptídeos cerebrais, sinonimamente chamados de peptídeos opioides. Segundo trabalho de revisão publicado por Ader (2000), tais pesquisas conduziram os estudos da compreensão neuro-imune a nível molecular.

No estudo da neuroimunomodulação há duas vertentes que evoluíram de modos independentes, porém caminharam juntas no decorrer da história da ciência. A primeira vertente

diz respeito a efeitos oriundos do sistema nervoso influenciando a atividade do sistema imune (ADER; COHEN, 1975; ADER; COHEN, 1982; COHN, 2003; FELTEN, 1991; ROCHA, 2006). Outro braço da neuroimunomodulação refere-se aos efeitos de produtos originados a partir de processos imune/inflamatório na atividade do SNC (ALVES; PALERMO-NETO, 2007; ROCHA, 2006).

Nessa perspectiva de abordagem, foi demonstrado que a interleucina 1 (IL-1), uma substância produzida por macrófagos e células imune ativadas, foi capaz de promover um aumento na concentração plasmática de corticosterona por meio da ativação do eixo HPA, sendo observado também um aumento considerável na concentração do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (BESEDOVSKY; DEL REY; SORKIN, 1986).

Estudos posteriores buscavam entender as comunicações entre o sistema imune e o sistema nervoso central, uma vez que a existência de tais comunicações já estava comprovada, desde o aspecto neuroanatômico até o aspecto fisiológico e funcional. A grande questão concernia em como o SNC detectava alterações no funcionamento do sistema imune.

Especulou-se que citocinas poderiam estar envolvidas no processo. As citocinas são capazes de regular processos importantes, sobretudo relacionados às questões imunes, como inflamação, febre, proliferação e diferenciação celular, síntese de proteínas de fase aguda, quimiotaxia, fibrose, ações antivirais e moléculas de adesão (ROTHWELL; HOPKINS, 1995).

Porém, as citocinas são moléculas de característica proteica apresentando baixo peso molecular e são relativamente grandes em seu tamanho (DUNN, 2007; SALUK-JUSZCAK; WACHOWICZ, 2005; TOYAMA, 2012). Desse modo, devido a suas características estruturais, não é possível que as citocinas atravessem a barreira hemato-encefálica, sendo impedidas de alcançar estruturas no SNC a fim de promover alterações em sua atividade. Contudo, há evidências que as citocinas se comunicam com o SNC através do nervo vago, cujas terminações estão presentes em todos os órgãos do peritônio (KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002). Sendo assim, as citocinas irão atuar no SNC por meio do nervo vago, transmitindo informações acerca do funcionamento do sistema imune para o sistema nervoso.

Já foi demonstrado que a liberação de interleucina 1 (IL-1) secretado por macrófagos ativados por lipopolissacarídeo de bactéria gram-negativa é capaz de estimular as fibras vagais, as quais, por sua vez, levarão as informações para o SNC (DELLAGIOIA; HANNESTAD, 2010; GOEHLER et al, 1999; MAIER et al, 1998; ROCHA, 2006). Foi demonstrado ainda que a secção

do nervo vago foi capaz de evitar a ativação em áreas como o tronco cerebral, o hipotálamo e estruturas límbicas, além de evitar o surgimento de diversos elementos do comportamento doentio após a administração de IL-1 ou LPS (KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002).

Outra forma de comunicação entre o sistema imune e o sistema nervoso central se dá por meio de hormônios, sendo, porém, esta forma de comunicação mais lenta do que se comparada às citocinas. Nesse modo de comunicação, sendo classificado como um modo indireto, as citocinas presentes na corrente sanguínea após o estímulo com LPS ou IL-1 atingem receptores específicos nos órgãos circunventriculares e células endoteliais. Há, posteriormente, a produção de prostaglandinas (PGE2) através da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2). A PGE2 exerce seus efeitos por meio de receptores (EP4) presentes em neurônios da área pré-óptica medial além do núcleo paraventricular do hipotálamo (ENGBLOM et al, 2003; KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002; USHIKUBI et al, 1998).

As citocinas produzidas após a administração de LPS ou IL-1 podem ainda atravessar a barreira hemato-encefálica em locais onde esta é mais frágil e porosa, como o plexo coroide e os órgãos circunventriculares, estimulando, *à posteriori*, macrófagos localizados nestas regiões os quais, por sua vez, produzem mais IL-1 que exerceria seus efeitos em receptores específicos em diversas áreas do cérebro, como, por exemplo, o núcleo do trato solitário, o hipocampo e a amígdala (BASSO et al, 2003; KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002).

Um mecanismo vital e chave frente à exposição do organismo a agentes estressores causando efeitos no sistema imune é a ativação do eixo HPA com consequente produção de glicocorticoides, os quais exerceriam uma função de controle do sistema imune através de sua ação anti-inflamatória, impedindo o desenvolvimento de alterações de caráter auto-ímmunes (WICK; SCHWARZ; KROEMER, 1993).

Em relação ao envolvimento dos glicocorticoides com a resposta imunológica sabe-se que eles podem favorecer a resposta mediada por citocinas anti-inflamatórias (Th-2) em detrimento da resposta mediada por citocinas pró-inflamatórias (Th-1) (KINOSHITA, 2007). Ao passo que há uma ativação dos receptores intracelulares de glicocorticoides há também uma inativação do fator de transcrição Nf- $\kappa$ B, sendo este um fator de transcrição pró-inflamatório, sendo, portanto, a ativação de glicocorticoides e sua ligação ao receptor intracelular importante para inibir fatores pró-inflamatórios, tal como a diminuição de prostaglandinas (BESEDOVSKY; DEL REY, 2000).

Por meio da ativação do eixo HPA e consequente liberação de glicocorticoides há ainda a diminuição da transcrição de inúmeras outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, a interleucina 13 (IL-13), a interleucina 5 (IL-5), a interleucina 6 (IL6), a interleucina 8 (IL-8), o TNF e o fator estimulador de colônia (GM-CSF) (GUYRE et al, 1988). Os glicocorticoides realizam ainda a inibição da migração/quimiotaxia de eosinófilos e neutrófilos, segundo VAN OVERVELD et al (2003). Portanto, pode-se afirmar que a produção de glicocorticoides em situações de estresse constituem um dos principais mecanismos para alterações da resposta imune, uma vez que sua ação na inibição da transcrição de diversas citocinas pró-inflamatórias já fora comprovada (LICINIO; FROST, 2000).

Cumpr-se ressaltar que a ativação do eixo HPA promoverá também a liberação de ACTH que juntamente com os glicocorticoides fazem parte das respostas neurovegetativas frente a situações de estresse e ansiedade (GRAEFF; HUNZIKER; GRAEFF, 1989). Segundo DUNN (1988), nesse aspecto, a ativação do eixo HPA ocasionado por IL-1 produzida mediante processo inflamatório ou infeccioso é considerada, então, uma situação capaz de promover estresse ou comportamento semelhante à ansiedade da mesma forma que estímulos ambientes ou físicos.

A mimetização da inflamação, através da inoculação de produtos da parede celular de bactérias gram-negativas, sobretudo o lipopolissacarídeo (LPS), ativa o sistema imunológico sem, no entanto, causar infecção ao hospedeiro (BURRELL, 1994) ocasionando também alterações no que diz respeito ao comportamento. Desse modo, a inflamação provocada através da administração de LPS é capaz de induzir comportamentos de anorexia, pirexia, anedonia, sonolência, redução da atividade locomotora e exploratório além de provocar um comportamento semelhante à depressão (DANTZER et al, 1998 a, 1998 b; DINARELLO, 2004; ENANGA et al, 2002; KENT et al, 1996; KLUGER, 1991; LEONARD, 2001; MATSUMURA; KOBAYASHI, 2004; ROMANOVSKY, 2004)

De acordo com a proposição de Hart (1988) estas alterações que ocorrem durante uma doença, como por exemplo a infecção, não se tratam apenas de um estado depressivo inespecífico e/ou generalizado do sistema nervoso central. Na verdade, esse padrão comportamental manifestado pelos animais no momento da doença trata-se de uma estratégia comportamental altamente especializada em um momento que o organismo enfrente potenciais risco de vida. Desse modo, as respostas comportamentais apresentadas pelo organismo durante a manifestação de uma doença fazem parte da reação homeostática natural do organismo a fim de combater a

infecção, sendo este conjunto de respostas denominado de “comportamento doentio” (KENT; KELLEY; DANTZER, 1992).

## 2.2 O COMPORTAMENTO DOENTIO

O comportamento doentio, por definição, trata-se de alterações comportamentais que podem incluir anorexia, diminuição de atividade exploratória ambiental e social, além da diminuição da atividade sexual, incluindo também quadros de anedonia e diminuição da memória (HART, 1988; KINOSHITA, 2007).

O comportamento de animais injetados com LPS ou citocinas, seja periféricamente ou centralmente através do ventrículo lateral, tem sido estudado exaustivamente por diversos autores (DANTZER et al, 2001; KENT; KELLEY; DANTZER, 1992). De modo geral, esses animais apresentam uma atividade locomotora diminuída, redução na exploração do ambiente físico e social, redução da ingestão de água e comida, além de um prejuízo no aprendizado e memória (DANTZER, 2001).

HART (1988) afirma que o comportamento de um animal acometido por uma doença não é particularmente adaptativo. Na verdade, trata-se de um resultado de processos de debilitação associado a outros processos como a incapacidade de obtenção de água e alimentos, sendo estes efeitos secundários. Outro ponto digno de nota por Hart é a afirmação de que os comportamentos característicos de animais doentes não são específicos a nenhuma espécie animal em particular, sendo também possíveis de serem encontrados em diversos animais incluindo o homem (COHN, 2003; HART, 1988).

Sendo assim, o comportamento de estar doente não seria um mal-adaptativo ou mesmo um efeito indesejável da doença, mas uma estratégia comportamental visando a sobrevivência durante momentos críticos da vida do animal. O comportamento associado à doença é uma tentativa, a todo custo, de vencer a doença disponibilizando recursos para se livrar do patógeno (COHN, 2003; DANTZER, 2001; HART, 1988; KINOSHITA, 2007).

A diminuição da atividade exploratória/locomotora é outra característica marcante do comportamento doentio. A diminuição da exploração social de animais juvenis pertencentes a uma mesma espécie tem sido usada como uma forma eficiente para avaliar o comportamento

doentio em modelos experimentais (DELLAGIOIA; HANNESTAD, 2010). O uso de animais juvenis permite estudar mais profundamente a interação social isentando outros comportamentos que ocorrem com animais adultos como o comportamento sexual e o comportamento de agressão (DANTZER, 2001). Estudos demonstram que a administração de LPS, IL-1 $\beta$  e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em ratos adultos e em camundongos diminuiu o tempo gasto na exploração de juvenis (BLUTHE; DANTZER; KELLEY, 1992; BLUTHE, 1994).

Yirmiya et al (1994) relatou que a administração de LPS reduziu a atividade locomotora, de auto-limpeza além de provocar febre, efeitos estes que não foram revertidos com a administração de um antagonista opioide. Linthorst et al, 1995, afirmaram que diminuição da atividade geral dos animais durante o comportamento doentio, evidenciado por escores de locomoção, auto-limpeza, ingestão de alimento e água, estava correlacionado com o aumento da concentração extracelular de serotonina (5-HT) e de seu metabólito ácido 5-hidróxi-indolacético (5-HIAA) no hipocampo. (KINOSHITA, 2007).

Resultados similares foram encontrados quando se administrou IL-1 $\beta$ , notando a diminuição significativa do comportamento sexual em fêmeas e sem alteração em machos. Cumpre ressaltar que o tratamento com LPS provocou tanto em machos quanto em fêmeas redução da atividade locomotora (KINOSHITA, 2007; YIRMIYA et al, 1995).

Em roedores, tanto a IL-1 quanto a administração da endotoxina promovem também a diminuição da exploração em ambientes novos, além da diminuição do comportamento social (LARSON et al, 2001), demonstrando, desse modo, que estímulos que ativam o sistema imunológico são capazes de promover a anedonia em roedores (DELLAGIOIA; HANNESTAD, 2010). Animais pré-tratados com endotoxina apresentam uma menor atividade neuronal em regiões cerebrais envolvidas no sistema de recompensa quando estes animais eram apresentados a ambientes novos (STONE et al, 2006).

A alteração dos parâmetros comportamentais considerados normais para comportamentos típicos que ocorrem durante um estado doentio é fundamental para que o organismo debele-se contra um agente infeccioso visando a eliminação dos patógenos. Estudos indicam que o comportamento doentio está relacionado com uma estratégia motivacional para que o organismo lide com a doença (KINOSHITA, 2007). Segundo Bolles (1974) a motivação pode ser entendida como um estado central que reorganiza a percepção e a ação. A motivação permite que o

indivíduo selecione a melhor estratégia em prol da sobrevivência, sendo a estratégia passível de mudanças de acordo com a situação enfrentada pelo organismo, ainda segundo Bolles.

Experimentos demonstrando a questão motivacional promovendo o comportamento doentio foram realizados. Miller (1964) demonstrou que o contexto ambiental em que o animal em estado doentio se encontrava era fundamental no que diz respeito à estratégia adotada. Em seu experimento o pesquisador administrou endotoxina bacteriana em ratos e observou que animais treinados a pressionarem uma barra com a finalidade de receber água realizavam tal tarefa com uma significativa redução quando comparado ao grupo controle. Já quando os animais eram colocados em uma plataforma giratória que parava por alguns instantes quando o animal pressionasse uma barra apresentaram menor latência para executar tal tarefa. Porém, de acordo com excelente revisão proposta por Aubert (1997), o experimento de Miller nunca foi replicado devido a discussões contraditórias entre suposições teóricas e achados experimentais. A interpretação para os achados de Miller evidenciam que o tratamento com endotoxina não provoca necessariamente a diminuição global dos comportamentos, mas influencia na tomada de decisões sobre a prioridade dos comportamentos a serem executados, tratando-se, portanto, de uma questão motivacional (DANTZER, 2001; KINOSHITA, 2007; LARSON et al, 2001).

Na questão motivacional é importante ressaltar que o estabelecimento do comportamento doentio compete com outros estados motivacionais. A expressão normal do comportamento requer uma organização hierárquica de estados motivacionais que estão continuamente atualizados de acordo com as flutuações internas do organismo e de acordo também com eventos que ocorrem externamente. Quando uma infecção acomete o indivíduo, ele se encontra numa situação de vida ou morte e sua fisiologia e seu comportamento devem ser alterados a fim de que possa se debelar contra a doença. Porém, para que se mude estes aspectos outrora descritos é necessário um processo a longo prazo readequando prioridades em relação aos estados motivacionais. Nesse sentido, o medo compete com a doença e, desse modo, o comportamento motivado pelo medo prevalece sobre o comportamento doentio. Um bom exemplo para ilustrar tal afirmativa é imaginar uma pessoa doente em sua cama que ao ouvir o alarme de incêndio e perceber as chamas é capaz de se mover rapidamente e superar o comportamento doentio para escapar da situação de perigo (DANTZER, 2001).

Outro exemplo é provido através dos efeitos depressivos ocasionados pela administração de IL-1 $\beta$  que são mais pronunciados quando os animais experimentais são testados em ambientes

seguros em sua caixa moradia do que se comparados a animais testados em ambientes novos (DANTZER et al, 2001). Tais evidências fornecem embasamentos práticos da competição motivacional existente entre medo e a doença (DANTZER, 2001).

Porém, o exemplo dado acima carece de especificidade, pois a atenuação do comportamento pode ser facilmente explicada através do aumento dos níveis circulantes de glicocorticoides, o que ocorre quando os animais são expostos a estímulos estressores (GOUJON et al, 1995). Uma demonstração melhor a respeito da motivação no comportamento doentio é representada sobre os efeitos das citocinas no comportamento materno. Nesse sentido, os comportamentos maternos, os quais são fundamentais para a sobrevivência da prole, devem ser mais resistentes aos efeitos depressivos causados pela administração de pirógenos, estabelecendo estratégias comportamentais colocando o comportamento materno acima de outros tipos de comportamento (DANTZER, 2001). Tanto é verdade tal predição que a administração de LPS sobre fêmeas lactantes numa dosagem que induz o espectro completo do comportamento doentio não perturbou o recolhimento de filhotes após a prole ter sido removida de seu ninho (AUBERT et al, 1997). Da mesma forma, fêmeas lactantes administradas com LPS deixavam de construir ninhos quando submetidas à temperatura de 20° C, porém, quando submetidas a um ambiente de 4° C os animais voltavam a construir o ninho para sua prole (AUBERT et al, 1997).

Portanto, pode-se afirmar que o comportamento doentio induzido através da administração de LPS depende não somente da concentração da droga *per se* mas também da prioridade do comportamento em questão. Interpretando os resultados citados acima podemos perceber que o comportamento de recolher os filhotes para perto de si sempre foi considerada uma prioridade para as fêmeas lactantes, enquanto que a construção do ninho não foi uma prioridade para fêmeas lactantes administradas com LPS submetidas a uma temperatura normal (COHN, 2003).

Portanto, o comportamento doentio pode ser entendido a partir de duas óticas diferentes: uma que compreende o comportamento doentio como resultado de uma debilitação e fraqueza física resultantes da doença que os acomete, fazendo com que o organismo apresente comportamentos alterados uma vez que a grande maioria dos recursos está envolvida com a luta contra o patógeno. Outra perspectiva de se analisar o comportamento doentio é a partir da ótica motivacional, observando o comportamento de se estar doente como uma expressão estratégica

altamente organizada que se torna crítica para a sobrevivência do organismo frente esta situação de vida ou morte (DANTZER, 2001).

A perspectiva motivacional surgiu muito depois da definição e caracterização acerca do comportamento doentio, tanto é que um dos precursores do estudo sobre o comportamento de se estar doente, Hart, não abordou esta visão. Para ele, o comportamento doentio evoluiu a partir de uma situação de tudo ou nada, onde o animal foi obrigado a apresentar tais respostas mediante ao iminente risco de vida (CONH, 2003). Segundo Aubert, a maioria dos experimentos sobre o comportamento doentio utiliza a temática comportamental apenas como uma variável para se estudar os mecanismos envolvidos no processo da doença em si. Sendo assim, o comportamento doentio não recebeu a atenção merecida, uma vez que é necessário que o comportamento doentio seja visto como uma variável independente (AUBERT, 1999; CONH, 2003).

Portanto, o comportamento doentio não é somente uma resposta evolutiva adaptativa, mas também uma expressão hierárquica e organizada a qual depende das mudanças contextuais em que o animal se encontra (CONH, 2003). O animal, mesmo estando doente, é capaz de perceber e responder a estímulos ambientais. Caso esses estímulos sejam mais prioritários, o animal pode interromper o comportamento doentio a fim de responder tais estímulos (AUBERT, 1999).

Tal como apresentado anteriormente, pode-se afirmar que a ativação do sistema imune através da administração de LPS, um componente da parede celular de bactérias gram-negativas, induz a expressão do comportamento doentio por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (DANTZER, 2001; DINARELLO, 1991; KENT et al, 1992; KENT et al, 1992; RAMACHANDRA; SEHON BERCZI, 1992; ROTHWELL; HOPKINS, 1995). As citocinas atuarão também no sistema nervoso central via COX-2 promovendo mudanças neuroendócrinas, como a secreção do hormônio liberador de corticotrofina, ativando o eixo HPA, aumentando, conseqüentemente, a concentração plasmática de ACTH e de glicocorticoides (BESEDOVSKY et al, 1986; DUNN, 1988, 2000; ENGBLOM et al, 2002 e 2003; HAUGER et al, 2009; OHMURA; YOSHIOKA, 2009; TURNBULL; LEE; RIVIER, 1998). Portanto, a mudança neuroendócrina a fim de ativar o eixo HPA parece ser essencial no que diz respeito ao estabelecimento do comportamento doentio.

Sabe-se que durante a gestação e a lactação de mulheres e fêmeas de roedores, há modificações do eixo HPA podendo ocasionar em respostas comportamentais alteradas, provocando ainda, uma hiporresponsividade perante às situações de estresse, uma vez que o eixo

encontra-se significativamente diminuído (BRUNTON; RUSSELL; DOUGLAS, 2008; HILLERER et al, 2011; NEUMANN, 2003; SLATTERY; NEUMANN, 2007). No início da gestação a concentração de glicocorticoides encontra-se reduzida significativamente e somente começarão a se elevar por volta do 10º dia de gestação em camundongos (BARLOW; MORRISON; SULLIVAN, 1975), bem como em ratos (ATKINSON; WADDELL, 1995). Dessa forma, é possível que camundongos prenhes possam apresentar comportamentos diferenciados diante da administração de endotoxinas devido estas mudanças a nível endocrinológico.

Além disso, durante a gestação de primatas e roedores ocorrem várias mudanças a nível neuro-endócrino materno visando a proteção do feto e assegurando o parto (FONSECA, 2005). Foi descrito que durante a gestação de roedores, a enzima 11 $\beta$ -hidroxi-esteróide desidrogenase (11 $\beta$ HSD2), a qual é responsável por catalisar a conversão da corticosterona em dehidrocorticosterona, um metabólito inativo, encontra-se altamente ativa (WELBERG; SECKL; HOLMES, 2000). A 11 $\beta$ HSD2 está expressa em grandes quantidades na placenta e em tecidos do feto (BROWN et al, 1996). Porém, apesar desses mecanismos acima explicados acerca da diminuição da atividade do eixo HPA juntamente com a atuação da enzima 11 $\beta$ HSD2 em prol da diminuição da concentração plasmática da corticosterona, tem sido observado uma correlação positiva entre o aumento de aldosterona e de corticosterona em mães e fetos após a exposição a um estímulo estressor durante o terço final da gestação (BENEDIKTSSON et al, 1997; WILLIAMS et al, 1999). Tais resultados trazem à tona que o momento da exposição ao estresse durante a gestação é determinante para a geração das respostas, além de afirmar que a atividade enzimática não é suficiente para a prevenção do alcance da corticosterona na circulação fetal (FONSECA, 2005).

Sabe-se ainda, em se tratando de modificações endócrinas durante a gestação, que por volta do 17º dia de gestação, o eixo HPA fetal já é capaz de responder às alterações dos hormônios maternos com liberação de CRF, ACTH, corticosterona e  $\beta$  endorfinas (OHKAWA et al, 1991). Desse modo, além da concentração de glicocorticoides maternos, que já estão em níveis circulantes mais elevados durante essa fase gestacional se comparados à primeira metade da gestação, há a presença de  $\beta$ -endorfinas na circulação da mãe e ambas são capazes de atravessar a barreira placentária (CHURCHILL et al, 1981; MILKOVIC et al, 1973; SANDMAN; KASTIN, 1981; ZARROW; PHILPOTT; DENENBERG, 1970) que se somarão aos glicocorticoides já produzidos pelo feto (FONECA, 2005). Estudos demonstram que no 13º

dia de gestação já é possível detectar mRNA para receptores de glicocorticoides em várias regiões cerebrais, como o núcleo paraventricular do hipotálamo, o núcleo arqueado, núcleos da rafe e *locus ceruleus*), além de mRNA para receptores de mineralocorticoides que aparecem em torno do 15º dia de gestação em ratos (CINTRA et al, 1993).

Sendo assim, a atividade do eixo HPA durante a gestação pode influenciar de modo significativo funções neuroendócrinas da fêmea prenhe, alterando também padrões comportamentais. Além disso, já foi relatado na presente revisão bibliográfica a importância da produção de glicocorticoides por meio do eixo HPA para a supressão da resposta imunológica frente a um desafio através da ativação do sistema imune. Dessa maneira, devido às modificações hormonais existentes, pode ser que a fêmea no período gestacional apresente um comportamento atípico frente à exposição ao LPS.

### 2.3 GLICOCORTICOIDES NA GESTAÇÃO

Os glicocorticoides são hormônios lipossolúveis, sendo, portanto, capazes de atravessar com grande facilidade membranas celulares e se ligarem a receptores citoplasmáticos, os quais, por sua vez, existem sobre as formas alfa e beta. A forma alfa de seus receptores, receptores de glicocorticoides (GR), é a forma ativa, sendo que a forma beta é incapaz de se ligar ao hormônio, agindo, portanto, como um antagonista da forma alfa (BUTTGEREIT; WEHLING; BURMESTER, 1998; ROMA, 2009;).

A principal indicação fisiológica para o tratamento com um glicocorticoide exógeno é o hipocorticismos, quadro no qual há diminuição drástica dos hormônios córtico-supra-renais (CALVERT; CORNÉLIUS, 1990). Porém, o uso para combater outros problemas clínicos torna-se maior do que sua própria indicação. Apesar dos corticoides serem usados para o tratamento de uma gama de desordens clínicas, destaca-se a prescrição do uso de glicocorticoides para problemas inflamatórios agudos ou crônicos de severidade variada (do AMARAL, 2000; FAUCI, 1976; STREETEN, 1975). Papich e Davis (1989) afirmam que os corticoides, de maneira geral, inibem a inflamação independente do agente causador, podendo este ser mecânico, químico, infeccioso ou imunomediado.

Os glicocorticoides sintéticos são capazes de prevenir ou ainda suprimir as reações inflamatórias através da inibição das fases iniciais do processo inflamatório, tal como a formação do edema, a deposição de fibrina, a migração de leucócitos e a atividade fagocitária. Os glicocorticoides limitam ainda as respostas tardias do processo de inflamação, controlando a proliferação fibrocapilar, o acúmulo de colágeno e a cicatrização (BEVIER, 1990).

A atividade imunossupressora exercida pelos glicocorticoides exógenos também é conhecida, sendo que de acordo com a dosagem aplicada há atuação em diferentes componentes da resposta imune, incluindo: linfopenia, eosinopenia, redução da atividade mitogênica e também redução da ação citotóxica (DOHERTY et al, 1995; WESTERHOF; BROM; MOL, 1994). Além disso, os glicocorticoides possuem a capacidade de alterar a funcionalidade de macrófagos, monócitos e neutrófilos, além de diminuir a fagocitose, as respostas quimiotáticas e o ingresso dessas células até o sítio de inflamação (do AMARAL, 2000).

Ainda nesses aspectos relacionados com a capacidade dos glicocorticoides afetarem a resposta imune, os glicocorticoides também possuem a capacidade de interferir na liberação de interleucina 1 (IL-1) produzida pelos macrófagos, tendo como consequência o impedimento à formação de interleucina 2 (IL-2) a qual estimula a proliferação de células T (DOHERTY et al, 1995).

Os glicocorticoides interferem ainda no número e na proporção de leucócitos em casos de infecções, além de provocarem também uma significativa redução de linfócitos e uma elevação no número de neutrófilos (DHABHAR et al, 1996; VILAÇA JUNIOR, 2009). Devido a estas propriedades anteriormente citadas, os glicocorticoides são usados no combate de infecções que ocorrem durante a gestação (BUHIMSCHI et al, 2008).

Já foi descrito na presente revisão bibliográfica as alterações do eixo HPA durante a fase gestacional. Acredita-se que o eixo encontra-se suprimido na primeira metade da gestação, voltando a se elevar a partir do 13º dia gestacional, tanto em camundongos quanto em ratos (ATKINSON; WADDELL, 1995; BARLOW; MORRISON; SULLIVAN, 1975; BRUNTON; RUSSELL; DOUGLAS, 2008; SLATTERY; NEUMANN, 2007). Além disso, sabe-se que outra modificação significativa que ocorre durante a gestação diz respeito à enzima 11 $\beta$ HSD2 a qual encontra-se altamente expressa e ativa no tecido placentário (BROWN et al, 1996; WELBERG; SECKL; HOLMES, 2000).

Mesmo com as modificações endócrinas descritas acima durante a fase gestacional, à exposição do organismo materno aos estímulos estressores pode causar a elevação de hormônios ligados à corticotropina, aumentando, conseqüentemente, os níveis plasmáticos na circulação materna de glicocorticoides. Desse modo, há um aumento da transferência de glicocorticoides da mãe para o feto. O aumento da concentração de glicocorticoides na circulação neonatal é associada com o retardo do crescimento intra-uterino (LESAGE et al, 2004; VILAÇA JUNIOR, 2011). O retardo no crescimento uterino é capaz de diminuir a produção de  $11\beta$ -HSD (tanto em sua isoforma 1 quanto na isoforma 2), fazendo com que, como consequência deste fato, haja uma redução da conversão de formas ativas em inativas de glicocorticoides. Isso ocorre devido à ligação da enzima  $11\beta$ -HSD2 a outros esteroides por questões de afinidade ou mesmo devido a alterações no gene que codifica tal proteína (HENDERSON et al, 2003; STEWART et al, 1996; VILAÇA JUNIOR, 2011).

O aumento da síntese de glicocorticoides pode ser benéfica se analisada a curto prazo, porém poderá causar efeitos a longo prazo como a programação de níveis elevados de glicocorticoides, aumento da pressão sanguínea, desenvolvimento de hiperglicemia, redução da imunoproteção da placenta, aumento do número de células natural killer e um conseqüente aumento de apoptoses no trofoblasto (SECKL, 2004; VILAÇA JUNIOR, 2011). Coletivamente, essas alterações são associadas com desordens na implantação e abortos espontâneos (QUENBY et al, 2005; QUENBY; FARQUHARSON 2006).

A utilização de glicocorticoides no período pré-natal, mesmo com finalidade terapêutica, causa desordens no metabolismo de glicose durante a vida adulta da prole, frequentemente desencadeando quadros de resistência à insulina associada com a redução da expressão de receptores de insulina. Há ainda a possibilidade de desenvolvimento de hiperglicemia e hiperinsulinemia (NYRIENDA et al, 1998). Podem ocorrer, também, mudanças no perfil lipídico plasmático devido uma elevada estimulação do tecido adiposo, liberando para a corrente sanguínea altas concentrações de colesterol (DIEDERICH et al, 2002; HOLNESS; SUGDEN 2001).

Já o uso de repetidas administrações de glicocorticoides tem sido associado a disfunções do eixo HPA com elevação do risco de infecções. Há ainda relatos que o uso contínuo de glicocorticoides pode provocar a inibição do crescimento fetal, além da redução do peso ao nascer (IKEGAMI et al, 1997; MOSS et al, 2001; STUCK; MINDER; FREY, 1989).

Estudos prévios realizados em nosso laboratório levantaram a questão de que os glicocorticoides poderiam afetar o comportamento semelhante à ansiedade e depressão, além de interferir na capacidade de retenção de informações a curto prazo de camundongos prenhes após o tratamento com lipopolissacarídeos de *E. coli* interferindo no eixo HPA, podendo modificar a concentração de glicocorticoides de forma indireta. Diante da administração do LPS, houve a evidencia de um comportamento doentio observado por quadros de apatia e semelhante à ansiedade nos animais tratados (ZAVAN, 2011).

É possível que, por provocar a secreção de citocinas e interleucinas pelo sistema imune, o LPS induza a síntese de glicocorticóides e catecolaminas que por sua vez têm o potencial comprovado (DOUGLAS, 2005) de causar a diminuição da expressão de prolactina e progesterona promovendo aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (tipo Th1). Este desbalanço na resposta Th1/Th2 pode levar ao aumento da febre, apatia, ansiedade e depressão, característico do estado doentio, concomitantemente ao aumento do influxo de precursores das células uNK (ZAVAN, 2011) para o útero e indução da citotoxicidade destas células mediada por perforina. Uma forma de tentar minimizar os efeitos oriundos da administração do LPS ao organismo materno frente às mudanças observadas por Zavan (2011), seria o uso de glicocorticoides exógenos com a finalidade de recurso anti-inflamatório. Uma droga plausível de ser usada para obedecer tais parâmetros seria a dexametasona.

A dexametasona se mostrou eficaz com o objetivo de reduzir os efeitos provocados pela administração de lipopolissacarídeos de *Escheria coli* em equinos. Esta droga foi capaz de diminuir a temperatura retal, uma vez que o tratamento apenas com LPS causou febre nos animais, além de atenuar também a neutropenia, a linfopenia e leucopenia cujo surgimento ocorreu devido ao quadro de endotoxemia (ROSA et al, 2003). Foi demonstrada ainda, que em ratas, esse referido glicocorticoide inibe a produção da ciclooxigenase 2 (COX-2), enzima importante na formação de prostaglandina (BROUSSARD et al, 1997).

Dentre os glicocorticoides, a dexametasona se destaca sendo amplamente prescrito para combate a desordens em relação à produção de hormônios córtico-supra-renais, além de ser usada também com finalidade anti-inflamatória. Trata-se de um glicocorticoide sintético cuja fórmula é  $C_{22}H_{29}FO_5$ , pode ser usada também no tratamento de processos alérgicos e em quadros inflamatórios graves (ROMA, 2009). O uso de dexametasona mostrou-se ainda ser capaz de

reduzir drasticamente a secreção de interferon- $\gamma$  pelas células mononucleares, inibindo a secreção do IgM pelas células B (MALLARD et al, 2009).

O uso da dexametasona durante a fase gestacional causa alterações no metabolismo de glicose durante a fase adulta. Isso ocorre devido ao desenvolvimento de fatores resistentes à insulina, comumente associada à redução da síntese dos receptores de insulina (NYRIENDA et al, 1998).

O tratamento com este fármaco é capaz de afetar à embriogênese, sendo capaz de promover reabsorções, implantações de embriões inviáveis. São relatadas ainda interferências como fenda labial e palatal e redução do tamanho do concepto (HANSEN et al, 1999; LABORDE et al, 1992).

Ratas as quais foram expostas à dexametasona durante a prenhez apresentaram queda no peso da progênie. Mais ainda, os machos dessa progênie, quando foram colocados para acasalar, sendo que não houve sequer a manipulação desses animais durante sua própria gestação, originaram filhotes com baixo peso ao nascerem, além de apresentarem intolerância a glucose e elevada atividade hepática, sendo que estes efeitos só foram resolvidos a partir da terceira geração, mostrando, dessa forma, um efeito transgeracional do uso de dexametasona na prenhez (DRAKE; WALKER; SECKEL, 2005).

## 2.4 INIBIDOR DA SÍNTESE DE GLICOCORTICOIDES

A metirapona é um conhecido inibidor da síntese de corticosteroides agindo de modo a bloquear a biossíntese dos referidos hormônios na adrenal. A metirapona é conhecida devido ao seu emprego clínico no diagnóstico de mau funcionamento da hipófise (CHART; SHEPPARD, 1959; CHENG; HARDING; CARBALLEIRA, 1974).

A metirapona possui a capacidade de inibir a 11- $\beta$ -hidroxilase, enzima que converte cortexolona, (também chamada de 11-desoxicortisol ou composto S) em cortisol no córtex da glândula adrenal. O resultado direto da ação da metirapona é uma diminuição significativa dos níveis de cortisol no plasma, além de aumentar a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e um aumento na concentração de cortexolona. Pode-se afirmar que há um aumento da

produção de precursores de 11-desoxicortisol, tal como afirma Dollery (DOLLERY, 1991). Como a metirapona age através do bloqueio da enzima alvo CYP11B1 (11 $\beta$ hidroxilase) impedindo que se haja a produção final de cortisol e corticosterona, há concomitantemente a redução de aldosterona e elevação de 11-desoxicortisol e desoxicorticosterona (DOCA) como efeitos secundários. A elevação de DOCA mantém os efeitos mineralocorticoides impossibilitando que haja a manifestação de hipoaldosteronismo. Outro efeito correlacionado pode ser também a produção de androgênios devido ao acúmulo de metabólitos intermediários à produção de cortisol (CANINI et al, 2009; CHUA et al, 1987; de CATANZARO; KNIPPING; WIGMORE, 1983; PAIVA; RIBEIRO, 2005; TRAINER; BESSER, 1994).

Portanto, a metirapona, cujo nome também pode ser referido como 2-metil-1,2 dipiridin-3-il-1-propanano tem como atribuição primordial a limitação dos níveis de glicocorticoides no sangue. Além disso, como ação secundária, pode-se afirmar que a metirapona também causa a elevação da concentração de precursores do cortisol neurologicamente ativos (CANINI et al, 2009; RAVEN et al, 1996).

Diversos estudos afirmam que a inibição das enzimas adrenocorticais, suprimindo, dessa forma, a produção de cortisol e corticosterona, são responsáveis por desempenharem um papel antidepressivo em pacientes (GHADIRIAN et al, 1995; MURPHY et al, 1991; O'DWYER et al, 1995; WOLKOWITZ et al, 1993), sendo que Raven et al (1996) foram os primeiros na tentativa de buscar explicar os mecanismos relacionados com esse efeito.

Em seus estudos, Raven et al (1995) demonstraram que a capacidade antidepressiva da metirapona deve-se a inibição da atividade do composto 11-oxoredutase de 11- $\beta$ -hidroxiesteroide-dehidrogenase, enzima responsável pela conversão para cortisol e corticosterona.

É possível, portanto, que pelo menos parte do efeito antidepressivo da metirapona seja devido ao aumento da produção de precursores de cortisol neurologicamente ativos. Ou seja, pode-se afirmar que parte do efeito antidepressivo da metirapona seja devido a inibidores adrenais de 11-hidroxilase levando a um aumento na concentração de compostos 11-desoxiesteroides e seus metabólitos (MURPHY, 1991).

Sabe-se que a injeção de metirapona em ratos nos dias 20 e 21 da gestação provoca atrasos no parto, além de produzir prostaglandinas F a partir do útero isolado no 22º dia de gestação (PARNHAM; SNEDDON 1975a, b). O atraso no parto a partir da aplicação da

metirapona pode ser explicado a partir da inibição de produção de prostaglandinas (AIKEN, 1974).

A metirapona age também na inibição da conversão do ácido 14-C-araquidônico para PGE<sub>2</sub>, mas há estímulo para a conversão para PGF (PARNHAM; SNEDDON, 1975a, b). Ou seja, a metirapona age de forma diferente na produção de prostaglandinas, sendo que há estímulo à produção a um tipo enquanto há inibição à síntese de outro tipo.

Parnham (1976) afirma que em baixas doses, a metirapona estimula tanto a produção de PGE quanto a produção de PGF, enquanto que em doses elevadas há estímulo somente para a produção e liberação de PGE, sendo que PGF fica inibida. O autor explica que o estímulo à produção de PGE e PGF em baixas doses de metirapona se deve a inibição do metabolismo de PG. Outra contribuição importante trazida por Parnham (1976) foi o efeito inibitório direto causado pela administração da metirapona no músculo circular do útero de ratas prenhes, sendo que esse efeito, aparentemente, ocorreu de forma dose-dependente. Em baixas doses, a metirapona inibiu a atividade muscular uterina, porém estimulou a produção de prostaglandinas (PARNHAM, 1976).

Outras consequências do uso de metirapona observada dentro de 2 horas após sua administração são: um aumento grande e rápido na concentração de CRF (fator liberador de corticotrofina) e aumento de c-fos mRNA no núcleo hipotalâmico paraventricular; aumento de vasopressina e CRF no sistema porta-hipofisário e um aumento na imunocoloração para c-fos em todo cérebro, especialmente no núcleo paraventricular, no córtex e na amígdala central (CANINI et al, 2009; HERMAN et al, 1992; ROTLLANT et al, 2002).

Embora os glicocorticoides sejam conhecidos por ativarem a locomoção (CADOR; DULLUC; MORMEDE, 1993) e Canini et al (2009) afirmarem que a metirapona induz a uma imediata queda na locomoção e reduz a capacidade exploratória dos ratos no teste de campo aberto, os mesmos autores quando injetaram concomitantemente corticosterona e metirapona nesses animais mostraram que esses efeitos não eram revertidos revelando que a ação da metirapona na locomoção é independente de glicocorticoides (DROUET et al, 2010).

A mifepristona, ou também chamada de mifepristone ou RU-38486, é um antiglicocorticoide sendo considerado com um antagonista dos receptores de glicocorticoides (AGARWAL, 1996). É um composto sintético o qual bloqueia a progesterona no nível de seu receptor. Foi o primeiro composto antagonista de receptores para progesterona aprovado para o

uso clínico e tem sido usado atualmente como droga abortiva de emergência ou droga contraceptiva emergencial (AGARWAL, 1996). Recentemente, foi descoberto que a dosagem requerida para surtir efeitos contraceptivos é menor do que o originalmente proposto (ZHOU et al 2011; CHEN et al, 2010). Os mecanismos exatos que expliquem o efeito contraceptivo da mifepristona permanece ainda por ser elucidado (AGARWAL, 1996; CHEN et al, 2010; ZHOU et al, 2011).

A mifepristona também é chamada de RU-38486 sendo que sua produção iniciou-se a partir do RU-26988 (ADAIKAN; KOTTEGODA, 1984). A mifepristona funciona como antagonista dos receptores de glicocorticoides suprimindo a concentração de cortisol e corticosterona no plasma.

Ainda recentemente, pesquisadores descobriram que baixas doses de mifepristona ingerida diariamente pode inibir o desenvolvimento do endométrio a fim de obter o efeito de contracepção, chamado de endométrio contracepção (NARVEKAR et al, 2004; SPITZ, 2006).

Alguns estudos relatam que mifepristona em doses múltiplas pode afetar o sistema imune, apresentando supressão da proliferação de linfócitos e diminuir a regulação de interleucina-2 (IL-2) (CHEN et al, 2010). Além disso, a mifepristona exibe tanto um comportamento agonista quanto antagonista na liberação de linfócito T. A mifepristona age também afetando alguns marcadores da receptividade do endométrio, reduzindo as taxas de prenhez (DANIELSSON; MARIONS; BYGDEMAN, 2003; LALITKUMAR et al, 2007).

Baixas dosagens de mifepristona podem apresentar um efeito contraceptivo com alguns poucos efeitos colaterais. Administração diária de mifepristona bloqueou o desenvolvimento do endométrio permitindo ciclos ovarianos bifásicos e sangramento regular nas mulheres submetidas ao tratamento. Numa concentração plasmática de 232.7 nmol/L, a mifepristona conseguiu inibir a ovulação (SARKAR, 2002).

A mifepristona quando administrada *in vitro* e em baixas dosagens aumentou o número de células CD56(+)NK e a porcentagem de células CD3(-)CD56(+)CD16(-)NK no endométrio receptivo de humanos. Pesquisadores observaram também que o tratamento com mifepristona aumentou significativamente a citotoxicidade das células natural killer uterinas (uNK) isoladas de úteros gravídicos durante a fase receptiva. Ou seja, o uso de mifepristona em baixas dosagens aumentou a citotoxicidade das células uNK podendo fazer com que haja uma destruição do

microambiente uterino, afetando de modo imunológico o endométrio, prejudicando a gestação (CHEN et al, 2010; ZHOU et al, 2011).

A citotoxicidade das células uNK parece estar significativamente maior em pacientes com abortos habituais quando se comparadas com mulheres saudáveis. Isso leva ao entendimento de que o controle da citotoxicidade é importante para a manutenção da gestação, onde citotoxicidade diminuída parece ser favorável para a gestação (CHEN et al, 2010; ZHOU et al, 2011).

Estudos anteriores em nosso laboratório (ZAVAN, 2011) evidenciaram que após administração LPS intraperitonealmente em camundongos no 10º dia de gestação, os animais apresentaram comportamento apático e ansiogênico. A sugestão para tal acontecimento seria a da indução de ciclooxigenase-2 (COX2) e prostaglandina microssomal sintase 1 (mPGES1) nas células vasculares do cérebro. Tais compostos poderiam ativar o metabolismo de noradrenalina e serotonina, além de aumentar a secreção de CRH, elevando, por consequência, ACTH e os glicocorticoides (BESEDOVSKY et al, 1986; DUNN, 1988).

De acordo com trabalhos anteriores, a administração da dexametasona, um glicocorticoide exógeno, apresenta efeitos benéficos diante do tratamento com lipopolissacarídeo de *Escheria coli*. Porém, a literatura científica ainda carece de informações acerca do uso do respectivo fármaco como pré-tratamento à administração do LPS no período gestacional. Mais ainda, não há trabalhos na literatura que visem o estudo do glicocorticoides sintético, dexametasona, no pré-tratamento ao LPS observando parâmetros comportamentais de fêmeas prenhes. O presente trabalho teve como fito contribuir a fim de diminuir a carência no âmbito científico, observando a interferência desse fármaco no processo gestacional por si só, além de observar também os efeitos diante da combinação com o tratamento com LPS, verificando também a questão comportamental.

Não obstante, há de se especular a interferência da administração do LPS não somente no que diz respeito ao comportamento doentio durante a fase gestacional, mas também sua interferência no processo gestacional *per se*, visto que o LPS ativará o sistema imunológico podendo modificar a tolerância imunológica na interface materno-fetal.

Mais ainda, o presente trabalho foi proposto a fim de investigar a inibição da síntese de glicocorticoides como pré-tratamento, através de mecanismos farmacológicos, com o intuito de observar possíveis alterações na homeostasia gestacional, modificando também, de maneira significativa, o comportamento da fêmea prenhe após a administração do LPS.

Como inibidores da síntese de glicocorticoides, a metirapona e a mifepristona foram as drogas escolhidas, observando a ação de ambas sobre o comportamento doenteio quando administradas em camundongos prenhes no 10º dia gestacional. Para tanto, buscou-se avaliar o comportamento semelhante à ansiedade e depressão, o comportamento de exploração e locomoção, além de observar interferência de tais compostos na viabilidade gestacional.

### **3. OBJETIVOS**

O presente trabalho apresenta os seguintes objetivos geral e específicos:

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito da administração de dexametasona, metirapona e mifeprestone na presença do tratamento com lipopolissacarídeo de *E. coli* sobre a temperatura, comportamento e viabilidade gestacional em camundongos prenhes no 10º ddg.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

O trabalho apresenta os seguintes objetivos específicos:

a) Avaliar o efeito do LPS, dexametasona, metirapona e mifeprestone na temperatura, no comportamento e na viabilidade gestacional de camundongos no 10º ddg;

b) Avaliar os efeitos do tratamento prévio com dexametasona, metirapona e mifeprestone na temperatura, comportamento e viabilidade gestacional de camundongos submetidos a endotoxemia causada pelo LPS no 10º ddg.

### **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

Para execução do presente trabalho foram utilizados métodos descritos detalhadamente a seguir.

#### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 160 camundongos fêmeas virgens da linhagem Swiss, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas-MG, com idades entre 8 e 16 semanas, mantidas sob regime *ad-libidum* de água e ração em *pellets* no biotério do LABAINT da UNIFAL-MG. Foram utilizados outros 10 camundongos machos pertencentes à linhagem Swiss para realização do acasalamento. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de ética no uso e Experimentação Animal (CEUA) da UNIFAL-MG. Protocolo:524/2003.

Os animais tiveram acesso à alimentação e água em regime *ad libitum*, sujeito a regime de claro/escuro de 12 horas, com temperatura e umidade controlados.

As fêmeas virgens foram acasaladas com machos adultos, férteis pertencentes à mesma linhagem, obedecendo à proporção de 3 fêmeas para cada macho, ao final de cada tarde. O dia do diagnóstico do tampão vaginal foi considerado como sendo o 1º dia de gestação (ddg).

#### 4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As fêmeas foram então divididas em 8 grupos experimentais distintos que receberam diferentes injeções intraperitoneais no 10º ddg com intervalos de 30 minutos entre elas. As injeções realizadas no período da manhã. A primeira injeção continha o pré-tratamento com as drogas (Metirapona ou Dexametasona ou Mifepristone) ou ainda Salina, sendo que a segunda injeção continha, respectivamente, salina ou LPS. Os grupos foram divididos conforme a tabela abaixo:

TABELA 1. Grupos experimentais indicando o tratamento, a dosagem das substâncias utilizadas e o número de animais utilizados em cada grupo.

<b>Grupo Experimental</b>	<b>PRÉ-TRATAMENTO + TRATAMENTO</b>	<b>Número de animais</b>
<b>I (controle)</b>	Salina 0,9% + Salina 0,9%	20
<b>II</b>	Salina 0,9% + Lipopolissacarídeo de <i>E. coli</i> (100µg/Kg do animal)	20
<b>III</b>	Metirapona (100mg/kg do animal) + Salina 0,9%	20
<b>IV</b>	Dexametasona (2,5mg/Kg do animal) + Salina 0,9%	20
<b>V</b>	Mefipristone (80 mg/Kg do animal) Salina 0,9%	20
<b>VI</b>	Metirapona (100 mg/kg do animal) + LPS 100µg/Kg do animal	20
<b>VII</b>	Dexametasona (2,5 mg/kg do animal) + LPS 100µg/kg de animal	20
<b>VIII</b>	Mifepristone (80 mg/kg do animal) + LPS 100µg/kg de animal	20

Fonte: do autor

### 4.3 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Após 2 horas de administração da segunda injeção, os animais tiveram suas temperaturas retais aferidas com termômetro digital (BD CONSUMER HEALTHCARE modelo 524036), realizando-se, logo em seguida, os testes comportamentais nos parâmetros de comportamento semelhantes à ansiedade, depressão e alterações na locomoção.

Foram realizados os testes de labirinto em cruz elevado (LCE) com o objetivo de avaliar comportamentos semelhante à ansiedade, o teste de campo aberto (CA) a fim de observar comportamento semelhante à ansiedade e averiguar, de maneira conjunta, a locomoção dos animais, realizando-se também o teste do nado forçado com o objetivo de analisar um possível comportamento depressivo nos animais. Ao todo, 10 animais de cada grupo experimental foram submetidos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado e teste de reconhecimento espontâneo de objetos e outros 10 animais de cada grupo foram sujeitos ao teste do campo aberto e, posteriormente, ao teste do nado forçado.

Os testes de comportamento foram gravados utilizando-se uma câmera de vídeo previamente instalada na sala de comportamento animal do LABAINT na UNIFAL-MG. A fim de evitar que parâmetros externos influenciassem nos resultados, os testes comportamentais foram realizados em ambiente próprio, com luminosidade e temperatura adequadas, objetivando que não houvesse geração de estresse ao animal. Buscando uma correta e eficaz padronização dos testes, todos os experimentos foram realizados pela manhã, preferencialmente no mesmo horário.

#### **4.3.1 Análise do comportamento semelhante à ansiedade**

O labirinto em cruz elevado (LCE) é formado por uma plataforma de madeira constituída por dois braços abertos e dois braços fechados, sendo que cada braço possui 40 cm de comprimento por 10 cm de largura. As paredes laterais dos braços fechados possuem 15 cm de altura. O labirinto é elevado, pois se localiza a 35 cm de altura do solo. O teste de análise comportamental no labirinto consiste em posicionar o animal exatamente no centro do aparato,

com o focinho voltado para um dos braços fechados, deixando que a fêmea do camundongo prenehe percorra livremente o instrumento por um tempo cronometrado de 5 minutos (TOYAMA, 2012).

Parâmetros importantes para a coleta de dados foram observados na avaliação do vídeo como o tempo de permanência nos braços abertos e fechados, o número de entradas nos braços abertos (parâmetros de ansiedade), tempo de permanência na plataforma central (avaliação de risco), número de empinadas (*rearing* ou *rumping*), no qual o animal ergue-se ficando apoiado sobre as duas patas traseiras (parâmetros de atividade locomotora exploratória), número de mergulhos (aspecto etológico no qual o animal examina embaixo dos braços, olhando em direção ao chão) e número de vezes que o animal realizou o *auto-clean* (comportamento de auto-limpeza onde o animal fica parado coçando partes de seu corpo, também chamado de *grooming*), além da frequência de esticar (posição na qual o animal estica todo seu comprimento e retorna à posição original, sem que haja movimentação das patas dianteiras). Tais parâmetros são fundamentais para verificar desvios nos padrões comportamentais entre os animais pertencentes ao grupo controle e aos grupos tratados, verificando-se comportamentos tipicamente ansiolíticos e/ou ansiogênicos (LISTER, 1987).

Os vídeos comportamentais foram analisados com o emprego do software PlusMZ v1.1.

#### **4.3.2 Análise do comportamento semelhante à depressão**

Para detectar comportamento depressivo foi utilizado o teste do nado forçado (“forced swimming test”). Para tanto, foi utilizado um cilindro vertical de vidro, com dimensões de 14 cm de diâmetro e 25 cm de altura, preenchido com água à 30°C até a altura de 20 cm. O volume de água deve permitir que o animal possa nadar ou boiar sem encostar as patas ou a cauda no fundo do recipiente. Para o teste, cada camundongo foi colocado no cilindro por 5 minutos e foi avaliado o tempo de latência com que o animal exhibe o comportamento de boiar e o tempo total boiando (tempo em que o animal faz pequenos movimentos somente para manter a cabeça acima do nível da água). Somente os 4 últimos minutos foram analisados, de acordo com a metodologia de Porsolt (1977).

### 4.3.3 Análise do comportamento semelhante à ansiedade e análise da locomoção

O aparato do campo aberto é constituído por um círculo de acrílico de 90 cm de diâmetro, com paredes de 35 cm de altura. O fundo desta arena é marcado por 4 círculos concêntricos, cortados por 2 retas dividindo a arena em 12 quadrantes disformes. O teste foi realizado introduzindo o animal no centro da arena de experimentação, deixando que o mesmo explorasse livremente por um período de 5 minutos. Durante a realização do teste, não houve a presença do pesquisador no recinto, precavendo-se a fim de que não houvesse geração de estresse para os animais.

Durante a análise do vídeo, o comportamento do animal foi averiguado, medindo-se a frequência do comportamento de levantar, movimento no qual o animal apoia-se sobre as patas traseiras tocando as paredes laterais do cilindro de acrílico, frequência de *grooming* (movimento característico de se coçar, levando as patas dianteiras à região da cabeça ou do corpo), além do número de bolos fecais. Foi analisado também o tempo de exploração dos animais nos quadrantes centrais e periféricos, medindo-se também o número de cruzamentos entre quadrantes periféricos e centrais, além do tempo de latência para o primeiro cruzamento para a periferia. Entre a exposição de um rato e outro é necessário a limpeza do chão da arena com álcool 10% secando bem e deixando circular um pouco de ar. Cumpre-se ressaltar que foi considerado cruzamento entre quadrantes quando o animal coloca suas 4 patas no mesmo (TOYAMA, 2012).

### 4.3.4 Análise de memória

Para proceder a análise do armazenamento temporário de informações e avaliação da memória em curto prazo dos animais, foi realizado o teste do reconhecimento espontâneo dos objetos proposto por Abe H, Ishida Y e Iwaski T (2004). Tal teste comportamental foi realizado de modo sequencial, dividido em três etapas. Para a realização de todas as etapas foi utilizada

uma caixa de madeira de experimentação animal, confeccionada apresentando 65 cm de altura por 40 de comprimento. A caixa tem formato quadrangular e em seu interior será colocada apenas maravalha para forrar o fundo da mesma. A caixa não apresentou iluminação artificial e também não apresentou subdivisões, sendo de campo aberto, possibilitando que o roedor se desloque livremente, de modo a explorar a caixa. Na borda superior em uma das paredes laterais da caixa foi instalada a câmera filmadora que será responsável por registrar e gravar o teste, para posteriormente medir os parâmetros necessários para averiguar as diferenças comportamentais.

Na primeira etapa do teste de memória, etapa de reconhecimento, o animal foi introduzido na caixa de experimentação e deixado no ambiente pelo tempo de 5 minutos para reconhecimento e exploração do ambiente; por esta razão denominada de aclimação.

Após a aclimação, a fêmea foi retirada da caixa de experimentação animal, sendo colocada numa gaiola a parte. Dois objetos (A1 e A2) idênticos foram introduzidos na caixa de experimentação. Nesta segunda etapa, conhecida como etapa teste, o animal foi introduzido na caixa com o focinho voltado para a parede oposta àquela onde os objetos estavam localizados e foi observado seu comportamento por 5 minutos. Foi mensurado o tempo de exploração dos objetos, utilizando-se para isto 2 cronômetros. O tempo de exploração de cada objeto foi somado, resultando num tempo de exploração total ( $AG = A1 + A2$ ).

Terminado o tempo, o animal foi retirado da caixa novamente e um dos objetos foi substituído, fazendo com que houvesse um objeto já familiar ao animal e um objeto novo (A3 e B). É necessário salientar que o intervalo de espera entre a realização de cada etapa foi de 4 minutos, a fim de que não houvesse interferências no padrão etológico do animal e objetivando também que não fosse gerado um estresse ao animal condicionado à submissão ao teste.

Na terceira etapa, conhecida como etapa experimento, a introdução do animal se deu da mesma maneira que descrito para a etapa 2 e o animal permaneceu na caixa executando o teste por 5 min. O tempo de exploração a cada objeto introduzido na caixa foi outra vez mensurado e verificou-se também se existia preferência na exploração ao objeto novo ou ao objeto familiar. Estatisticamente, foi verificado o tempo de exploração global e a taxa de discriminação baseado na diferença entre o tempo gasto na exploração de um novo estímulo, causado pelo objeto B, e o tempo despendido na exploração do objeto familiar (A3), sendo que a fórmula utilizada será:

$$R = B - A3 / B + A3$$

#### 4.4 ANÁLISE DOS NEONATOS

Para aquelas fêmeas na qual a gestação chegou a termo foram avaliados o número médio de filhotes nascidos por ninhada, bem como, as possíveis alterações morfológicas macroscópicas nos mesmos na manhã seguinte ao nascimento.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados obtidos nos testes de comportamento foram realizados testes estatísticos usando o teste ANAVA two-way seguido pelo pós-teste de Neuwman Keuls. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. O tratamento com LPS foi considerado um fator sendo que o pré-tratamento com as drogas utilizados no protocolo experimental foi considerado como sendo o segundo fator. Averiguou-se também, através do referido teste estatístico, a interação entre os dois fatores na composição dos parâmetros analisados. O processo de análise estatística foi conduzido comparando os resultados obtidos entre cada um dos grupos de tratamento com o grupo controle na qual os animais que o compuseram receberam injeção de salina seguida por uma nova injeção, 30 minutos após a primeira, contendo veículo (salina). Valores com  $p < 0,05$  foram considerados como sendo significativos. Houve a comparação também entre o grupo de pré-tratamento (dexametasona; metirapona ou mifepristone) que recebeu como tratamento a injeção contendo veículo com o grupo de pré-tratamento que recebeu como injeção posterior o tratamento com LPS.

Para ambas as análises, empregou-se o programa estatístico Graphpad PRISM 6.0.

## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo para os grupos experimentais acima apresentados estão descritos detalhadamente a seguir, acompanhados dos respectivos gráficos. A fim de organizar sistematicamente a apresentação dos resultados optou-se por apresentá-los em blocos, de modo que cada seção irá conter um fármaco específico demonstrando seus resultados.

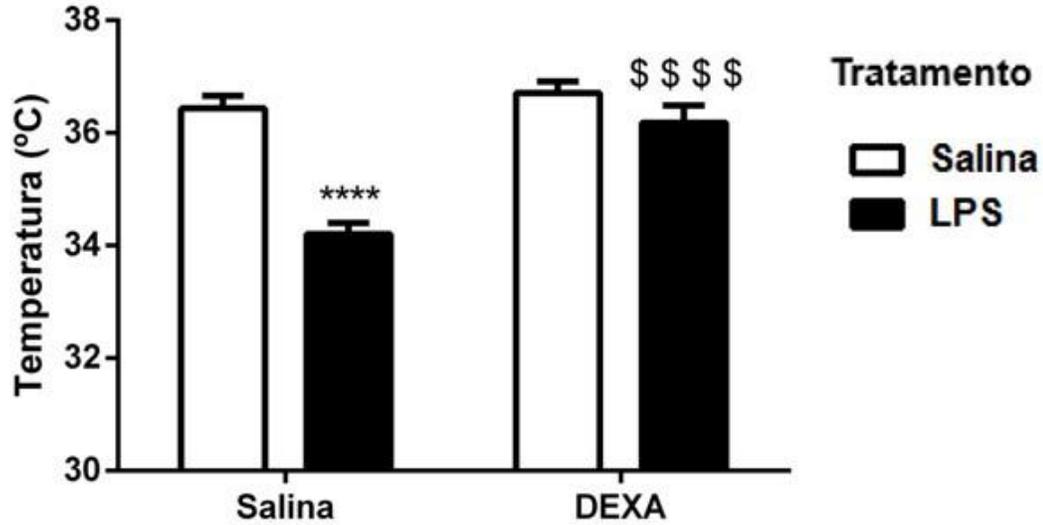
### 5.1 ANÁLISES REFERENTES AOS GRUPOS EXPERIMENTAIS PRÉ-TRATADOS COM DEXAMETASONA SEGUIDAS OU NÃO DA APLICAÇÃO DE LPS

Os resultados pertencentes ao pré-tratamento com dexametasona, seguida ou não da administração da endotoxina *E coli*. serão apresentados a seguir.

#### 5.1.1 Análises da Temperatura Retal

A análise da temperatura retal (figura 1) mostrou que houve diferença significativa nos fatores tratamento com LPS, pré-tratamento com dexametasona, além de mostrar a existência de interação entre ambos os fatores (Fator pré-tratamento  $F(1, 83) = 23.10$ ,  $p < 0.0001$ ; Fator tratamento  $F(1, 83) = 13.34$ ,  $p = 0.0005$ ; Fator interação  $F(1, 83) = 13.34$ ,  $P = 0.0005$ ). O pós-teste revelou que no grupo salina + LPS diminuiu significativamente a temperatura retal em comparação com o grupo salina + salina ( $p < 0.0001$ ;  $q = 9.969$ ). Além disso, o grupo DEXA + LPS apresentou um aumento da temperatura quando comparado com o grupo salina + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 8.587$ ).

**Figura 1-** Gráfico referente à temperatura retal das fêmeas no 10º dg



Fonte: do autor

**Nota:** (\*\*\*\*\*) refere-se a diferença significativa do ponto de vista estatístico, sendo  $p \leq 0.0001$  comparando-se ao grupo controle (salina + veículo). (\$\$\$\$) refere-se a diferença estatística em comparação com o grupo salina + LPS, onde  $p < 0.0001$ .

## 5.1.2 Análise Comportamental

Os resultados obtidos referentes aos testes de comportamento empregados em nossa metodologia apresentar-se-ão a seguir.

### 5.1.2.1 Labirinto em Cruz Elevado

Ao ser analisado os resultados estatísticos provenientes do teste do Labirinto em cruz elevado (Figura 2) dos respectivos grupos experimentais outrora abordados nessa seção foi possível verificar que o fator tratamento com LPS apresentou significância estatística em parâmetros locomotores ou de exploração, como a frequência média de entradas nos braços

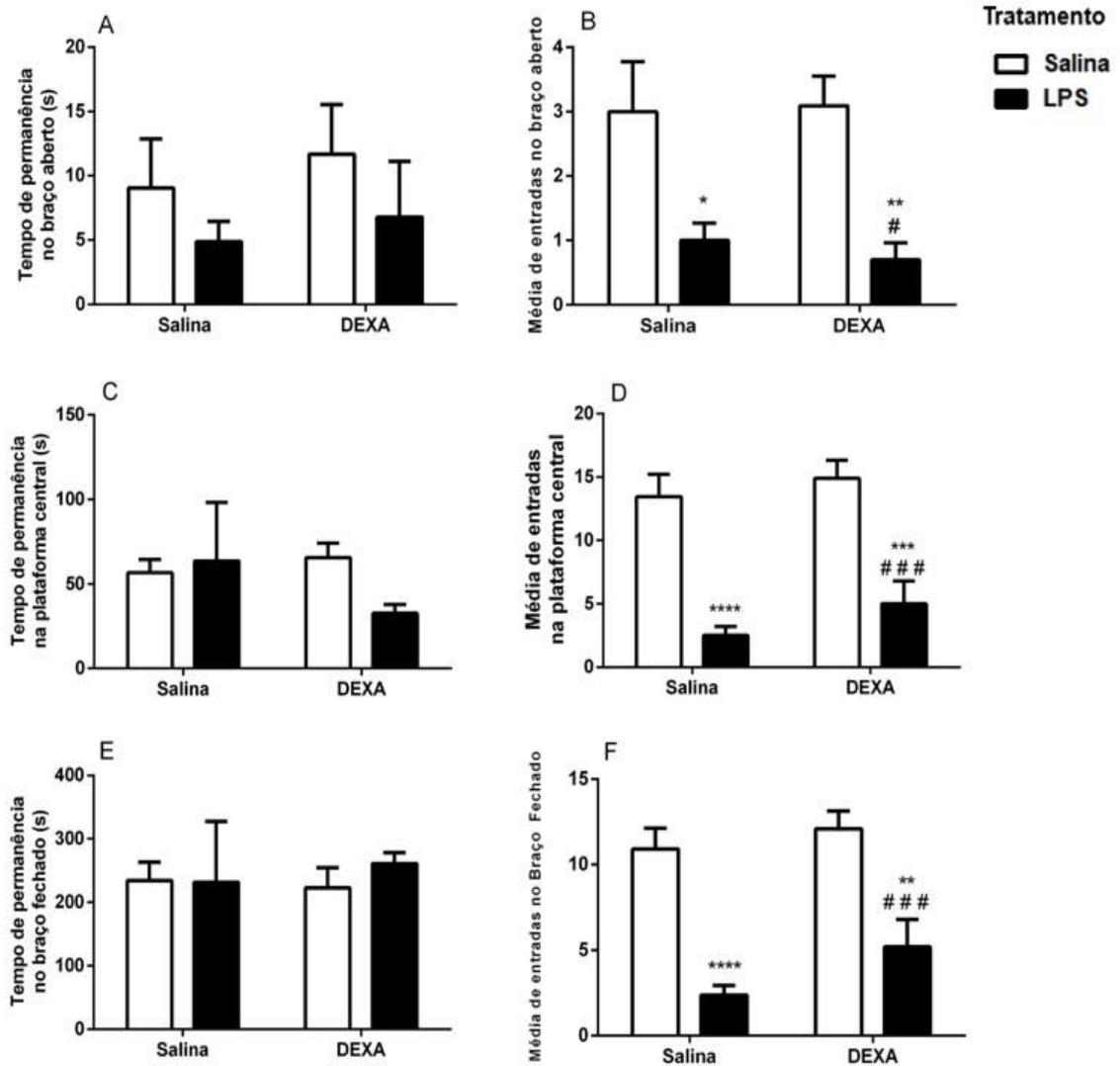
abertos ( $F_{(1, 36)} = 17.23$ ,  $P = 0.0002$ ), na plataforma central ( $F_{(1, 36)} = 43.29$ ;  $P < 0.0001$ ) e também nos braços fechados ( $F_{(1, 36)} = 39.91$ ,  $P < 0.0001$ ).

Mediante a análise do pós-teste, nota-se que o tratamento com LPS causou diminuição na frequência de entradas no braço aberto (Figura 2B) tanto no grupo salina + LPS quando comparado ao grupo controle ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.670$ ) tanto no grupo DEXA + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.489$ ). Ainda nesse aspecto, percebe-se que o grupo DEXA+LPS é divergente do grupo DEXA + salina ( $p < 0.05$ ;  $q = 4.666$ ) causando, também diminuição na frequência média de entradas no braço aberto.

Já na frequência de entradas da plataforma central (Figura 2D), tanto no grupo salina + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 6.705$ ) tanto no grupo DEXA + LPS ( $p < 0.001$ ;  $q = 5.502$ ) quando comparados ao grupo controle, apresentaram redução na média de entradas. Nota-se também, nesse parâmetro analisado, que o grupo DEXA + LPS também apresentou redução na média de entradas na plataforma central, quando comparado com o grupo DEXA + salina ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.453$ ).

Já no que diz respeito à análise do parâmetro de entradas no braço fechado (Figura F), o pós-teste foi capaz de identificar a redução significativa no número de entradas nesse braço nos grupos salina + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 6.786$ ) e DEXA + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.828$ ) quando comparado ao grupo controle. Cumpre ressaltar que o grupo DEXA + LPS apresentou também diferença significativa, apresentando redução no número de entradas, ao ser comparado com o grupo DEXA + salina ( $p < 0.001$ ;  $q = 5.826$ ).

**Figura 2-** Gráficos referentes ao tempo de exploração e frequência média de entradas no Labirinto em cruz elevado



Fonte: do autor

**Nota:** (A-F) Gráficos referentes à exploração e frequência de entradas no LCE no qual o eixo das abcissas corresponde ao pré-tratamento. (A) Tempo de permanência no braço aberto. (B) Média de entradas no braço aberto. (C) Tempo de permanência na plataforma central. (D) Média de entradas na plataforma central. (E) Tempo de permanência no braço fechado. (F) Média de entradas no braço fechado. (\*) refere-se à diferença estatística onde  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  sendo todos comparados com o grupo controle (salina + veículo). Já (#) simboliza a diferença estatístico cujo  $p < 0.05$ ; (###) representa  $p < 0.001$  sendo ambos comparados com o grupo DEXA + salina

Já as análises complementares dos comportamentos exibidos pelas fêmeas prenhes submetidas ao teste do Labirinto em cruz elevado encontram-se dispostos na Figura 3.

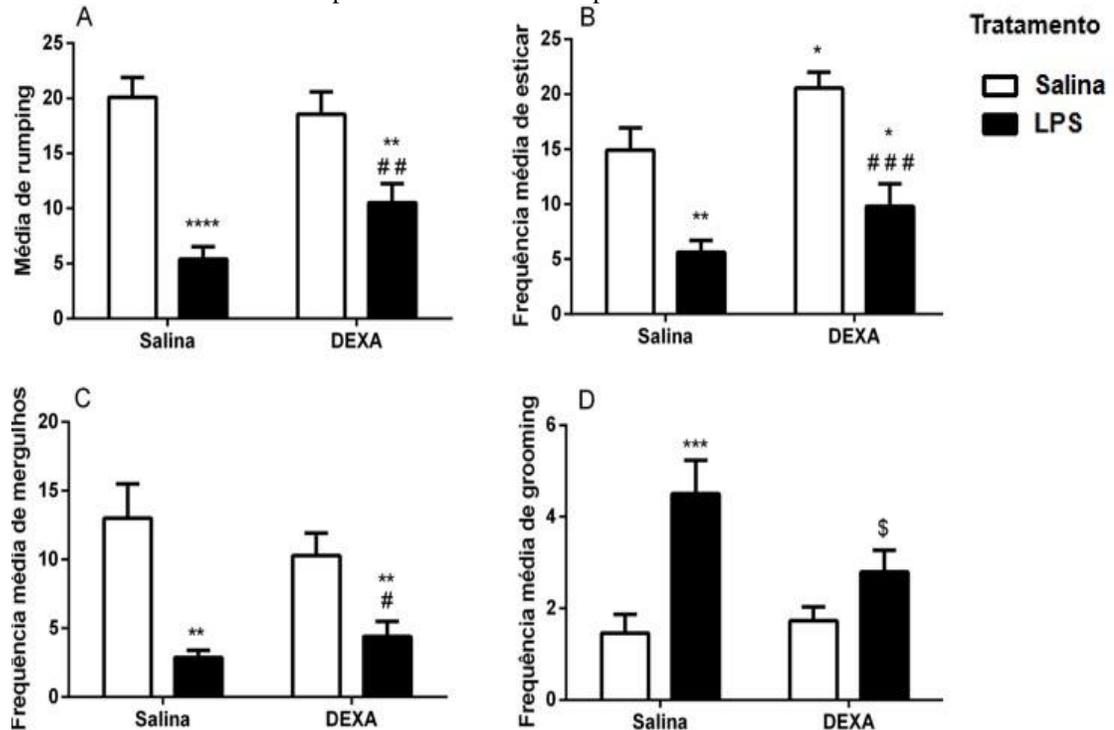
De posse das análises referentes aos parâmetros complementares desempenhados pelos animais submetidos ao teste do Labirinto em cruz elevado, nota-se que o tratamento com LPS foi capaz de alterar de modo significativo diversos parâmetros, sobretudo aqueles relacionados com a exploração/locomoção.

A análise estatística através da ANOVA *two-way* revelou-nos que o fator tratamento com LPS apresenta efeito significativo nos parâmetros de frequência de rumping ( $F_{(1, 36)} = 39.53$ ,  $P < 0.0001$ ), frequência de movimentos de esticar ( $F_{(1, 36)} = 31.57$ ,  $P < 0.0001$ ), frequência de mergulhos ( $F_{(1, 36)} = 20.37$ ;  $P < 0.0001$ ) e frequência de *grooming* ( $F_{(1, 36)} = 19.12$ ;  $P = 0.0001$ ). O fator pré-tratamento com dexametasona, por sua vez, só apresentou significância estatística no parâmetro de frequência de movimentos de esticar ( $F_{(1, 36)} = 7.577$ ,  $P = 0.0092$ ). Além do mais, o teste indicou que há interação entre ambos os fatores apenas na análise da frequência média de *grooming* ( $F_{(1, 36)} = 4.384$ ,  $P = 0.0434$ ). Nos demais parâmetros analisados não há efeito significativo do fator pré-tratamento e nem tão pouco há interação entre os fatores.

No que diz respeito à análise da frequência média de *rumping* (Figura 3A) pode-se afirmar que tanto o grupo salina + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 7.890$ ), quanto no grupo pré tratado com DEXA + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.468$ ) há redução significativa da frequência de *rumping* em comparação com o grupo controle. Nota-se também que o grupo DEXA + LPS também apresenta redução nesse parâmetro analisado em comparação com o grupo que recebeu apenas a dexametasona (DEXA + salina;  $p < 0.01$ ;  $q = 4.590$ ).

Já no que diz respeito à frequência média de esticar (Figura 3B), os grupos salina + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.055$ ) e DEXA + LPS ( $p < 0.05$ ;  $q = 2.959$ ), em comparação com o grupo controle, apresentam significativa diminuição na frequência média de esticar. Além disso, o grupo DEXA + LPS também apresenta redução, em comparação com o grupo DEXA + salina ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.2254$ ), diminuindo, portanto, a frequência de esticar. Porém, nota-se que o grupo DEXA + salina ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.346$ ) apresenta aumento na frequência de movimentos de esticar, quando comparado ao grupo controle. Nesse caso, portanto, a própria administração da dexametasona é capaz de elevar a média de movimentos de esticar no labirinto elevado.

**Figura 3-** Gráfico referente ao comportamento dos animais prenhes no teste do Labirinto em cruz elevado



Fonte: do autor

**Nota:** (A-D) Gráficos referentes às medidas adicionais no LCE. (A) Média de *rumping*. (B) Frequência média de esticar. (C) Frequência média de mergulhos (D) Frequência média de *grooming*. (\*) refere-se à diferença estatística existente onde  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$ ; e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  quando submetidos à comparação com o grupo salina + veículo (grupo controle). O uso de (#) simboliza a diferença estatístico cujo  $p < 0.05$ ; (##) representa  $p < 0.01$  e (###) representa valores onde  $p < 0.001$  sendo a comparação realizada mediante ao grupo DEXA + salina. Já (\$) representa valores de  $p < 0.05$  quando é realizada a comparação com o grupo salina + LPS.

Já no que diz respeito à frequência média de esticar (Figura 3B), os grupos salina + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.055$ ) e DEXA + LPS ( $p < 0.05$ ;  $q = 2.959$ ), em comparação com o grupo controle, apresentam significativa diminuição na frequência média de esticar. Além disso, o grupo DEXA + LPS também apresenta redução, em comparação com o grupo DEXA + salina ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.2254$ ), diminuindo, portanto, a frequência de esticar. Porém, nota-se que o grupo DEXA + salina ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.346$ ) apresenta aumento na frequência de movimentos de esticar, quando comparado ao grupo controle. Nesse caso, portanto, a própria administração da dexametasona é capaz de elevar a média de movimentos de esticar no labirinto elevado.

A análise da frequência média de mergulhos (Figura 3C), através da realização do pós-teste, indica redução desse parâmetro entre os grupos salina + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.546$ ) e o grupo DEXA + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.010$ ) e o grupo controle. O grupo DEXA + LPS apresenta também uma redução significativa na frequência média de mergulhos no labirinto elevado em relação ao grupo DEXA + veículo ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.419$ ).

Já a análise da frequência de *grooming* (Figura 3D), nos animais pré-tratados apenas com salina e que posteriormente receberam LPS (salina + LPS), percebe-se que tal parâmetro analisado aumentou significativamente quando comparado com o grupo controle [salina + LPS ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.276$ )]. O DEXA + LPS foi capaz de apresentar uma diminuição na frequência média de grooming, fazendo-o retornar aos valores semelhantes ao controle ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.432$ ).

#### 5.1.2.2 Teste do Campo Aberto

O teste estatístico utilizado por nosso desenho experimental revelou que o fator o tratamento com LPS causou efeito significativo nos seguintes parâmetros: tempo de permanência nos quadrantes periféricos ( $F_{(1, 37)} = 14.34$ ,  $P = 0.0005$ ); número de cruzamentos entre quadrantes periféricos ( $F_{(1, 37)} = 37.38$ ,  $P < 0.0001$ ), tempo de permanência nos quadrantes centrais ( $F_{(1, 37)} = 14.36$ ,  $P = 0.0005$ ), número de cruzamentos entre os quadrantes centrais ( $F_{(1, 35)} = 32.78$ ,  $P < 0.0001$ ), número de cruzamentos entre centro e periferia ( $F_{(1, 37)} = 32.08$ ,  $P < 0.0001$ ), número total de cruzamentos ( $F_{(1, 37)} = 48.13$ ;  $P < 0.0001$ ). Nesses parâmetros analisados não foram observados efeitos significativos do fator pré-tratamento nem tão pouco foi observada a interação entre os fatores.

Na análise do tempo de permanência nos quadrantes periféricos, o pós-teste identificou que o grupo salina + LPS apresentou redução significativa na exploração (Figura 4A). Os animais pertencentes ao grupo salina + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.562$ ), em relação ao grupo controle, diminuiu significativamente esse tempo de permanência.

Mediante a análise do número de cruzamentos entre os quadrantes periféricos realizado pelos animais que foram expostos ao teste do campo aberto (Figura 4B), o grupo salina + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.438$ ) e o grupo DEXA + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.798$ ) em comparação com o grupo

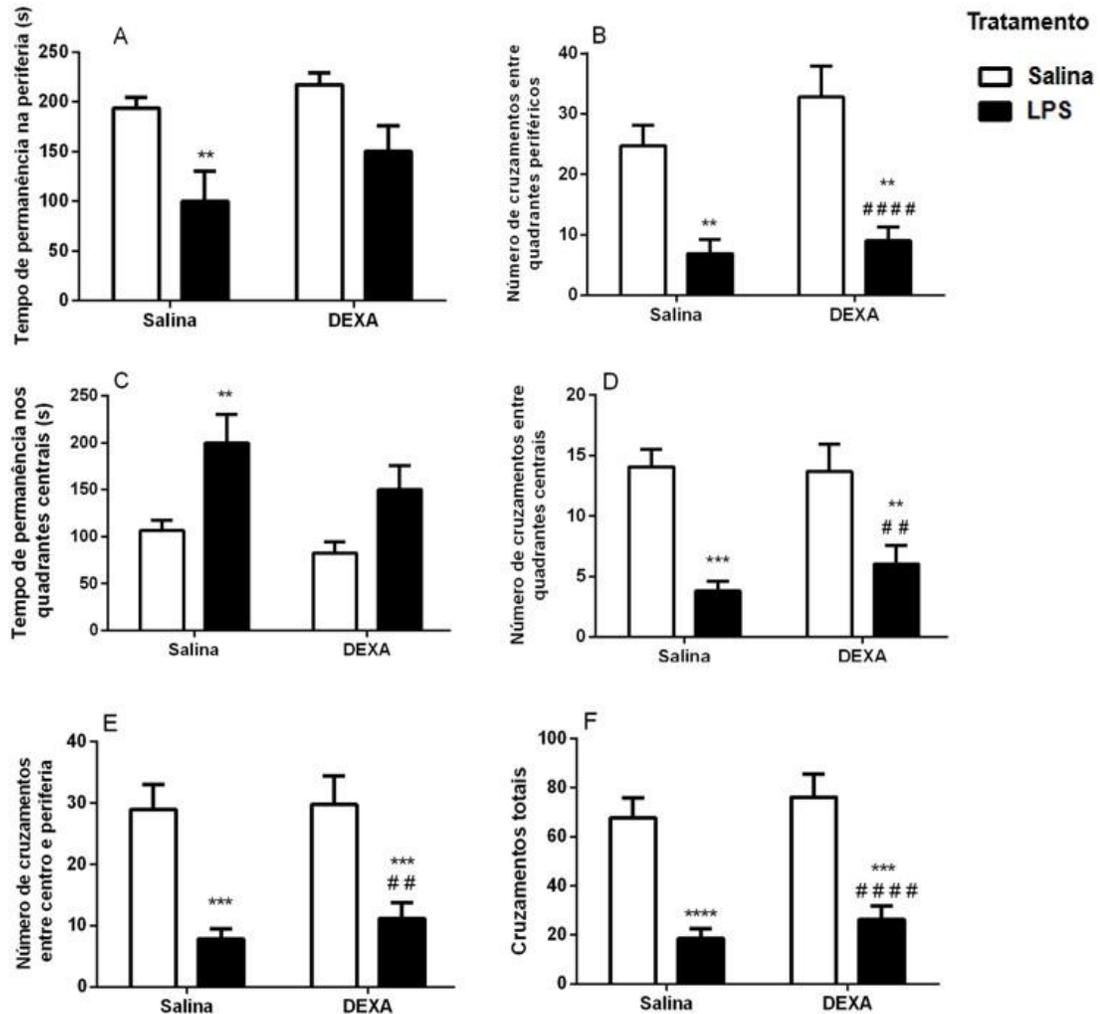
controle (salina + salina), apresentaram uma diminuição do número de cruzamentos periféricos significativa. Além disso, o grupo DEXA + LPS quando comparado ao grupo DEXA + salina ( $p < 0.0001$ ;  $q = 6.751$ ) também apresentou queda significativa no parâmetro em análise.

Outro parâmetro importante analisado no teste do campo aberto foi o tempo de permanência nos quadrantes centrais (Figura 4C). Houve significativo aumento no tempo de exploração no centro quando comparado ao grupo salina + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.563$ ).

Já no que diz respeito à análise do número de cruzamentos centrais realizados pelos animais submetidos ao teste do campo aberto (Figura 4D) nota-se, mais uma vez, que o tratamento com LPS causou efeito diminuindo tal parâmetro nos grupos salina + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 6.649$ ) e DEXA + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.226$ ) em relação ao grupo controle. Há ainda diminuição no número de cruzamentos centrais quando se compara o grupo DEXA + LPS ao grupo DEXA + salina ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.828$ ).

Outro parâmetro alterado através do tratamento com LPS é o número de cruzamentos entre centro e periferia (Figura 4E). O pós-teste é capaz de revelar que o grupo salina + LPS ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.250$ ) e o grupo DEXA + LPS ( $p < 0.001$ ;  $q = 5.244$ ) apresentam diminuição acentuada do número de cruzamentos quando comparados ao controle. Além disso, nota-se que o grupo DEXA + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.124$ ) ao ser comparado com o grupo DEXA + salina também apresenta significativa redução no número de cruzamentos entre centro e periferia.

**Figura 4** – Gráficos referentes à análise comportamental dos animais prenhes expostos ao teste do campo aberto



Fonte: do autor

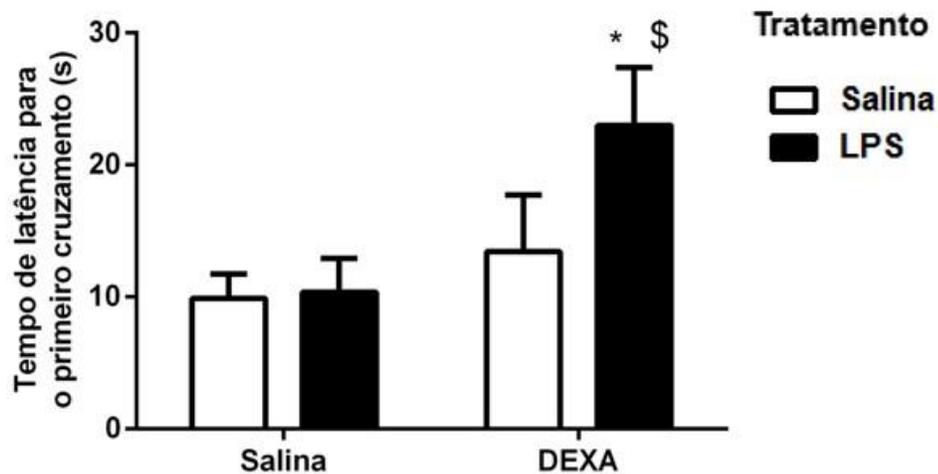
**Nota:** (A-F) Gráficos referentes ao tempo de permanência e à exploração dos animais dos grupos experimentais no teste do campo aberto. O eixo das abcissas representa o pré-tratamento. (A) Tempo de permanência na periferia. (B) Número de cruzamentos entre quadrantes periféricos. (C) Tempo de permanência nos quadrantes centrais. (D) Número de cruzamentos entre quadrantes centrais. (E) Número de cruzamentos entre centro e periferia. (F) Número de cruzamentos totais. A adoção do símbolo (\*) refere-se à diferença estatística existente onde  $p < 0.05$ ; (\*\*) diz respeito a valores de  $p < 0.01$ ; (\*\*\*) representa  $p < 0.001$ ; e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  quando submetidos à comparação com o grupo salina + salina (grupo controle). A utilização de (##) representa quando há diferença significativa estatisticamente cujo valores de  $p < 0.01$  e (####) representa valores onde  $p < 0.0001$  sendo a comparação realizada mediante ao grupo DEXA + salina

Ao se analisar o número de cruzamentos totais exibido pelos animais expostos ao campo aberto (Figura 4F), nota-se que o grupo salina + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 7.148$ ) e animais pertencentes ao grupo DEXA + LPS ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.030$ ) apresentam significativa diminuição

no número de cruzamentos; Nota-se, também, que o grupo DEXA + LPS é significativamente diferente ( $p < 0.0001$ ;  $q = 6.750$ ) do grupo DEXA + salina), uma vez que a redução no número totais de cruzamento é acentuada.

Outro parâmetro importante no que diz respeito à análise do campo aberto é o tempo de latência para que o animal realize o primeiro cruzamento quando recém exposto ao aparato. Tal informação encontra-se presente na Figura 5.

**Figura 5-** Gráfico referente ao tempo de latência, em segundos, para o primeiro cruzamento no teste do campo aberto



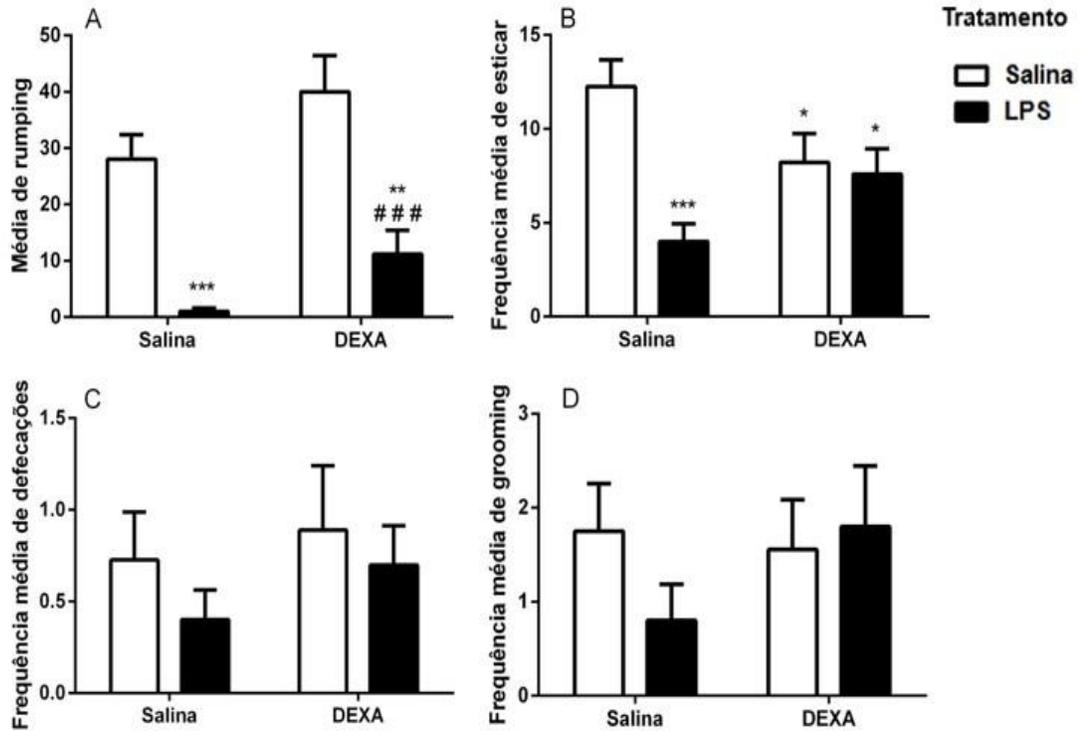
Fonte: do autor

**Nota:** Gráfico referente ao tempo de latência para o primeiro cruzamento. O eixo das abcissas representa o pré-tratamento. (\*) denota à diferença estatística existente onde  $p < 0.05$ . No uso de (\$) considera-se diferença estatística significativa existente na comparação com o grupo salina + LPS, cujo  $p < 0.05$ .

Ao analisar o tempo de latência necessário para o primeiro cruzamento (Figura 5), nota-se que houve efeito significativo do fator pré-tratamento com dexametasona ( $P = 0.0189$ ;  $F_{(1, 37)} = 6.031$ ). Análise estatística posterior revelou-nos que o grupo DEXA + LPS diferencia-se significativamente do grupo controle ( $p < 0.05$ ;  $q = 4.128$ ) e diferencia-se também do grupo salina + LPS ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.810$ ), sendo que o tempo necessário para que os animais pertencentes ao grupo DEXA + LPS realizem o primeiro cruzamento é maior, em segundos, do que o controle e o próprio grupo tratado apenas com LPS (salina + LPS).

Parâmetros comportamentais adicionais exibidos pelos animais pré-tratados com dexametasona e expostos ao campo aberto também foram mensurados e encontram-se dispostos graficamente na Figura 6.

**Figura 6** – Gráficos referentes aos padrões comportamentais de camundongos prenhes expostos ao teste do campo aberto



Fonte: do autor

**Nota:** Gráfico referente às medidas complementares observadas em camundongos prenhes submetidos ao teste do campo aberto. O eixo das abcissas representa o pré-tratamento. (A) Média de *rumping* no teste do campo aberto. (B) Frequência de esticar. (C) Frequência de defecações no campo aberto. (D) Frequência de *grooming* no teste do campo aberto. (\*) represente diferença significativa existente em comparação com o grupo controle (salina + veículo), cujo  $p < 0.05$ ; (\*\*) representa valores onde  $p < 0.01$  e (\*\*\*) valores onde  $p < 0.001$  sendo comparativos ao grupo salina + salina. (###) representa valores de  $p < 0.001$  quando se comparados com o grupo DEXA + salina

Ao serem analisadas as medidas etológicas complementares no teste do campo aberto, foi constatado que o fator tratamento com LPS exerceu efeito significativo nos seguintes parâmetros: frequência de movimentos de *rumping* ( $F_{(1, 37)} = 41.00, P < 0.0001$ ) e frequência de esticar ( $F_{(1, 37)} = 10.92, P = 0.0021$ ). Já o fator pré-tratamento apresentou significância apenas na frequência média de *rumping* ( $F_{(1, 37)} = 6.490, P = 0.0151$ ). Foi relatado ainda que houve interação

significativa entre os fatores no parâmetro de frequência média de movimentos de esticar ( $F_{(1, 37)} = 8.072$ ;  $P = 0.0073$ ).

Análises *post-hoc* identificou uma diminuição significativa na média de *rumpings* (Figura 6A) no grupo salina + LPS ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.427$ ) e também no grupo DEXA + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 3.999$ ) em comparação com o grupo controle (salina + veículo). O grupo DEXA + LPS também apresentou redução significativa mediante comparação com o grupo DEXA + salina ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.389$ ).

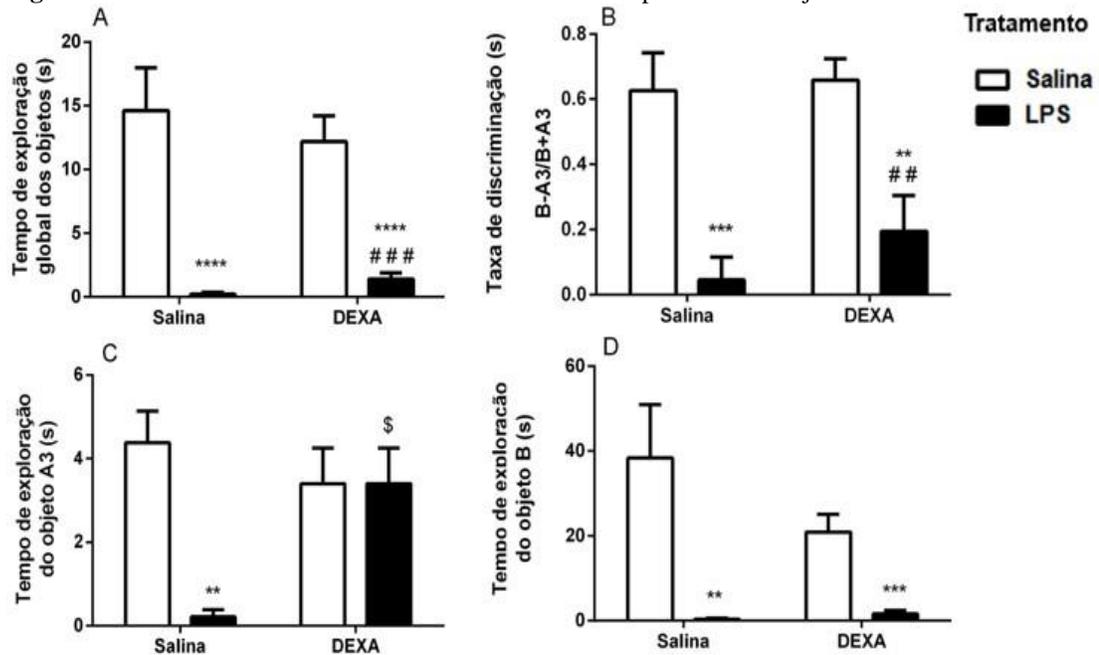
Já a análise da frequência média de esticar demonstrou que o tratamento que animais pertencentes ao grupo salina + LPS ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.374$ ) ao ser comparado com o grupo salina + veículo apresentaram em diminuição brusca na frequência de esticar (Figura 6B). O grupo DEXA + salina ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.022$ ) juntamente como o grupo DEXA + LPS ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.593$ ) são diferentes ao serem comparados com o grupo controle, exibindo um padrão comportamental de diminuição na frequência média de movimentos de esticar no teste do campo aberto.

Nas análises da frequência média de defecações e frequência de grooming em animais expostos ao teste do campo aberto não foram encontradas diferenças significativas.

### 5.1.2.3 Teste de Reconhecimento Espontâneo dos Objetos

A fim de detectar alterações na retenção de informações a curto prazo ocasionados devido ao pré-tratamento com dexatametasona foi realizado o teste de reconhecimento espontâneo dos objetos cujos resultados obtidos encontram-se ilustrados na Figura 7.

**Figura 7** – Gráficos relativos ao teste de reconhecimento espontâneo de objetos



Fonte: do autor

**Nota:** Gráficos referentes ao teste de reconhecimento espontâneo de objetos. O eixo das abcissas representa o pré-tratamento. (A) Tempo de exploração global dos objetos. (B) Taxa de discriminação dos objetos. (C) Tempo de exploração do objeto A3. (D) Tempo de exploração do objeto B. (\*\*) representa valores de  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  quando os grupos experimentais são comparados com o grupo controle (salina + veículo). (##) representa valores de  $p < 0.01$  e (###)  $p < 0.001$  quando comparativos ao grupo DEXA + salina. O uso de (\$) representa valores obtidos de  $p < 0.05$  quando comparados com o grupo salina + LPS.

Na análise do teste de reconhecimento espontâneo de objetos encontra-se informações importantes acerca da exploração dos objetos por parte dos animais. Nessa análise, afirma-se através do teste de ANOVA two-way que o tratamento com o LPS causou um efeito significativo no tempo de exploração global ( $F_{(1, 38)} = 42.79, P < 0.0001$ ). O fator de tratamento com LPS também apresentou significância na taxa de discriminação dos objetos ( $F_{(1, 38)} = 31.07, P < 0.0001$ ), no tempo de exploração do objeto A3 ( $F_{(1, 38)} = 8.067, P = 0.0072$ ) e no tempo de exploração do objeto B ( $F_{(1, 38)} = 20.20, P < 0.0001$ ). Já o fator pré-tratamento com dexametasona, no teste de reconhecimento espontâneo de objetos, não apresentou efeito significativo sob nenhum parâmetro. Além disso, afirma-se que há interação entre os fatores no que diz respeito ao tempo de exploração do objeto A3 ( $F_{(1, 38)} = 8.067, P = 0.0072$ ).

Na figura 7A nota-se ilustrado o gráfico representativo da etapa 2 do teste, etapa denominada de etapa teste, na qual é mensurado a exploração global dos objetos por parte dos animais. Tal resultado é obtido a partir da soma do tempo de exploração dos objetos (A1+A2). A análise do pós-teste indica-nos que há uma diminuição do tempo de exploração global nos animais pertencentes ao grupo salina + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 7.315$ ) e também em animais pertencentes ao grupo DEXA + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 6.864$ ) quando comparados ao grupo controle (salina + veículo). O grupo DEXA + LPS também se diferencia do grupo DEXA + salina ( $p < 0.001$ ;  $q = 5.735$ ) tendo uma diminuição significativa do tempo de exploração dos objetos introduzidos no aparato durante esta etapa em relação do grupo que recebeu como pré-tratamento a dexametasona e posteriormente uma injeção contendo veículo.

Já na figura 7B tem-se representado a terceira etapa do teste de reconhecimento espontâneo de objetos analisando especificamente a taxa de discriminação. Nesse caso, através da fórmula anteriormente apresentada, calcula-se o tempo gasto na exploração do objeto sob a relação do tempo despendido na exploração do objeto familiar. Percebe-se, que o grupo salina + LPS ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.053$ ) além do grupo DEXA + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.604$ ), quando comparados com o grupo controle, apresentam uma diminuição significativa da taxa de exploração. Outro ponto de importante destaque é que o grupo DEXA + LPS também apresenta redução na taxa de discriminação quando comparado ao grupo DEXA + salina ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.076$ ).

No que concerne a exploração do objeto A3, ilustrado no gráfico da figura 7C, a análise estatística traz à tona que o tratamento com LPS no grupo salina + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.550$ ) em relação ao grupo controle, apresentou significativa queda no tempo de exploração do objeto familiar. O grupo DEXA + LPS ( $p < 0.05$ ;  $q = 4.345$ ) comparado, por sua vez, com o grupo salina + LPS apresenta uma recuperação no tempo de exploração do objeto A3 sendo semelhante ao controle, existindo um aumento no tempo de exploração do referido objeto.

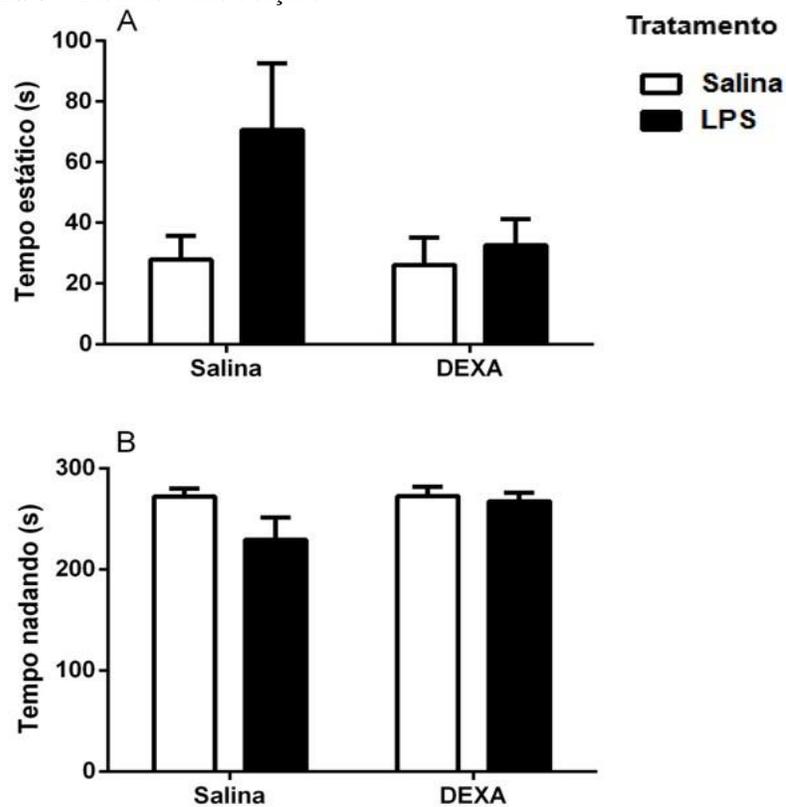
No gráfico ilustrado pela figura 7D tem-se o tempo, em segundo, de exploração do objeto novo, simbolizado por objeto B, introduzido na terceira etapa do teste de reconhecimento espontâneo de objetos. Ao ser procedido o pós-teste são obtidas informações a respeito das comparações entre os grupos experimentais, os quais nos indicam que o grupo salina + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.824$ ) e o grupo DEXA + LPS ( $p < 0.001$ ;  $q = 5.764$ ) apresentaram queda significativa

no tempo de exploração ao objeto novo, se comparados aos animais pertencentes ao grupo controle.

#### 5.1.2.4 Teste do Nado Forçado

Através da análise dos gráficos obtidos no teste percebe-se que não há diferença, do ponto de vista estatístico, no que diz respeito ao tempo, em segundos, em que os animais pertencentes aos grupos experimentais descritos acima ficam estáticos (figura 8A). Não há também alterações significativas no tempo que os animais submetidos ao protocolo experimental passam nadando quando são introduzidos no nado forçado (figura 8B).

**Figura 8** – Teste do Nado Forçado



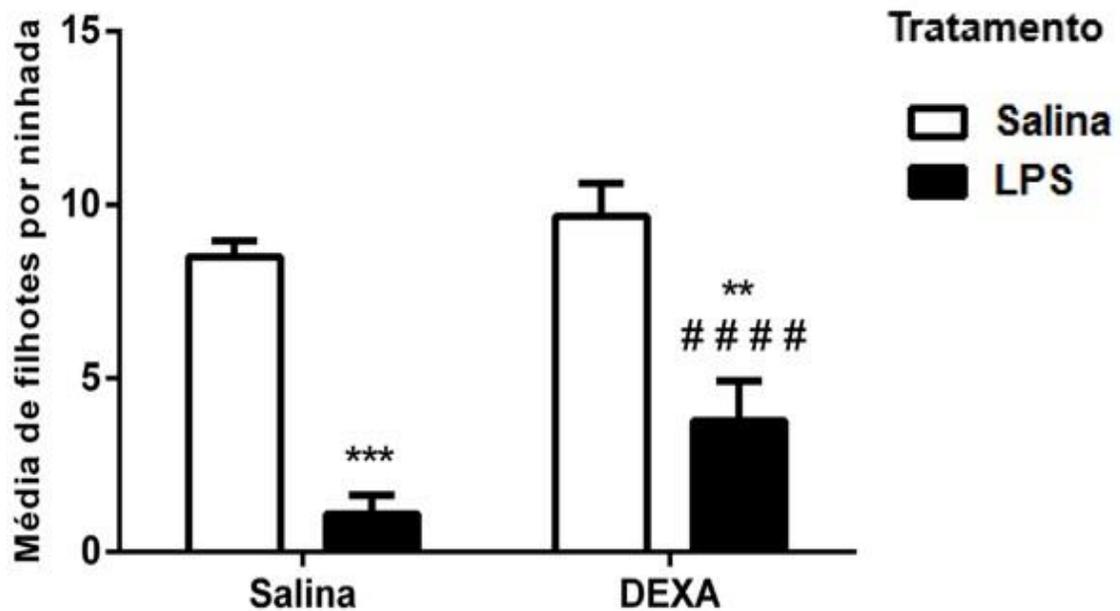
Fonte: do autor

**Nota:** Gráficos referentes ao teste do nado forçado nos animais submetidos ao protocolo experimental. O eixo das abcissas representa o pré-tratamento utilizado. (A) Tempo estático, em segundo, no teste do nado forçado. (B) Tempo nadando, em segundos, no teste do nado forçado.

### 5.1.2.5 Análise da ninhada

Pela análise do tamanho da ninhada tem-se que o fator tratamento com LPS apresenta efeito significativo ( $F_{(1, 51)} = 38.09$ ,  $P < 0.0001$ ). Já o fator pré-tratamento também apresenta significância estatística ( $F_{(1, 53)} = 8.681$ ,  $P = 0.0048$ ). Além disso, a interpretação do teste estatístico conferiu a informação de que há interação entre ambos os fatores ( $F_{(1, 53)} = 5.873$ ,  $P = 0.0188$ ).

Figura 9 – Análise da ninhada



Fonte: do autor

**Nota:** Gráfico referente ao número médio de filhotes nascidos por ninhada. O eixo das abcissas representa o pré-tratamento utilizado. (\*\*) representa diferença significativa cujo os valores de  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$  quando se comparados ao grupo salina + veículo. (####) foi usado para indicar a diferença significativa existe mediante a comparação com o grupo DEXA + salina cujo valores de  $p < 0.0001$ .

A figura 9 apresenta os resultados acerca do o número de filhotes nascidos por ninhada. Na comparação com o grupo controle, o grupo salina + LPS apresenta significativa queda no número de filhotes nascidos ( $p < 0.001$ ;  $q = 5.984$ ). Já o grupo DEXA + LPS também apresenta

redução significativa no número de filhotes nascidos a cada ninhada ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.171$ ) quando comparados ao grupo salina + salina. Ainda a respeito do grupo DEXA + LPS nota-se que ele também apresenta redução significativa no número de filhotes quando a comparação é realizada com o grupo DEXA + veículo ( $p < 0.0001$ ;  $q = 6.631$ ).

## 5.2 ANÁLISES REFERENTES AOS GRUPOS EXPERIMENTAIS PRÉ-TRATADOS COM METIRAPONA SEGUIDAS OU NÃO DA APLICAÇÃO DE LPS

A fim de abordar os resultados obtidos no emprego do inibidor da síntese de corticosterona, metirapona, no presente trabalho inicia-se tal seção.

### 5.2.1 Análise da temperatura retal

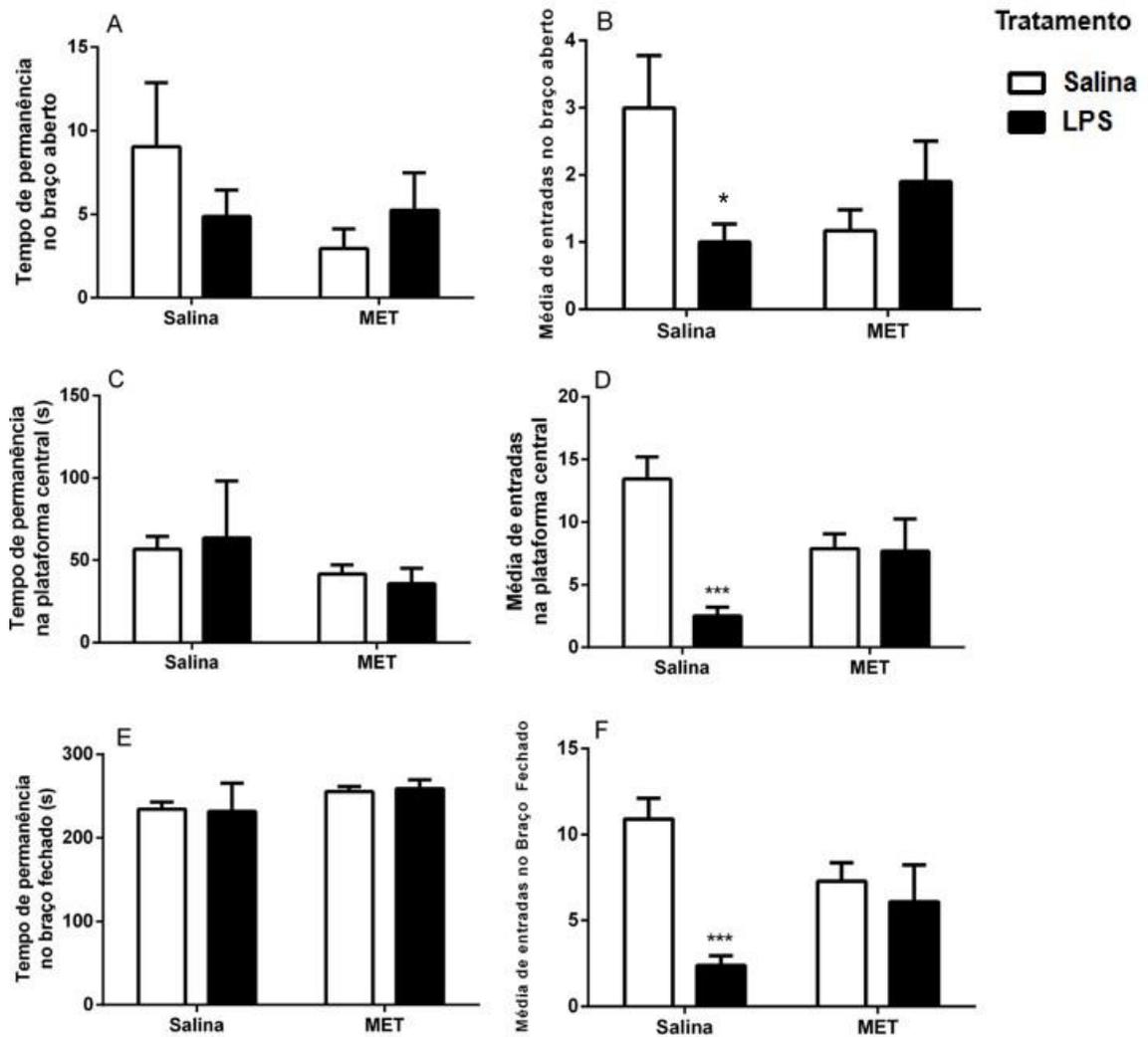
Na figura 10 encontra-se o gráfico referente à temperatura retal dos animais submetidos ao protocolo experimental delineado anteriormente.

De posse dos dados obtidos através da mensuração da temperatura retal das fêmeas prenhes submetidas ao modelo experimental em questão tem-se que o tratamento com LPS, o fator pré-tratamento e a interação entre ambos os fatores foi significativo mediante a realização do ANOVA *two-way* (F tratamento  $(1, 85) = 50.33$ ,  $P < 0.0001$ ; F pré-tratamento  $(1, 85) = 12.33$ ,  $P = 0.0007$ ; F interação  $(1, 85) = 12.00$ ,  $P = 0.0008$ ). Na análise através do emprego do pós-teste em relação à temperatura retal (Figura 10), pode-se evidenciar que o grupo salina + LPS ao ser comparado com o grupo controle apresenta redução significativa de sua temperatura retal ( $p < 0.0001$ ;  $q = 10.88$ ). Ao ser comparado com o grupo controle, percebe-se que também há diferença no grupo MET + LPS ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.446$ ) notando a diminuição da temperatura retal também. Ainda a respeito do grupo MET + LPS nota-se que sua temperatura retal é significativamente diferente do grupo MET + salina ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.527$ ), havendo diminuição na



Os resultados obtidos mediante à execução e análise do teste do labirinto em cruz elevado encontram-se representados na figura 11.

**Figura 11** - Gráficos referentes ao tempo de exploração e frequência média de entradas no Labirinto em cruz elevado



Fonte: do autor

**Nota:** Gráficos referentes ao comportamento dos animais prenhes expostos ao Labirinto em cruz elevado. O eixo das abcissas compreende o pré-tratamento utilizado. (\*)  $p < 0.05$ . (\*\*\*) representa diferente significativa cujo  $p < 0.001$  mediante à comparação com o grupo salina + salina.

Observando os resultados oriundos a partir da análise do teste do labirinto em cruz elevado, pode-se notar a ação da metirapona aplicada como pré-tratamento e o lipopolissacarídeo de *E. coli*. na mudança comportamental nos animais prenhes.

O fator tratamento com LPS no 10º de gestação de camundongos foi significativo, mediante ao teste de ANOVA duas vias, nos seguintes parâmetros analisados: frequência de entradas no braço aberto, frequência de entradas na plataforma central ( $F_{(1, 43)} = 10.42$ ,  $P = 0.0024$ ) e frequência de entradas no braço fechado ( $F_{(1, 43)} = 11.55$ ,  $P = 0.0015$ ). Baseado na realização do teste estatístico em questão, afirma-se ainda que há interação entre os fatores tratamento e pré-tratamento nos seguintes parâmetros: frequência de entradas no braço aberto ( $F_{(1, 43)} = 6.483$ ,  $P = 0.0146$ ); frequência de entradas na plataforma central ( $F_{(1, 43)} = 9.723$ ;  $P = 0.0032$ ) e frequência de entradas no centro ( $F_{(1, 43)} = 6.626$ ;  $P = 0.0136$ ).

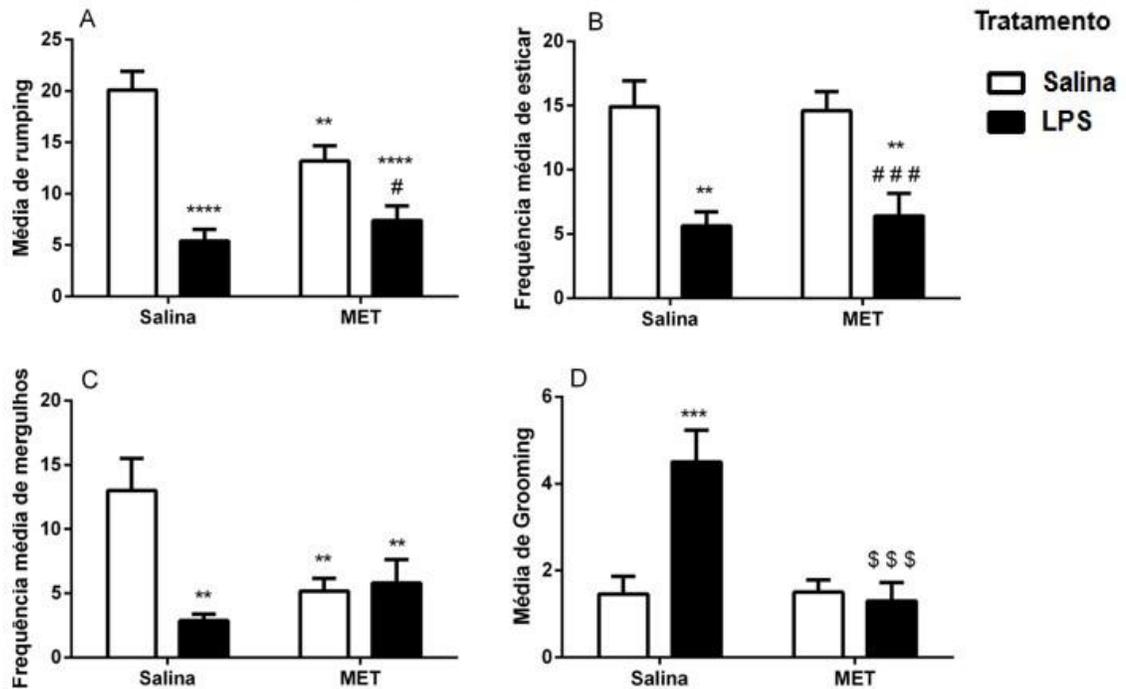
Quando o parâmetro analisado é a frequência de entradas no braço aberto, representado pela figura 11B, o teste estatístico nos revela que o grupo salina + LPS apresenta redução significativa deste parâmetro quando comparado com o grupo salina + salina ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.670$ ).

Quando o foco da análise passa a ser a frequência média de entradas dos animais na plataforma central, representado pela figura 11D, pode-se afirmar que o tratamento com LPS no grupo salina + LPS ( $p < 0.001$ ;  $q = 5.886$ ), quando comparado ao grupo controle, causou uma significativa diminuição no número de entradas na plataforma central.

Resultado similar é obtido quando se analisa a frequência média de entradas no braço fechado, representado pela figura 11F. Nesse caso também podemos que o grupo salina + LPS ao ser comparado ao grupo controle ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.540$ ) apresenta uma significativa redução na média de entradas no braço fechado.

Já as medidas complementares analisadas na execução do teste do labirinto em cruz elevado encontram-se dispostos na figura 12.

**Figura 12** - Gráfico referente ao comportamento dos animais prenhes no teste do Labirinto em cruz elevado



Fonte: do autor

**Nota:** (A-D) Gráficos referentes às medidas complementares exibido pelos animais experimentais expostos ao LCE. O eixo das abcissas representa o pré-tratamento utilizado. (A) Média de rumping. (B) Frequência média de esticar. (C) Frequência média de mergulhos (D) Frequência média de grooming. (\*\*) representa valores de  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$ ; e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  quando submetidos à comparação com o grupo salina + veículo (grupo controle). O uso de (#) simboliza a diferença estatístico cujo  $p < 0.05$  e (###) representa valores onde  $p < 0.001$  sendo a comparação realizada mediante ao grupo MET + salina. Já (\$\$\$) representa valores de  $p < 0.001$  quando é realizada a comparação com o grupo salina + LPS.

Em relação às medidas complementares observadas no teste do labirinto em cruz elevado, tem-se que o tratamento com LPS apresentou diferença significativa em todos os parâmetros analisados, como frequência de *rumping* ( $F_{(1, 43)} = 37.0$ ,  $P < 0.0001$ ), frequência de esticar ( $F_{(1, 43)} = 24.48$ ,  $P < 0.0001$ ), frequência de mergulhos ( $F_{(1, 43)} = 7.871$ ,  $P = 0.0075$ ) e frequência de *grooming* ( $F_{(1, 43)} = 10.49$ ,  $P = 0.0023$ ). Já o pré-tratamento com metirapona, por sua vez, apresentou diferença significativa apenas no parâmetro de frequência *grooming* ( $F_{(1, 43)} = 12.91$ ,  $P = 0.0008$ ). Afirma-se ainda, baseado no teste estatístico utilizado, que há interação entre ambos os fatores na frequência de *rumping* ( $F_{(1, 43)} = 7.072$ ,  $P = 0.0110$ ), frequência de mergulhos ( $F_{(1, 43)} = 10.11$ ;  $P = 0.0027$ ) e frequência de *grooming* ( $F_{(1, 43)} = 13.65$ ,  $P = 0.0006$ ).

Na figura 12A encontram-se o gráfico referente à frequência média de movimentos de *rumping* desempenhado pelos animais submetidos ao protocolo experimental quando expostos ao

labirinto em cruz elevado. Ao ser comparado os valores médios obtidos entre os grupos experimentais, tem-se que o grupo salina + LPS apresenta uma redução significativa na frequência média de *rumping*, quando comparados ao grupo salina + salina ( $p < 0.0001$ ;  $q = 8.115$ ). O grupo MET + LPS também apresenta significativa redução em tal parâmetro quando comparado ao grupo controle ( $p < 0.0001$ ;  $q = 7.442$ ). Porém, é necessário ressaltar que o próprio grupo pré-tratado com metirapona e que recebeu como tratamento apenas veículo (MET + veículo) também apresenta uma redução significativa na média de *rumpings* se comparado ao grupo controle ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.633$ ). Outro ponto importante digno de destaque, nessa análise, é que o grupo MET + LPS também se diferencia do grupo MET + salina exibindo uma significativa redução na média de *rumping* ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.749$ ).

Ilustrado através da figura 12B tem-se a análise da frequência média de movimentos de esticar o corpo desempenhada pelos animais expostos ao labirinto em cruz elevado. Ao se comparar o grupo salina + LPS com o grupo controle nota-se a redução significativa em tal parâmetro ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.871$ ) de maneira semelhante também ao que ocorre com o grupo MET + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.748$ ) que também apresenta redução significativa na média de movimentos de esticar comparado ao controle. Mais ainda, o grupo MET + LPS também apresenta queda significativa nesse movimento em questão se comparado ao grupo MET + salina ( $p < 0.001$ ;  $q = 5.074$ ).

Já na figura 12C tem-se representado graficamente a frequência de movimentos de mergulhos exibida pelos animais quando estes foram colocados no labirinto em cruz elevado. Ao ser verificado os resultados obtidos pelo pós-teste temos que o grupo salina + LPS apresenta uma redução significativa na média de mergulhos quando a comparação é feita com o grupo controle ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.551$ ). O grupo MET + LPS também apresenta uma redução significativa no parâmetro por hora analisado quando comparado ao grupo controle ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.198$ ). Porém, o grupo MET + salina, o qual recebeu o pré-tratamento com metirapona seguida da aplicação de veículo, também apresentou redução significativa na média de mergulhos quando comparado ao grupo controle ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.214$ ).

Já na figura 12D temos ilustrado a frequência média de grooming desempenhado pelos animais envolvidos na experimentação quando submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado.. Nessa análise, podemos afirmar que o grupo salina + LPS apresenta uma significativa elevação na média de grooming exibida pelos animais em comparação com o grupo controle ( $p < 0.001$ ;  $q$

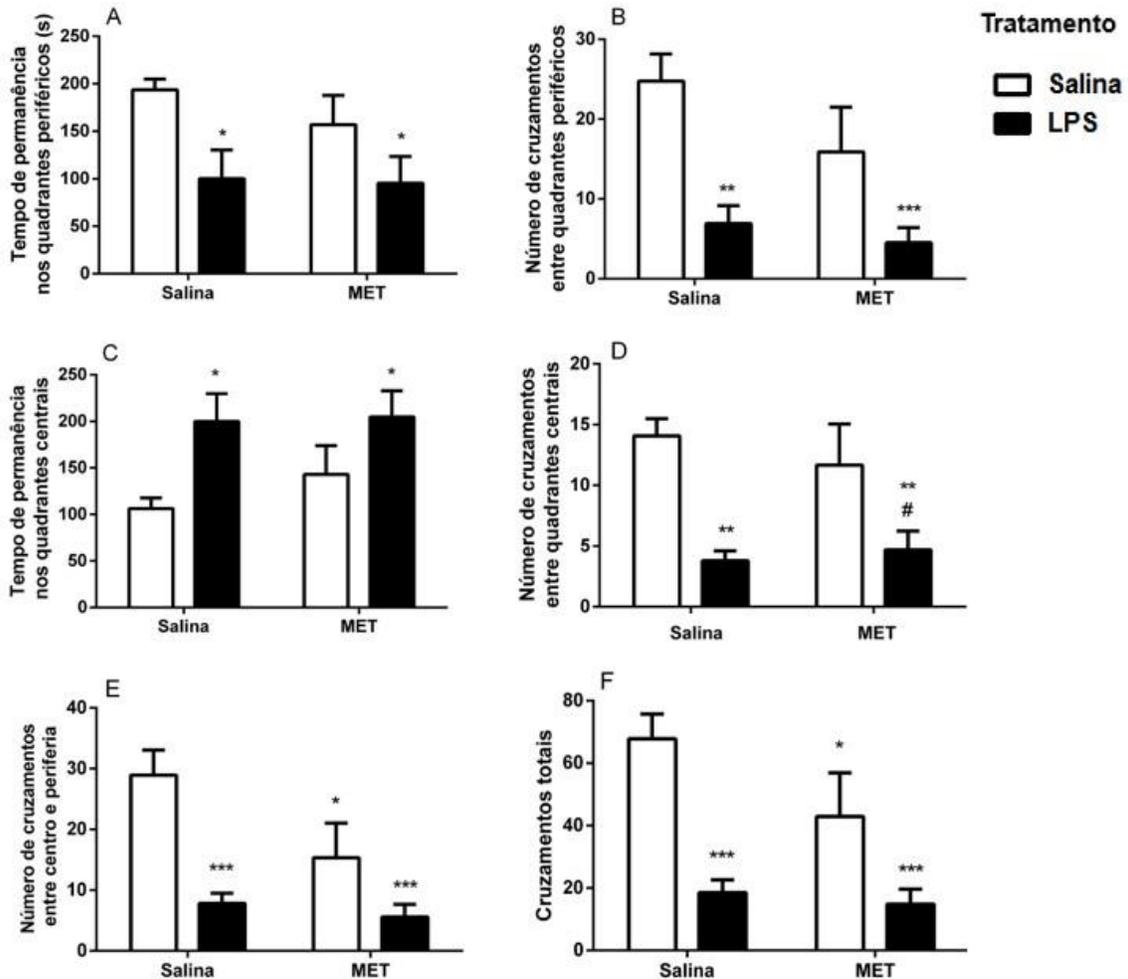
= 6.432). Já o grupo MET + LPS, por sua vez, apresenta uma redução na frequência média de grooming quando comparado ao grupo salina + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 6.621$ ).

#### 5.2.2.1 Teste do campo aberto

Os animais envolvidos no procedimento experimental proposto pelo presente trabalho também foram expostos ao teste do campo aberto cujos resultados encontram-se dispostos a partir dessa seção.

No que diz respeito ao fator tratamento com LPS no 10º dia de gestação em fêmeas prenhes, encontrou-se existir diferença significativa nos seguintes parâmetros analisados: tempo de permanência nos quadrantes periféricos ( $F_{(1, 37)} = 9.498$ ,  $P = 0.0039$ ), número de cruzamentos entre quadrantes periféricos ( $F_{(1, 37)} = 17.51$ ,  $P = 0.0002$ ), tempo de permanência nos quadrantes centrais ( $F_{(1, 37)} = 9.498$ ,  $P = 0.0039$ ), número de cruzamentos entre quadrantes centrais ( $F_{(1, 35)} = 19.82$ ,  $P < 0.0001$ ), número de cruzamentos entre centro e periferia ( $F_{(1, 37)} = 16.99$ ;  $P = 0.0002$ ) e número de cruzamentos totais ( $F_{(1, 37)} = 21.50$ ,  $P < 0.0001$ ). O fator pré-tratamento, por sua vez, apresentou diferença estatística significativa apenas no parâmetro de cruzamentos entre centro e periferia ( $F_{(1, 37)} = 4.451$ ,  $P = 0.0417$ ). Nestes parâmetros citados não foi encontrada diferença estatística significativa na interação entre o fator tratamento e o fator pré-tratamento com metirapona.

**Figura 13** - Gráficos referentes à análise comportamental dos animais prenhes expostos ao teste do campo aberto



Fonte: do autor

**Nota:** Gráficos referentes ao comportamento de fêmeas de camundongos prenhes expostos ao teste do campo aberto. O eixo das abscissas represente o pré-tratamento utilizado. (A) Tempo de permanência na periferia. (B) Número de cruzamentos entre quadrantes periféricos. (C) Tempo de permanência nos quadrantes centrais. (D) Número de cruzamentos entre quadrantes centrais. (E) Número de cruzamentos entre centro e periferia. (F) Número de cruzamentos totais. (\*) represente diferença significativa existente em comparação com o grupo controle (salina + salina), cujo  $p < 0.05$ ; (\*\*) representa valores onde  $p < 0.01$  e (\*\*\*) valores onde  $p < 0.001$  sendo comparativos ao grupo salina + salina. (#) representa valores de  $p < 0.05$  quando se comparados com o grupo MET + salina.

Na figura 13A tem-se ilustrado o tempo de permanência dos animais colocados no campo aberto nos quadrantes periféricos. O grupo salina + LPS ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.850$ ) e também de animais do grupo MET + LPS ( $p < 0.05$ ;  $q = 4.051$ ), quando comparados ao grupo controle,

apresentam redução deste parâmetro. Portanto, aqueles animais que receberam como tratamento o LPS apresentam redução no tempo de permanência nos quadrantes periféricos.

Já na figura 13B encontra-se o gráfico referente ao número de cruzamentos entre os quadrantes periféricos do campo aberto. Quando comparado o grupo salina + LPS com o grupo controle, através do pós-teste, encontra-se uma redução significativa no número de cruzamentos ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.298$ ). Redução no número de cruzamentos também é encontrada quando se compara o grupo MET + LPS com o grupo controle ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.011$ ).

Na figura 13C tem-se disposto o gráfico referente ao tempo de permanência dos animais submetidos ao teste do campo aberto nos quadrantes centrais. O pós-teste nos indica que o grupo salina + LPS em relação ao grupo controle apresenta uma elevação no tempo de permanência nos quadrantes centrais ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.850$ ). Tal evidencia também é similar ao que encontramos no grupo MET + LPS quando comparado com o grupo controle ( $p < 0.05$ ;  $q = 4.052$ ) notando-se uma elevação no tempo de permanência no centro.

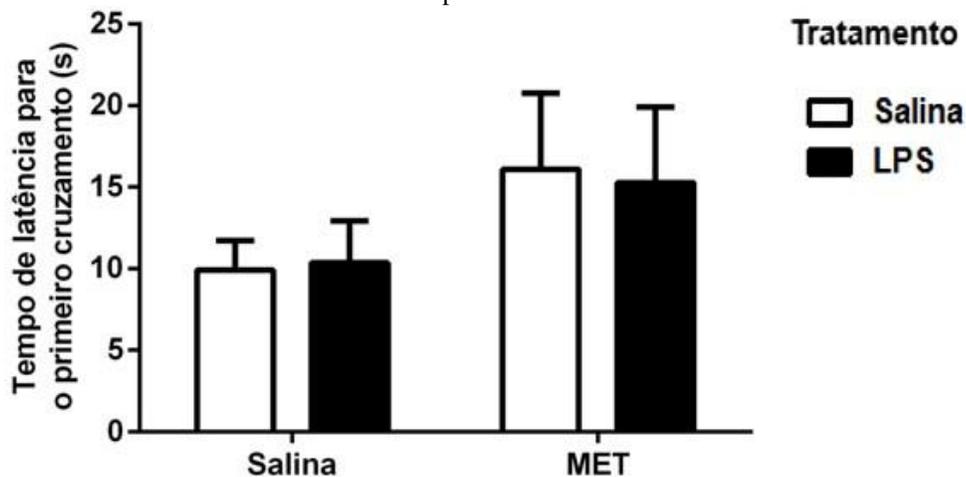
Já na figura 13D há a representação gráfica dos dados obtidos a partir da mensuração do número de cruzamentos entre os quadrantes centrais desempenhado pelos animais expostos ao campo aberto. O grupo salina + LPS ao ser comparado com o grupo salina + salina, ou seja, comparado ao grupo controle, apresenta uma redução significativa no número de cruzamentos entre os quadrantes centrais ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.379$ ). De maneira similar, o grupo MET + LPS também apresenta redução no número de cruzamentos centrais quando comparado ao grupo controle ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.908$ ). Ainda em relação ao grupo MET + LPS, porém quando comparado ao grupo MET + salina tem-se que há uma significativa redução no número de cruzamentos entre os quadrantes centrais realizado ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.550$ ).

Já na figura 13E encontra-se o gráfico referente ao número médio de cruzamentos entre centro e periferia realizado pelos animais envolvidos com o experimento os quais foram expostos ao teste do campo aberto. Nesse caso, o grupo salina + LPS, quando sua comparação se dá com o grupo controle, apresenta um menor número de cruzamentos entre centro e periferia do campo aberto ( $p < 0.001$ ;  $q = 5.854$ ). O mesmo ocorre com o grupo MET + LPS ao ser comparado com o grupo controle, uma vez que há redução significativa no número de transições ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.464$ ). Porém, o grupo MET + salina, por sua vez, também apresenta uma redução significativa no que diz respeito ao número de transições entre os quadrantes centrais e periféricos quando comparado ao grupo controle ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.658$ ).

O número de cruzamentos totais encontra-se representado na figura 13F. O grupo salina + LPS, quando comparado com o grupo salina + salina, apresenta uma significativa redução no número de cruzamentos totais ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.125$ ), de maneira parecida com o que ocorre com o grupo MET + LPS, uma vez que também apresenta redução em tal parâmetro ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.585$ ). É necessário dizer, no entanto, que o grupo MET + salina também apresenta redução significativa no número de cruzamentos totais quando submetidas à comparação com o grupo controle ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.002$ ).

Já o tempo de latência necessário para que o animal realize o primeiro cruzamento não sofreu qualquer alteração significativa e encontra-se disposto na figura 14.

**Figura 14** - Gráfico referente ao tempo de latência, em segundos, para o primeiro cruzamento no teste do campo aberto

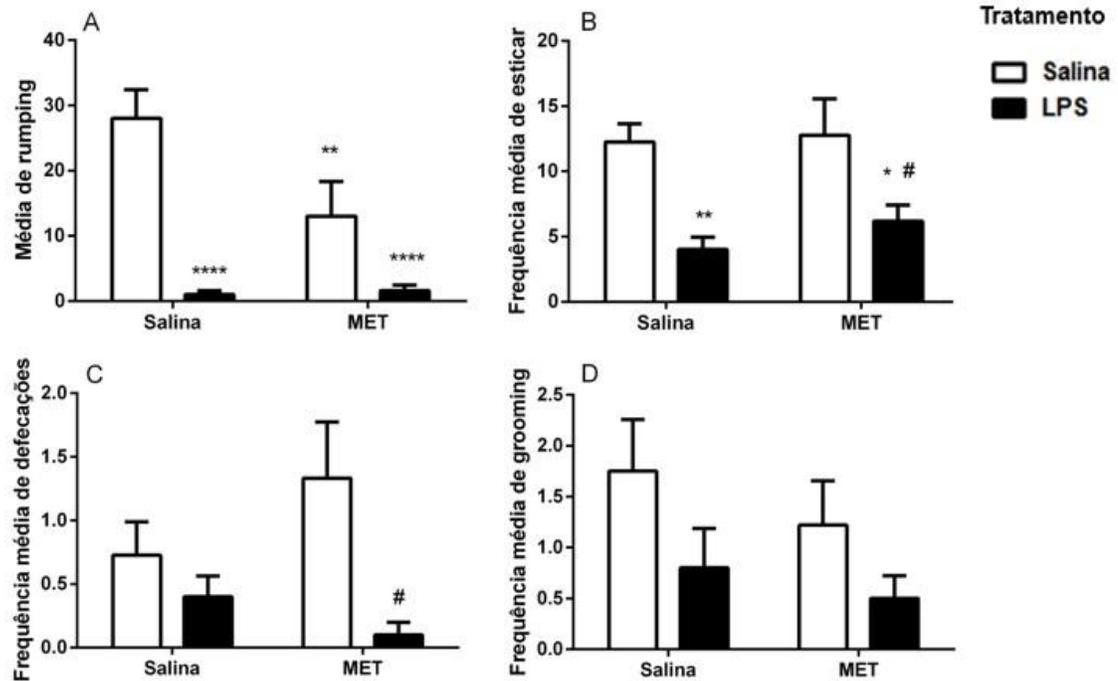


Fonte: do autor

**Nota:** Gráfico referente ao tempo de latência de animais quando expostos ao teste do campo aberto. O eixo das abcissas contém os grupos de pré-tratamentos utilizados.

Já as medidas complementares desempenhadas pelos animais expostos ao teste do campo aberto encontram-se dispostos na figura 15.

**Figura 15** - Gráficos referentes aos padrões comportamentais de camundongos prenhes expostos ao teste do campo aberto



Fonte: do autor

**Nota:** (A-D) Gráficos referentes às medidas complementares observadas em camundongos prenhes submetidos ao teste do campo aberto. O eixo das abcissas representa o pré-tratamento. (A) Média de rumping no teste do campo aberto. (B) Frequência de esticar. (C) Frequência de defecações no campo aberto. (D) Frequência de grooming no teste doo campo aberto. (\*) representa diferença significativa existente em comparação com o grupo controle (salina + salina), cujo  $p < 0.05$ ; (\*\*) representa valores onde  $p < 0.01$ ; (\*\*\*) valores onde  $p < 0.001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  sendo comparativos ao grupo salina + salina. (#) representa valores de  $p < 0.05$  quando se comparados com o grupo MET + salina.

Em relação aos parâmetros relacionados com os comportamentos de *rumping*, esticar, *grooming* e defecar no teste do campo aberto, a figura 15 representa nossos achados. Diante dos testes estatísticos executados, encontrou-se que o fator tratamento com LPS apresenta diferença significativa na frequência de *rumping* ( $F_{(1, 37)} = 29.50$ ,  $P < 0.0001$ ), na frequência de movimentos de esticar ( $F_{(1, 37)} = 19.85$ ,  $P < 0.0001$ ) e na frequência de defecações ( $F_{(1, 37)} = 8.683$ ,  $P = 0.0055$ ). Já o fator de pré-tratamento com metirapona, por sua vez, apresentou diferença significativa, do ponto de vista estatístico, apenas no parâmetro de frequência de *rumping* ( $F_{(1, 37)} = 4.149$ ,  $P = 0.0489$ ). A interação entre ambos os fatores foi considerada diferente significativamente apenas na frequência de *rumping* ( $F_{(1, 37)} = 4.869$ ,  $P = 0.0336$ ).

Representado na figura 15 A encontra-se disposto o gráfico referente a frequência média de movimentos de *rumping* exibidos pelos animais expostos ao campo aberto. Na comparação dos dados obtidos entre os grupos experimentais, encontra-se que o grupo salina + LPS apresenta uma redução significativa na média de *rumpings* durante a execução do teste do campo aberto, se comparada à frequência média do grupo controle ( $p < 0.0001$ ;  $q = 7.922$ ). O grupo MET + LPS também apresenta redução significativa em tal parâmetro se comparado ao grupo salina + salina, grupo controle, ( $p < 0.0001$ ;  $q = 7.746$ ). A análise traz ainda a informação de que o grupo MET + salina também apresenta redução significativa na média de *rumpings* na exposição dos animais ao campo aberto quando comparado com o grupo controle ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.274$ ).

A figura 15B ilustra os dados obtidos a partir da mensuração do movimento de esticar durante a execução do teste do campo, trazendo a frequência média de tal movimento. Comparativamente ao grupo controle, tanto o grupo salina + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.141$ ) quanto o grupo MET + LPS ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.770$ ) apresentam redução na média de movimentos de esticar. O grupo MET + LPS apresenta ainda redução significativa na frequência média de esticar quando comparado ao grupo MET + salina ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.821$ ).

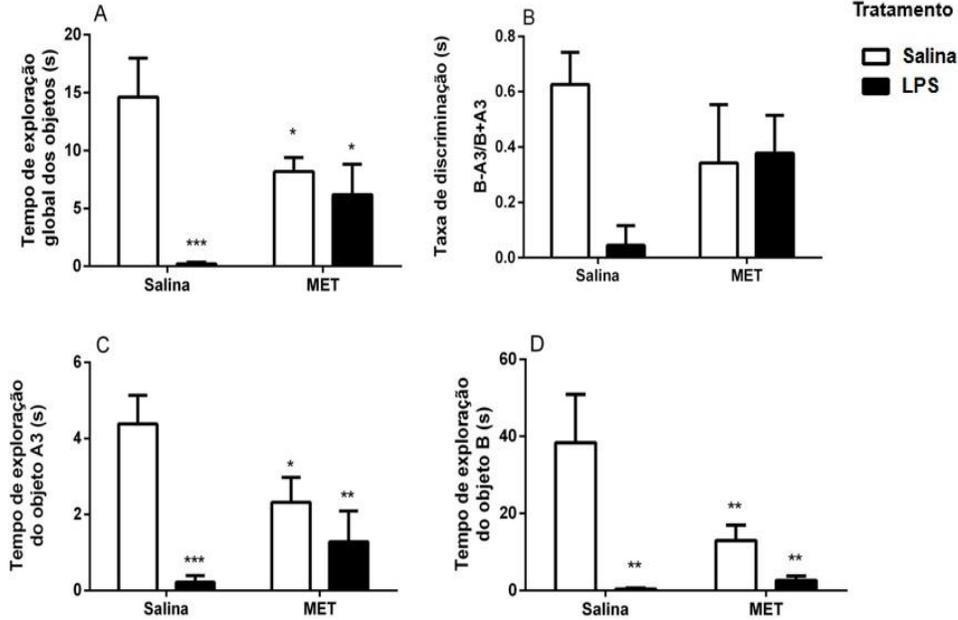
Na figura 15C encontra-se representado a frequência média de defecações que os animais pertencentes aos grupos experimentais em questão realizam quando são expostos ao campo aberto. O pós-teste é capaz de mostrar que o grupo MET + LPS apresenta redução significativa na frequência média de defecações quando comparado ao grupo MET + salina ( $p < 0.05$ ;  $q = 4.501$ ).

Não há diferenças significativas no que diz respeito à frequência de *grooming* realizado pelos animais quando são expostos ao teste do campo aberto.

### 5.2.2.3 Teste de reconhecimento espontâneo dos objetos

Com o intuito de averiguar possíveis desvios na capacidade de retenção de informações a curto prazo em animais submetidos ao tratamento com LPS e pré-tratamento com metirapona, realizou-se o teste de reconhecimento espontâneo de objetos cujos resultados encontram-se dispostos na figura 16.

**Figura 16** - Gráficos relativos ao teste de reconhecimento espontâneo de objetos



Fonte: do autor

**Nota:** (\*) representa diferença significativa existente em comparação com o grupo controle (salina + veículo), cujo  $p < 0.05$ ; (\*\*) representa valores onde  $p < 0.01$ ; (\*\*\*) valores onde  $p < 0.001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  sendo comparativos ao grupo salina + veículo.

Na análise do referido teste, encontrou-se que o tratamento com LPS apresenta diferença significativa no tempo de exploração global dos objetos, existindo ainda nesse parâmetro interação entre o fator tratamento e o fator pré-tratamento com metirapona ( $F_{\text{tratamento}} (1, 37) = 15.00, P = 0.0004$ ;  $F_{\text{interação}} (1, 37) = 8.580, P = 0.0058$ ). O teste de ANOVA *two-way* demonstrou ainda que o fator tratamento apresentou ainda diferença significativa, através da análise do, no tempo de exploração do objeto A3 ( $F_{\text{tratamento}} (1, 37) = 16.03, P = 0.0003$ ;  $F_{\text{interação}} (1, 37) = 5.765, P = 0.0215$ ;) e no tempo de exploração do objeto B ( $F_{\text{tratamento}} (1, 37) = 13.45, P = 0.0008$ ;  $F_{(1, 37)} = 4.393, P = 0.0430$ ), além de evidenciar também a interação significativa, do ponto de vista estatístico, entre o fator tratamento e o fator pré-tratamento.

Na figura 16A encontra-se representado o gráfico referente à taxa de exploração dos objetos A1 e A2 na segunda etapa do teste de reconhecimento espontâneo de objetos. O emprego do pós-teste revelou que o grupo salina + LPS ao ser comparado com o grupo controle apresenta uma redução significativa no tempo de exploração dos objetos A1 e A2 na segunda etapa do teste, comparando-se com o grupo controle ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.754$ ). De modo similar, o grupo

MET + LPS também apresenta redução na exploração global de objetos demonstrando o efeito do LPS nesse aspecto ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.848$ ). O grupo MET + salina, por sua vez, também apresenta redução no tempo de exploração global dos objetos quando comparado com o grupo controle ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.150$ ).

Não há diferença significativa, do ponto de vista estatístico, quando se é analisado a taxa de discriminação relativa à terceira etapa do teste de reconhecimento espontâneo de objetos. Porém, ao se analisar separadamente o tempo de exploração do objeto A3 e o tempo de exploração do objeto B encontra-se diferenças significativas interessantes.

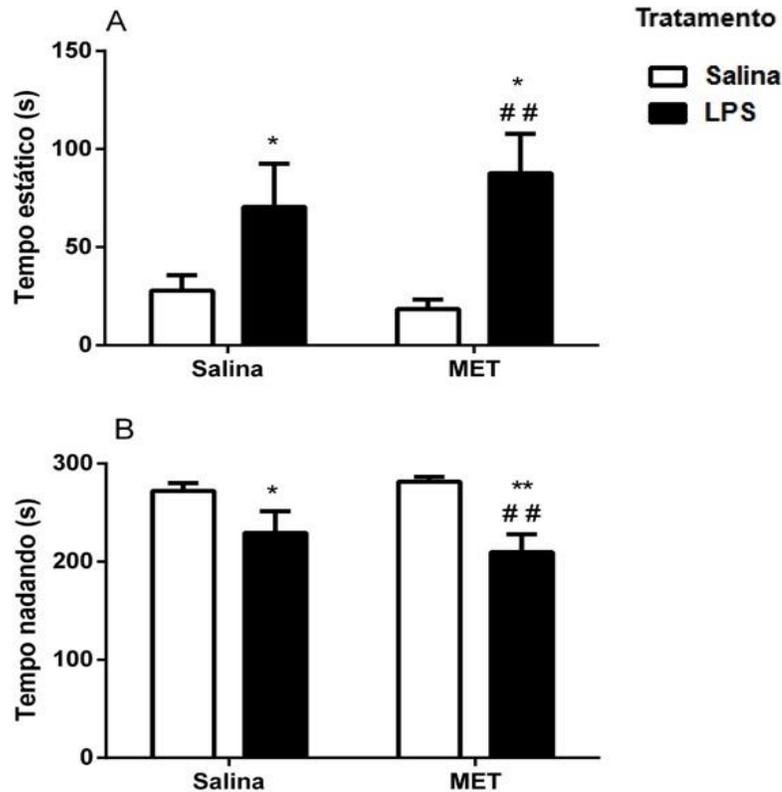
Na figura 16C o gráfico representa o tempo de exploração do objeto já familiar ao animal (A3). Há uma redução significativa no tempo de exploração do objeto A3 entre o grupo salina + LPS em relação ao grupo controle ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.360$ ). De maneira similar, o grupo pré-tratado com metirapona mas que também recebeu LPS como tratamento (MET + LPS) também apresenta redução no tempo de exploração do objeto familiar quando comparado ao grupo controle ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.609$ ). Porém, o grupo MET + salina, o qual recebeu a metirapona como pré-tratamento mas que foi tratada apenas com o veículo, também apresentou uma significativa redução no tempo de exploração do objeto A3 ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.283$ ).

Já a figura 16D ilustra o gráfico referente ao tempo de exploração do objeto novo ao animal que fora exposto à terceira etapa do teste de reconhecimento espontâneo de objetos. Há uma significativa redução no tempo de exploração do objeto novo por parte dos animais do grupo salina + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.723$ ). De maneira semelhante, o grupo MET + LPS também apresenta uma significativa redução no tempo de exploração do objeto B ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.241$ ). Porém, quando se analisa o grupo MET + salina, o qual recebeu como tratamento o veículo de diluição, encontra-se uma redução significativa no tempo de exploração do objeto novo ( $p < 0.01$ ;  $q = 3.994$ ).

#### 5.2.2.2 Teste do Nado Forçado

Os resultados obtidos a partir da mensuração do tempo estático e do tempo nadando quando os animais dos grupos experimentais foram submetidos ao teste do nado forçado encontram-se presentes na figura 17.

**Figura 17** - Teste do Nado Forçado



Fonte: do autor

**Nota:** Gráfico referente ao comportamento dos animais prenhes dos grupos experimentais expostos ao teste do nado forçado. O eixo das abcissas corresponde aos grupos de pré-tratamento. (A) Tempo estático no teste do nado forçado. (B) Tempo nadando no teste do nado forçado. (\*) representa diferença significativa existente em comparação com o grupo controle (salina + salina), cujo  $p < 0.05$ ; (\*\*) representa valores onde  $p < 0.01$  sendo comparativos ao grupo salina + veículo. (##) representa valores de  $p < 0.01$  quando se comparados com o grupo MET + salina

Quando se observa o comportamento dos animais envolvidos com a experimentação proposta pelo presente trabalho no teste do nado forçado percebem-se mudanças significativas a partir do pré-tratamento com metirapona e do tratamento com LPS.

No referido teste, o fator tratamento com LPS apresentou diferença significativa no tempo estático ( $F_{(1, 37)} = 15.87$ ,  $P = 0.0003$ ) e no tempo boiando ( $F_{(1, 38)} = 17.45$ ,  $P = 0.0002$ ).

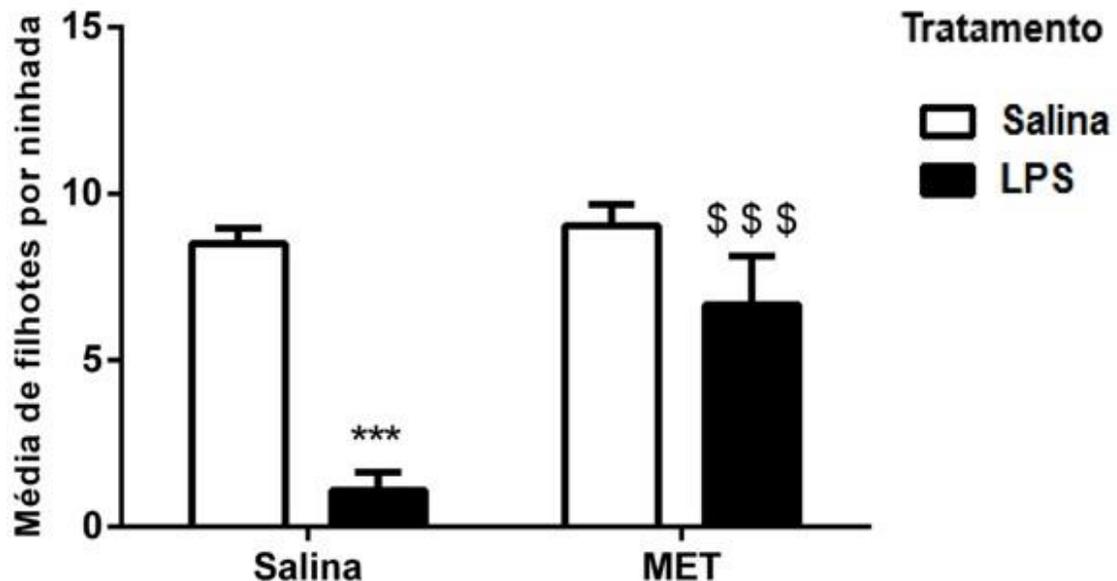
Na análise estatística do tempo em que o animal passa estático no teste nado forçado, representado graficamente na figura 17 A, tem-se que o grupo salina + LPS, ao ser comparado com o grupo controle, apresenta aumento no tempo em que o animal fica imóvel, um comportamento típico de boiar, no teste do nado forçado ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.011$ ). Resultado similar é encontrado no grupo MET + LPS em comparação com o grupo controle ( $p < 0.05$ ;  $q = 4.217$ ), aumentando o tempo boiando, expresso em segundo, no teste do nado forçado. É importante ressaltar que o grupo MET + LPS apresenta um aumento no tempo estático em relação ao grupo MET + salina ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.974$ ).

Já no gráfico representado através da figura 17B diz respeito ao tempo em que os animais passam nadando no tempo do nado forçado. O grupo salina + LPS apresenta uma redução significativa no tempo, em segundos, em que o animal passa nadando ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.042$ ). Tal evidência também é encontrada no grupo MET + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.577$ ) quando comparado ao grupo salina + salina. Cumpre-se ressaltar que o grupo MET + LPS também apresenta diminuição no tempo de natação quando comparado com o grupo MET + salina ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.371$ ).

### **5.2.3 Análise da ninhada**

As fêmeas em que se foi permitido que a gestação chegasse à termo a fim de contabilizar o número de filhotes nascidos a cada ninhada encontram-se representadas graficamente na figura 18.

Figura 18 – Análise da ninhada



Fonte: do autor

**Nota:** Gráfico referente ao número médio de filhotes nascidos por ninhadas. O eixo das abcissas contém os grupos de pré-tratamento utilizados. (\*\*\*) representa diferença estatística significativa existente em comparação com o grupo salina + veículo cujo  $p < 0.001$ . (\$\$\$) representa valores de  $p < 0.001$  em comparação com o grupo salina + LPS.

A interpretação do gráfico representado pela figura 18, através do emprego do teste ANOVA *two way*, é capaz de revelar-nos que o tratamento com LPS causa interferência significativa no número de filhotes nascidos por ninhada ( $F_{(1, 53)} = 22.20$ ,  $P < 0.0001$ ;). Além disso, com base no emprego do teste estatístico é possível afirmar que o pré-tratamento com metirapona também causa efeito significativo no número de filhotes nascidos por ninhada ( $F_{(1, 53)} = 8.681$ ,  $P = 0.0048$ ;). Há ainda que ressaltar a existência da interação entre o pré-tratamento com metirapona e o tratamento posterior com LPS, evidenciado através do teste estatístico empregado ( $F_{(1, 53)} = 5.873$ ;  $P = 0.0188$ ;). As informações trazidas mediante ao emprego do pós-teste permite-nos afirmar que o grupo salina + LPS, ao ser comparado com o grupo controle, apresenta uma redução significativa do número de filhotes nascidos por ninhada ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.200$ ). Já quando se realiza a comparação entre o grupo MET + LPS e o grupo salina + LPS ( $p < 0.001$ ;  $q = 5.462$ ).

### 5.3 ANÁLISES REFERENTES AOS GRUPOS EXPERIMENTAIS PRÉ-TRATADOS COM MIFEPRISTONE SEGUIDAS OU NÃO DA APLICAÇÃO DE LPS

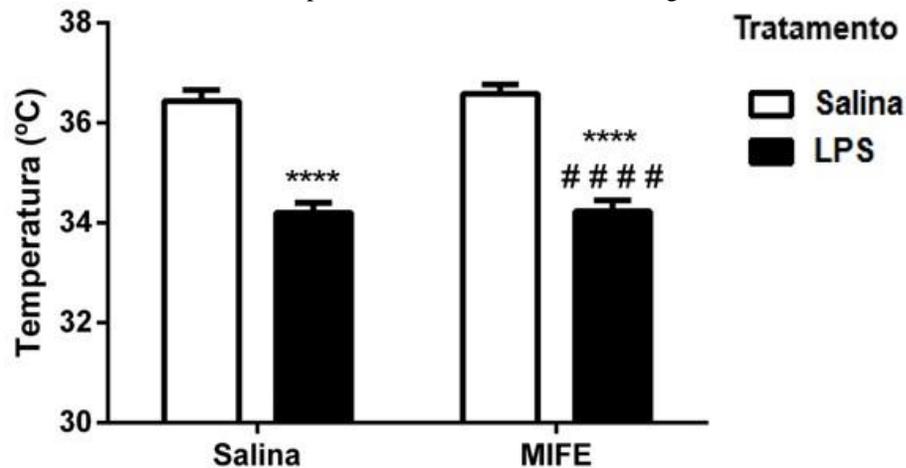
Os resultados obtidos a partir do pré-tratamento com a mifepristone associando com o tratamento com o lipopolissacarídeo de *Escheria coli* encontram-se dispostos na seção a seguir

#### 5.3.1 Análise da temperatura retal

A figura 19 apresenta-nos o gráfico referente à temperatura retal dos animais envolvidos com o protocolo experimental proposto pelo presente trabalho, verificando a interferência do pré-tratamento com mifepristone e o tratamento com LPS na termorregulação.

Ao interpretar os dados condizentes com à averiguação da temperatura retal dos animais submetidos à experimentação pode-se notar que o tratamento com LPS apresenta diferença significativa no controle da temperatura ( $F_{(1, 79)} = 119.3, P < 0.0001$ ). A comparação entre os valores médios da temperatura entre os grupos experimentais permite-nos afirmar que o grupo salina + LPS ao ser comparado com o grupo controle apresenta uma significativa queda na temperatura retal ( $p < 0.0001; q = 11.43$ ). Já o grupo MIFE + LPS também apresenta uma queda significativa de sua temperatura quando comparado com o grupo controle (salina + veículo) ( $p < 0.0001; q = 10.37$ ). É importante que se destaque ainda que o grupo MIFE + LPS apresenta uma temperatura retal significativamente diminuída em relação ao grupo MET + salina ( $p < 0.0001; q = 10.52$ ).

**Figura 19** - Gráfico referente à temperatura retal das fêmeas no 10º dg



Fonte: do autor

**Nota:** Gráfico referente à análise da temperatura retal dos animais experimentais. O eixo das abcissas compreende o grupo de pré-tratamento utilizado. O uso de (\*\*\*\*) representa valores onde  $p < 0.0001$  quando se comparados com o grupo controle (salina + salina). O uso de (#####) representa valores de  $p < 0.0001$  comparados com o grupo MET + salina

### 5.3.2 Análise comportamental

Os resultados obtidos a partir da análise dos comportamentos de camundongos prenhes submetidos ao pré-tratamento com mifepristone comparativos aos grupos controle encontram-se dispostos a seguir

#### 5.3.2.1 Teste do Labirinto em cruz elevado

A Figura 20 representa os resultados obtidos a partir da execução do teste do labirinto em cruz elevado nos animais submetidos ao experimento.

A análise referente ao teste do labirinto em cruz elevado dos animais envolvidos com o presente protocolo experimental, demonstram que o fator tratamento com LPS apresentou

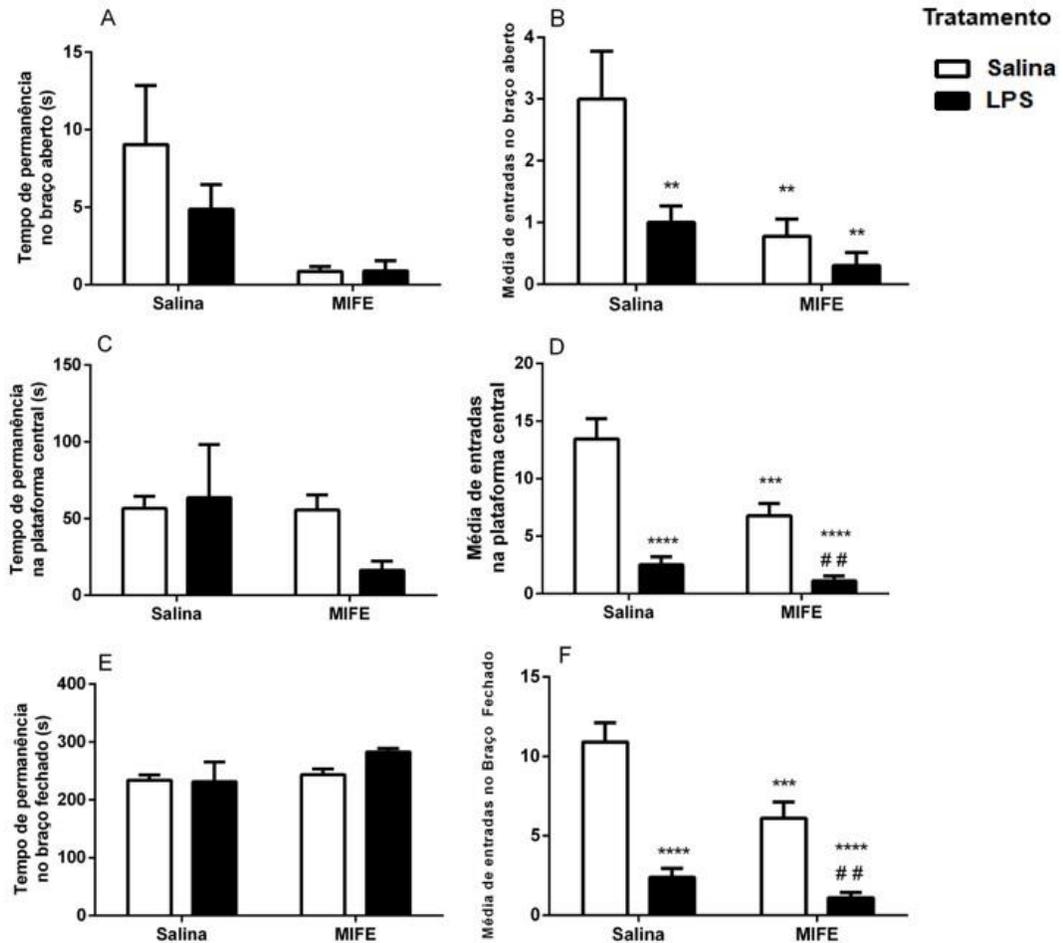
diferença significativa na frequência média de entradas no braço aberto ( $F_{(1, 34)} = 6.137$ ,  $P = 0.0184$ ); na frequência de entradas na plataforma central ( $F_{(1, 34)} = 46.73$ ,  $P < 0.0001$ ) e na frequência de entradas no braço fechados ( $F_{(1, 34)} = 55.59$ ,  $P < 0.0001$ ). Já o fator de pré-tratamento com mifepristone apresentou diferença do ponto de vista estatístico no tempo de exploração no braço aberto ( $F_{(1, 34)} = 6.542$ ,  $P = 0.0152$ ), na frequência de entradas no braço aberto ( $F_{(1, 34)} = 8.536$ ,  $P = 0.0061$ ), na frequência de entradas na plataforma central ( $F_{(1, 34)} = 11.01$ ,  $P = 0.0022$ ) e na frequência de entradas no braço fechado ( $F_{(1, 34)} = 11.18$ ,  $P = 0.0020$ ). Somente há interação entre os fatores no parâmetro de frequência de entradas na plataforma central ( $F_{(1, 34)} = 11.18$ ,  $P = 0.0020$ ).

A figura 20 A consiste na representação do gráfico referente ao tempo de exploração dos animais no braço aberto do labirinto em cruz elevado. Porém, não há alterações entre os grupos experimentais que compõem o estudo quando são comparados empregando-se para isso o pós-teste de Newman Keuls.

Já a figura 20B representa a frequência média de entradas no braço aberto exibido pelos animais experimentais submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado. Ao ser realizado o pós-teste e observamos as comparações entre os grupos, a interpretação do teste estatístico nos revela que o grupo salina + LPS apresenta uma redução significativa na média de entradas no braço aberto quando comparado com o grupo controle ( $p < 0.01$ ;  $q = 3.977$ ). O mesmo acontece com os grupos MIFE + salina ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.568$ ) e MIFE + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.710$ ) onde ambos apresentam significativa redução no número de entradas no braço aberto se comparados com o grupo controle.

Já a figura 20D apresenta-nos o gráfico referente à frequência de entradas na plataforma central quando os animais experimentais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado. Na comparação entre os grupos experimentais, realizadas através do pós-teste, pode-se afirmar que os grupos salina + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 8.953$ ), MIFE + salina ( $p < 0.001$ ;  $q = 5.639$ ) e MIFE + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 10.74$ ) apresentam redução significativa no número de entradas na plataforma central mediante à comparação com o grupo controle (salina + veículo). Porém, ao se comparar ainda o grupo MIFE + LPS com o grupo MIFE + salina percebe que há uma redução significativa também no número de entradas na plataforma central ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.695$ ).

**Figura 20** - Gráfico referente ao comportamento dos animais prenhes no teste do Labirinto em cruz elevado.



Fonte: do autor

**Nota:** (A-F) Gráficos referentes à exploração e frequência de entradas no LCE no qual o eixo das abcissas corresponde ao pré-tratamento. (A) Tempo de permanência no braço aberto. (B) Média de entradas no braço aberto. (C) Tempo de permanência na plataforma central. (D) Média de entradas na plataforma central. (E) Tempo de permanência no braço fechado. (F) Média de entradas no braço fechado. (\*\*) representa valores de  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$ ; e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  quando submetidos à comparação com o grupo salina + salina (grupo controle). O uso de (##) representa valores onde  $p < 0.01$  sendo a comparação realizada mediante ao grupo MIFE + salina.

Já no gráfico 20F tem-se a informação a respeito da frequência de entradas no braço fechado quando os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado. O grupo salina + LPS apresenta uma significativa redução no número médio de entradas no braço fechado ( $p < 0.0001$ ;  $q = 9.343$ ) se comparado com o grupo controle. O mesmo ocorre mediante à comparação dos grupos MIFE + salina ( $p < 0.001$ ;  $q = 5.431$ ) e MIFE + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q =$

11.42) ao grupo controle, evidenciando a significativa redução na frequência de entradas no braço fechado. Outro ponto de destaque é que o grupo tratado com LPS e que recebeu como pré-tratamento a mifepristone (MIFE + LPS) apresentou significativa redução no número médio de entradas no braço aberto quando comparado ao grupo MIFE + salina ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.548$ ).

A fim de complementar as análises realizadas na execução do teste do labirinto em cruz elevado, deu prosseguimento a medidas adicionais, as quais estão apresentadas na Figura 21.

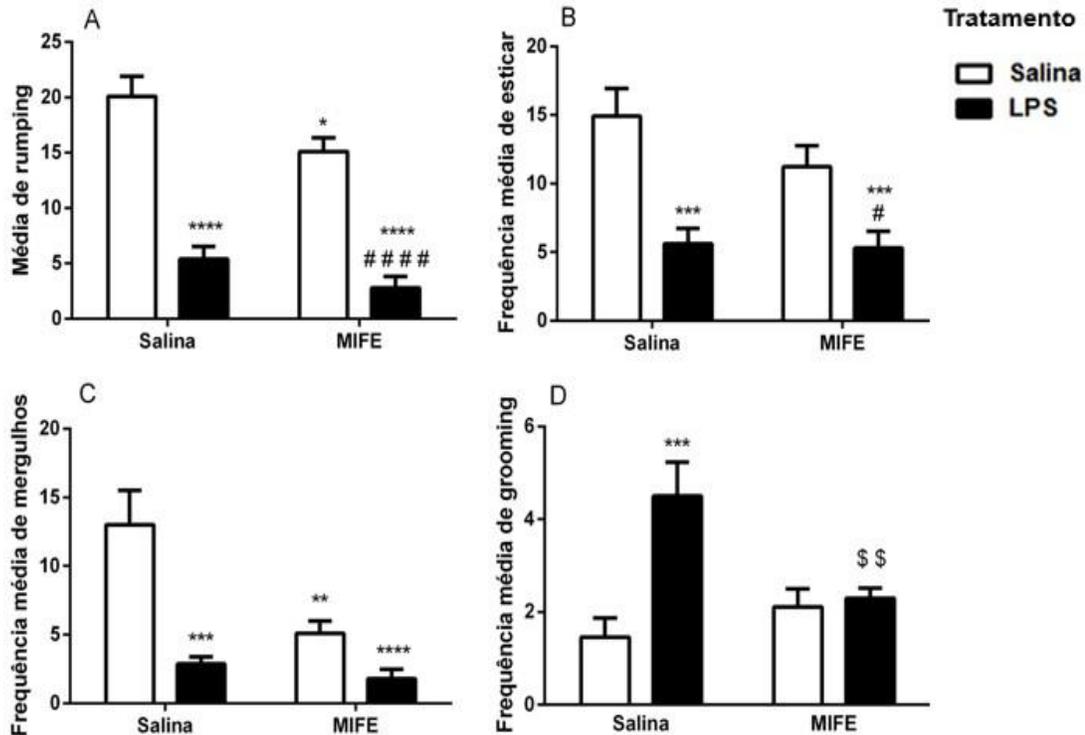
Analisando-se as medidas complementares, chamadas de medidas etológicas, no teste do labirinto em cruz elevado, foi evidenciado que o tratamento com LPS foi significativamente diferente, do ponto de vista estatístico em diversos parâmetros, tais como: a frequência de *rumpings* ( $F_{(1, 34)} = 89.29$ ,  $P < 0.0001$ ), a frequência média de movimentos de esticar ( $F_{(1, 34)} = 22.38$ ,  $P < 0.0001$ ), a frequência média de mergulhos ( $F_{(1, 34)} = 17.76$ ,  $P = 0.0002$ ) e a frequência de *grooming* ( $F_{(1, 34)} = 13.07$ ,  $P = 0.0010$ ). O teste estatístico foi capaz de revelar também que o pré-tratamento com mifepristone apresentou diferença estatística na frequência média de *rumping* ( $F_{(1, 34)} = 6.978$ ,  $P = 0.0124$ ) e na frequência de mergulhos ( $F_{(1, 34)} = 7.904$ ,  $P = 0.0081$ ). Há ainda, de acordo com o teste estatístico realizado, interação entre os fatores de tratamento e pré-tratamento na frequência de mergulhos ( $F_{(1, 34)} = 4.567$ ,  $P = 0.0399$ ) e na frequência de *grooming* ( $F_{(1, 34)} = 10.19$ ,  $P = 0.0030$ ).

Na figura 21A pode-se observar o gráfico referente à frequência média de *rumping* apresentado pelos animais expostos ao teste do labirinto em cruz elevado. Comparando-se os grupos, percebe-se que o grupo salina + LPS apresenta uma redução significativa da média de *rumping* ao ser comparado com o grupo controle ( $p < 0.0001$ ;  $q = 10.23$ ). O grupo MIFE + salina, por sua vez, apresenta também uma redução nesse parâmetro comportamental se comparado com o grupo salina + salina ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.580$ ). Já na análise do grupo MIFE + LPS o resultado indica-nos que há uma redução significativa do comportamento de *rumping* tanto se comparado ao grupo controle ( $p < 0.0001$ ;  $q = 12.79$ ) quanto se comparado ao grupo MIFE + salina ( $p < 0.0001$ ;  $q = 8.657$ ).

Já o gráfico representado na figura 21C indica a respeito da frequência média de mergulhos em animais envolvidos com o presente experimento quando foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado. Mediante à análise comparativa entre os grupos através do pós-teste de Newman Keuls, revelou-se que o grupo salina + LPS apresente uma redução significativa na frequência média de mergulhos quando comparado com o grupo controle ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.316$ ).

O mesmo ocorre em grupos que foram pré-tratados com mifepristone, tanto MIFE + salina ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.087$ ) quanto o grupo MIFE + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 7.430$ ) apresentam redução significativa na frequência média de mergulhos. Diante da interação existente entre ambos os fatores, nesse caso, pode-se afirmar que a combinação de mifepristone e LPS resultou numa queda mais acentuada da frequência de mergulhos.

**Figura 21** - Gráfico referente ao comportamento dos animais prenhes no teste do Labirinto em cruz elevado



Fonte: do autor

**Nota:** (A-D) Gráficos referentes às medidas adicionais no LCE. O eixo X representa o grupo de pré-tratamento utilizado. (A) Média de *rumping*. (B) Frequência média de esticar. (C) Frequência média de mergulhos (D) Frequência média de *grooming*. (\*) representa diferença significativa existente em comparação com o grupo controle (salina + veículo), cujo  $p < 0.05$ ; (\*\*) representa valores onde  $p < 0.01$ ; (\*\*\*) valores onde  $p < 0.001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  sendo comparativos ao grupo salina + veículo. (#) representa valores de  $p < 0.05$  quando se comparados com o grupo MIFE + salina. O uso de (\$) representa diferença estatística existente em comparação com o grupo salina + LPS em que os valores de  $p < 0.01$

A figura 21B, por sua vez, apresenta o gráfico referente à frequência média de movimentos de esticar, a fim de que o animal explore o aparato do labirinto num sentido horizontal. Percebe-se, através da comparação entre os grupos, que os animais pertencentes ao

grupo salina + LPS apresentam redução significativa na média de movimentos de esticar ( $p < 0.001$ ;  $q = 5.746$ ) se comparados ao controle. Já o grupo MIFE + LPS também apresenta uma redução significativa na frequência média de esticar tanto se comparado com o grupo controle ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.324$ ) quanto se comparado ao grupo MIFE + salina ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.705$ ).

A figura 21D apresenta o gráfico referente à frequência média de *grooming* nos animais xpostos ao labirinto em cruz elevado. Na análise empregada a fim de que se comparasse os grupos experimentais, notou-se que o grupo salina + LPS apresenta uma significativa elevação na frequência média de grooming quando comparado com o grupo controle ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.771$ ). Já o grupo MET + LPS, ao ser comparado com o grupo salina + LPS, apresenta uma redução significativa na frequência média de grooming. De acordo com os resultados obtidos, portanto, e de acordo com a interação existe entre os fatores de tratamento e de pré-tratamento, afirma-se que o pré-tratamento com mifepristone foi capaz evitar que o aumento na frequência de grooming causada pelo tratamento com LPS acontecesse.

### 5.3.2.2 Teste do campo aberto

A fim de avaliar o comportamento dos animais submetidos à experimentação na exposição do campo aberto, apresentam-se os resultados a seguir.

Através do emprego do teste estatístico com o objetivo de analisar os dados referentes à exposição dos camundongos no campo aberto, revelou-se que o tratamento dos animais prenhes com lipopolissacarídeo de *E. coli* apresenta diferença estatística nos seguintes parâmetros analisados: tempo de permanência nos quadrantes periféricos ( $F_{(1, 36)} = 4.171$ ,  $P = 0.0485$ ), número de cruzamentos executados entre quadrantes periféricos ( $F_{(1, 36)} = 38.94$ ,  $P < 0.0001$ ), tempo de permanência nos quadrantes centrais ( $F_{(1, 36)} = 4.171$ ,  $P = 0.0485$ ), número de cruzamentos entre quadrantes centrais ( $F_{(1, 34)} = 76.49$ ,  $P < 0.0001$ ), cruzamentos entre centro e periferia ( $F_{(1, 36)} = 46.13$ ,  $P < 0.0001$ ) e número total de cruzamentos ( $F_{(1, 36)} = 59.02$ ,  $P < 0.0001$ ). Além disso, o pré-tratamento das fêmeas prenhes com mifepristone apresentou diferença significativa nos parâmetros de número de cruzamentos entre os quadrantes centrais ( $F_{(1, 34)} = 9.112$ ,  $P = 0.0048$ ), cruzamentos entre centro e periferia ( $F_{(1, 36)} = 5.627$ ,  $P = 0.0232$ ) e no

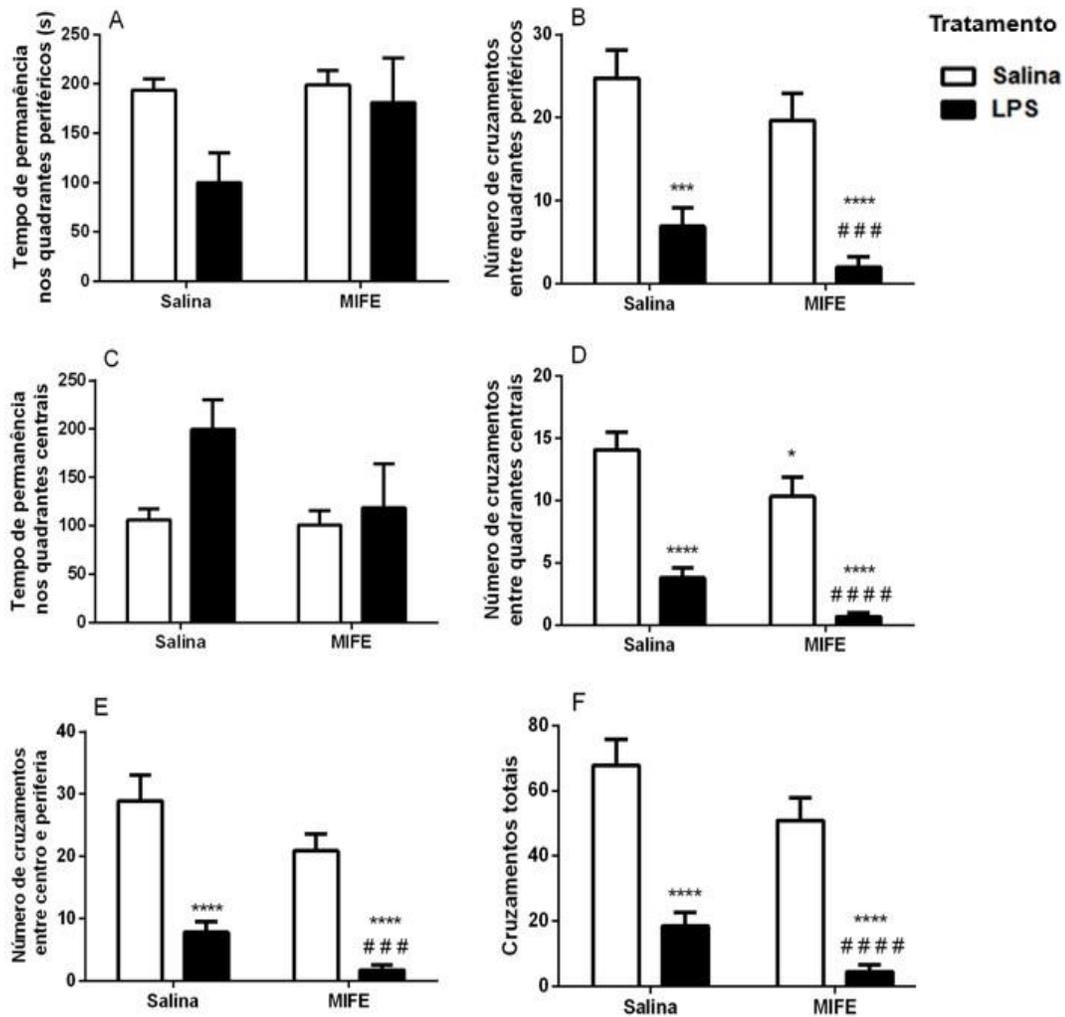
número de cruzamentos totais ( $F_{(1, 36)} = 6.160$ ,  $P = 0.0179$ ). Ressalta-se ainda que o teste estatístico não revelou existir diferenças significativas resultantes da interação entre ambos os fatores nestes parâmetros analisados.

Ao se analisar o número de cruzamentos executados entre os quadrantes periféricos, presente através da representação gráfica na figura 22B, é evidenciado que o grupo salina + LPS diante da comparação com o grupo controle, apresenta uma redução significativa no número de cruzamentos periféricos ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.596$ ). De maneira similar, o grupo MIFE + LPS também apresenta redução considerável no número de cruzamentos periféricos, seja quando comparado ao grupo controle ( $p < 0.001$ ;  $q = 8.163$ ) ou quando comparado ao grupo MIFE + salina ( $p < 0.001$ ;  $q = 5.931$ ).

Ao analisar, porém, o número de cruzamentos centrais realizados pelas fêmeas prenhes submetidas no experimento delineado por esse estudo, quando expostas ao teste do campo aberto, chegou-se à conclusão que o tratamento o grupo salina + LPS, ao ser objeto de comparação com o grupo salina + salina apresentou uma diminuição significativa no número de cruzamentos centrais executados ( $p < 0.0001$ ;  $q = 9.263$ ). Além disso, o próprio grupo MIFE + salina, ou seja, o grupo nos quais os animais receberam como pré-tratamento a mifepristone seguida a injeção do veículo, apresentou redução no parâmetro analisado quando comparado com o grupo controle ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.289$ ). O grupo MIFE + LPS, por sua vez, apresenta redução no número de cruzamentos entre os quadrantes centrais tanto quando comparado com o grupo controle ( $p < 0.0001$ ;  $q = 11.76$ ) como quando comparado com o grupo MIFE + salina ( $p < 0.0001$ ;  $q = 8.261$ ).

Na figura 22E tem-se representado o gráfico referente ao número de cruzamentos entre centro e periferia nos animais expostos ao teste do campo aberto. O salina + LPS, ao ser comparado com o grupo controle apresentou redução significativa no referido parâmetro ( $p < 0.0001$ ;  $q = 7.499$ ) juntamente com o grupo MIFE + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 9.358$ ). O grupo MIFE + LPS apresentou também redução neste parâmetro no que diz respeito à comparação com o grupo MIFE + salina ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.164$ ).

**Figura 22** – Gráficos referentes aos padrões comportamentais de camundongos prenhes expostos ao teste do campo aberto



Fonte: do autor

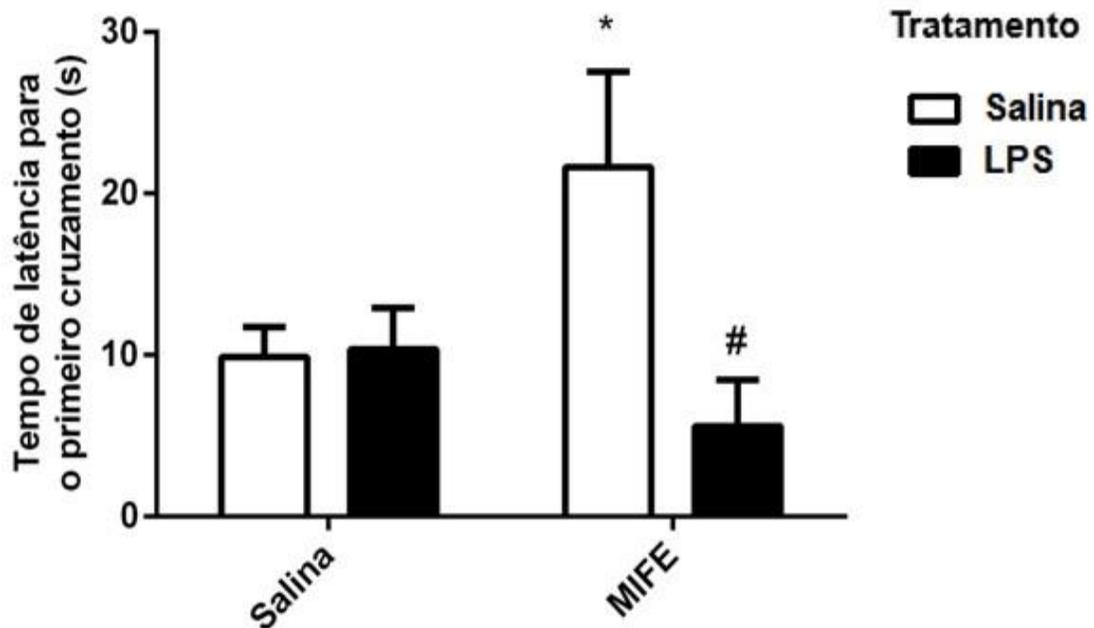
**Nota-** Gráficos referentes ao comportamento de fêmeas de camundongos prenhes expostos ao teste do campo aberto. O eixo das abcissas represente o pré-tratamento utilizado. (A) Tempo de permanência na periferia. (B) Número de cruzamentos entre quadrantes periféricos. (C) Tempo de permanência nos quadrantes centrais. (D) Número de cruzamentos entre quadrantes centrais. (E) Número de cruzamentos entre centro e periferia. (F) Número de cruzamentos totais. Nota: (\*) representa diferença significativa existente em comparação com o grupo controle (salina + veículo), cujo  $p < 0.05$ ; (\*\*\*) valores onde  $p < 0.001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  sendo comparativos ao grupo salina + veículo. (###) representa valores de  $p < 0.001$ ; e (####) representa valores de  $p < 0.0001$  quando se comparados com o grupo MIFE + salina.

Já a análise do número de cruzamentos totais encontra-se presente ilustrada na figura 22 F. Ao analisar os resultados obtidos nesse parâmetro, tem-se que o grupo salina + LPS apresenta

significativa redução no número de cruzamentos totais quando comparado com o grupo controle ( $p < 0.0001$ ;  $q = 8.316$ ). O grupo MIFE + LPS, por sua vez, também apresenta redução no número total de cruzamentos seja comparado com o grupo controle ( $p < 0.0001$ ;  $q = 10.38$ ) ou seja comparado com o grupo MIFE + salina ( $p < 0.0001$ ;  $q = 7.124$ ).

Na figura 23 encontra representado o tempo de latência necessário para que o animal realizasse o primeiro cruzamento.

**Figura 23** - Gráfico referente ao tempo de latência, em segundos, para o primeiro cruzamento no teste do campo aberto



Fonte: do autor

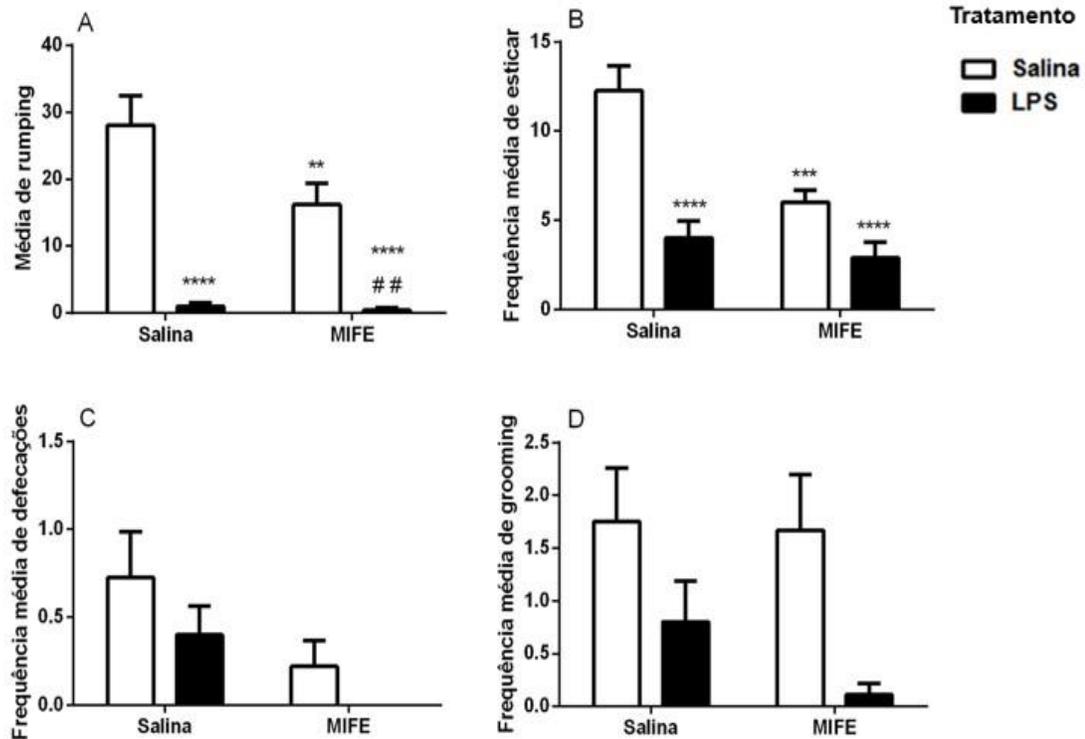
**Nota:** Gráfico referente ao tempo de latência necessário para que o animal exposto ao teste do campo aberto realizasse o primeiro cruzamento. O eixo das abcissas represente o grupo de pré-tratamento utilizado.

**Nota:** (\*) representa diferença estatística onde  $p < 0.05$  mediante à comparação com o grupo controle (salina + veículo). Já (#) representa valores de  $p < 0.05$  quando comparado com o grupo MIFE + salina

Ao se comparar o tempo de latência necessário para que o animal realizasse o primeiro cruzamento ao ser submetido ao teste do campo aberto, nota-se que o tratamento com LPS afeta significativamente o comportamento do animal ( $F_{(1, 36)} = 5.186$ ,  $P = 0.0288$ ;). Além disso, há interação entre o fator tratamento e o pré-tratamento ( $F_{(1, 36)} = 5.834$ ,  $P = 0.0209$ ;) influenciando significativamente no resultado. O grupo MIFE + veículo, ao ser comparado com o grupo controle, apresenta significativa elevação no tempo de latência ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.510$ ), ao passo

que o grupo MIFE + LPS apresenta redução do tempo de latência se comparado com o grupo MIFE + veículo ( $p < 0.05$ ;  $q = 4.483$ ).

**Figura 24** - Gráficos referentes aos padrões comportamentais de camundongos prenhes expostos ao teste do campo aberto



Fonte: do autor

**Nota:** (A-D) Gráficos referentes às medidas complementares observadas em camundongos prenhes submetidos ao teste do campo aberto. O eixo das abcissas representa o pré-tratamento. (A) Média de rumping no teste do campo aberto. (B) Frequência de esticar. (C) Frequência de defecações no campo aberto. (D) Frequência de grooming no teste doo campo aberto.

**Nota:** (\*\*) representa valores onde  $p < 0.01$ ; (\*\*\*) valores onde  $p < 0.001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  sendo comparativos ao grupo salina + veículo. (##) representa valores de  $p < 0.01$  quando se comparados com o grupo MIFE + salina.

No que diz respeito às análises complementares dos animais submetidos ao teste do campo aberto, importantes evidências são tomadas a partir dos resultados estatísticos. O tratamento com LPS de *E coli* no 10º dia de gestação de camundongos originou diferença estatística nos parâmetros de frequência de *rumping* ( $F_{(1, 36)} = 48.75$ ,  $P < 0.0001$ ), na frequência de movimentos de esticar ( $F_{(1, 36)} = 26.21$ ,  $P < 0.0001$ ) e na frequência de *grooming* ( $F_{(1, 36)} =$

8.108,  $P = 0.007$ ). Já o pré-tratamento das fêmeas prenhes com mifepristone provocou diferença significativa na frequência de movimentos de esticar ( $F_{(1, 36)} = 11.00$ ,  $P = 0.0021$ ) e na frequência de defecações ( $F_{(1, 36)} = 5.613$ ,  $P = 0.0233$ ). Ponto digno de notar é notar a existência de diferença estatística na interação entre os fatores tratamento e pré-tratamento na frequência de movimentos de esticar ( $F_{(1, 36)} = 5.363$ ,  $P = 0.0264$ ).

Na análise da frequência média de *rumping* no teste de campo aberto, representada pela figura 24A há, nota-se que o grupo salina + LPS apresenta uma diminuição significativa na média de *rumping* durante a execução o teste do campo aberto ( $p < 0.0001$ ;  $q = 9.270$ ). De forma similar, os grupos MIFE + salina ( $p < 0.01$ ;  $q = 3.927$ ) e MIFE + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 9.187$ ) também apresentam redução nesse parâmetro se comparados ao grupo controle. Mais ainda, o grupo MIFE + LPS apresenta também significativa redução na média de *rumping* quando comparado com o grupo MIFE + salina ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.920$ ).

A frequência média de movimentos de esticar também foi objeto de análise no nosso estudo e está representada graficamente na figura 24B. Averiguou-se que o grupo salina + LPS apresentou redução significativa na média de movimentos de esticar ( $p < 0.0001$ ;  $q = 7.820$ ). O mesmo aconteceu com os grupos pré-tratados com mifepristone, tanto MIFE + salina ( $p < 0.001$ ;  $q = 5.752$ ) e MIFE + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 8.616$ ).

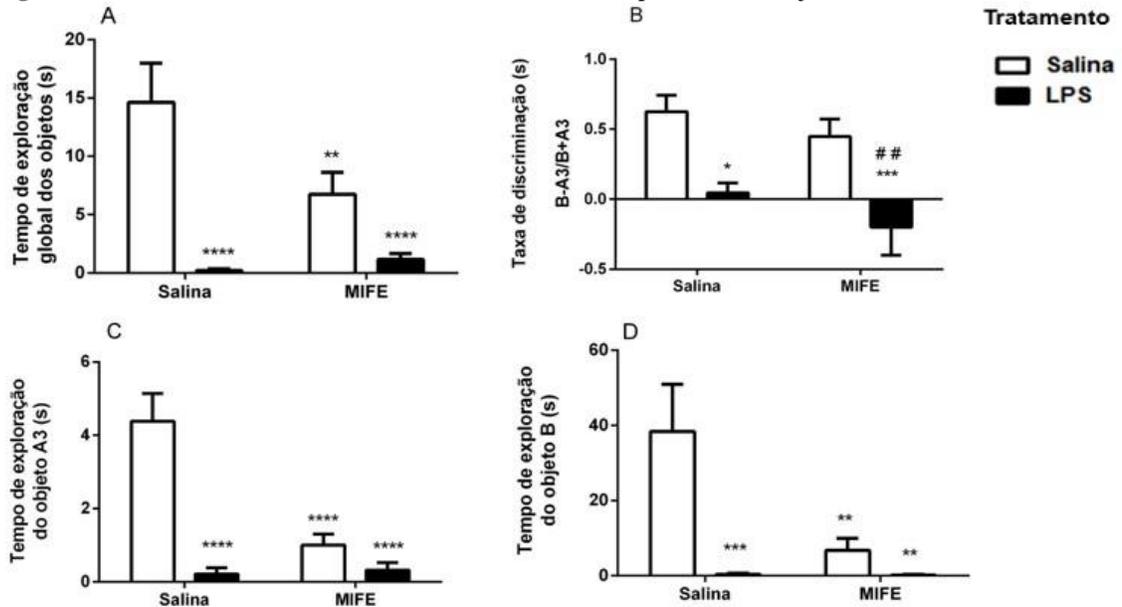
### 5.3.2.3 Teste do reconhecimento espontâneo de objetos

Os resultados obtidos no teste de reconhecimento espontâneo de objetos encontram-se concentrados na figura 25.

O tratamento com LPS no 10º dia de gestação de camundongos provocou diferença significativa no tempo de exploração global dos objetos ( $F_{(1, 36)} = 26.59$ ,  $P < 0.0001$ ), na taxa de discriminação ( $F_{(1, 36)} = 20.31$ ,  $P < 0.0001$ ), no tempo de exploração do objeto A3 ( $F_{(1, 36)} = 32.16$ ,  $P < 0.0001$ ) e no tempo de exploração do objeto B ( $F_{(1, 36)} = 11.82$ ,  $P = 0.0015$ ). Já o pré-tratamento com mifepristone foi capaz de gerar diferença significativa no tempo de exploração do objeto A3 ( $F_{(1, 36)} = 14.64$ ,  $P = 0.0005$ ) e no tempo de exploração do objeto B ( $F_{(1, 36)} = 6.034$ ,  $P = 0.0190$ ). Além dos resultados citados acima, há interação entre os fatores no que diz respeito à análise do tempo de exploração global dos objetos ( $F_{(1, 36)} = 5.200$ ,  $P = 0.0286$ ), no tempo de

exploração do objeto A3 ( $F_{(1, 36)} = 16.62, P = 0.0002$ ) e no tempo de exploração do objeto B ( $F_{(1, 36)} = 5.914, P = 0.0201$ ).

**Figura 25** - Gráficos relativos ao teste de reconhecimento espontâneo de objetos



Fonte: do autor

**Nota:** (A-D). Gráficos referentes ao teste de reconhecimento espontâneo de objetos. O eixo das abscissas representa o pré-tratamento. O eixo das abcissas represente o pré-tratamento utilizado. (A) Tempo de exploração global dos objetos. (B) Taxa de discriminação dos objetos. (C) Tempo de exploração do objeto A3. (D) Tempo de exploração do objeto B. (\*) cujo  $p < 0.05$ ; (\*\*) representa valores onde  $p < 0.01$ ; (\*\*\*) valores onde  $p < 0.001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0.0001$  sendo comparativos ao grupo salina + salina. Já (#) representa diferença estatística para valores de  $p < 0.01$  em comparação com o grupo salina + LPS.

Na análise do tempo de exploração global dos objetos, representado graficamente na figura 25A tem-se que fator tratamento com LPS nos animais prenhes afetou significativamente a exploração na etapa 2 do teste. Nessa etapa, especificamente, nota-se existir uma diminuição significativa do tempo de exploração dos objetos A1 e A2 nos grupos salina + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 7.437$ ); MIFE + salina ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.073$ ) e MIFE + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 6.950$ ) quando são comparados com o grupo controle.

A análise da taxa de discriminação dos objetos, representada graficamente pela figura 25B, indica que os grupos que receberam como tratamento o LPS [salina + LPS ( $p < 0.05$ ;  $q =$

4.263) e MIFE + LPS ( $p < 0.001$ ;  $q = 6.064$ )] apresentam redução significativa do parâmetro por hora analisado. Cumpre-se ressaltar que o grupo MIFE + LPS apresenta também redução significativa na exploração mediante à comparação com o grupo MIFE + salina ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.750$ ). Como no caso da taxa de discriminação do grupo MIFE + LPS fornecer valores negativos, considera que há um prejuízo significativo na retenção de memória a curto prazo nos animais deste referido grupo.

Quando analisa-se isoladamente a exploração do objeto A3 na terceira etapa do teste de reconhecimento espontâneo de objetos (figura 25C) tem-se que em todos os grupos experimentais quando foram comparados ao grupo controle apresentaram diminuição do tempo de exploração do objeto familiar [salina + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 9.748$ ); MIFE + veículo ( $p < 0.0001$ ;  $q = 7.903$ ); MIFE + LPS ( $p < 0.0001$ ;  $q = 1.845$ )].

Já a análise do tempo de exploração do objeto novo, na terceira etapa do teste de reconhecimento espontâneo de objetos (figura 25D), todos os grupos experimentais quando foram comparados ao grupo controle, apresentaram expressiva redução no tempo de exploração do objeto B [salina + LPS ( $p < 0.001$ ;  $q = 5.871$ ); MIFE + veículo ( $p < 0.01$ ;  $q = 4.888$ ); MIFE + LPS ( $p < 0.01$ ;  $q = 5.895$ )].

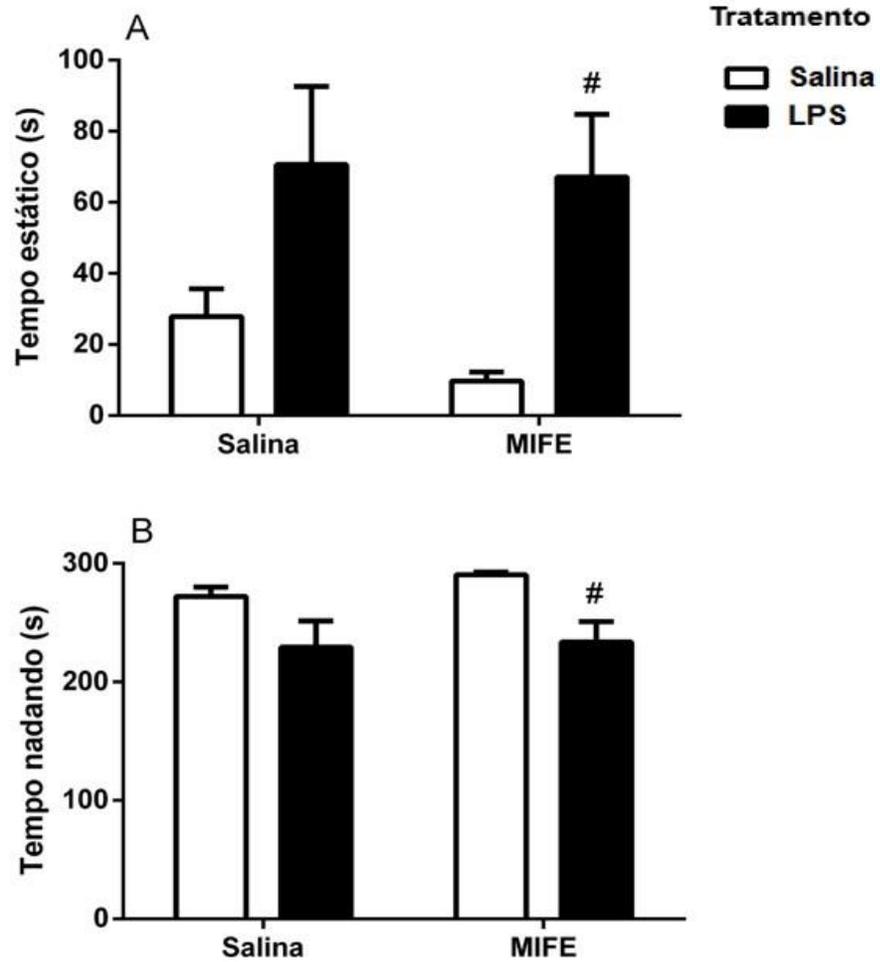
#### 5.3.2.4 Teste do nado forçado

Os gráficos referentes aos resultados obtidos na análise do teste do nado forçado encontram-se na figura 26.

Na averiguação do tempo em que o animal permanece estático no teste do nado forçado, observou-se que o fator tratamento com LPS apresenta diferença significativa ( $F_{(1, 36)} = 11.70$ ,  $P = 0.0016$ ). Percebeu-se também que na comparação com o grupo MIFE + veículo, os animais pertencentes ao grupo MIFE + LPS apresentaram um tempo boiando, expresso em segundos, maior ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.922$ ) (figura 26 A).

Quando se analisou o tempo nadando no teste do nado forçado notou-se que o fator tratamento com LPS também afetou causando efeitos significativos no resultado ( $F_{(1, 36)} = 11.77$ ,  $P = 0.0015$ ). Nesse ponto, os animais do grupo MIFE + LPS exibiram um menor tempo nadando do que em comparação com o grupo MIFE + veículo ( $p < 0.05$ ;  $q = 3.906$ ).

Figura 26 - Teste do Nado Forçado



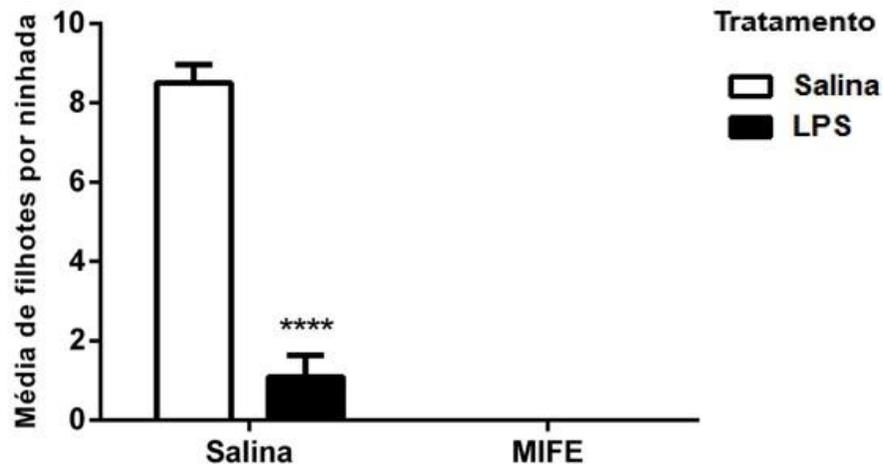
Fonte: do autor

**Nota:** (A-B) representam os gráficos de animais experimentais submetidos ao teste do nado forçado. O eixo das abcissas compreende o grupo de pré-tratamento. Nota: (#) representa diferença significativa existe em comparação com o grupo MIFE + veículo onde  $p < 0.05$

### 5.3.3 Análise da ninhada

De acordo com a Figura 27, os resultados referentes à análise da ninhada, indicam que o tratamento com LPS foi capaz de afetar de modo significativo o parâmetro analisado ( $F_{(1, 55)} = 212.8$ ,  $P < 0.0001$ ). Além disso, o fator pré-tratamento, também foi capaz de interferir significativamente no número de filhotes nascidos por ninhada ( $F_{(1, 55)} = 356.7$ ,  $P < 0.0001$ ), uma vez que não nasceram filhotes de fêmeas pertencentes aos grupos de pré-tratamento. O teste estatístico (ANOVA *two-way*), foi capaz de revelar a interação existente entre os dois fatores ( $F_{(1, 55)} = 212.8$ ,  $P < 0.0001$ ). A comparação entre o grupo salina + LPS e salina + salina indica que há uma redução significativa do número de filhotes nascidos por ninhada ( $p < 0.0001$ ;  $q = 24.96$ ).

Figura 27 – Análise da ninhada



Fonte: do autor

**Nota:** Gráfico representando o número médio de filhotes nascidos por ninhada. O eixo das abcissas compreende ao grupo de pré-tratamento utilizado no experimento. (\*\*\*\*) representa  $p < 0.0001$  quando comparado com o grupo salina + salina.

## 6 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento e a viabilidade gestacional de camundongos fêmeas no 10º dia de gestação tratadas com glicocorticoide exógeno ou inibidores da síntese de glicocorticoides previamente à administração de LPS de *Escheria coli* que induz comportamento doentio e os resultados obtidos na execução do presente estudo encontram-se discutidos a seguir.

### 6.1 ANÁLISE DA TEMPERATURA RETAL

Pela análise da temperatura retal das fêmeas pertencentes ao grupo salina + LPS foi possível constatar hipotermia, ou seja, diminuição significativa da temperatura nesses animais. Já quando os animais foram pré-tratados com dexametasona seguidos da administração de LPS nesses não foi observada a queda de temperatura vista nos animais salina + LPS. Portanto, a dexametasona foi capaz de evitar, de maneira significativa, a hipotermia gerada a partir do tratamento com LPS, com temperatura diagnosticada em níveis iguais estatisticamente ao grupo controle (salina + salina).

Já os animais que foram pré-tratados com metirapona seguidas do tratamento com LPS apresentaram uma diminuição significativa da temperatura em comparação com o grupo controle e também em comparação com o grupo metirapona + salina. Além do mais, o resultado demonstra que a temperatura retal dos animais MET + LPS foi significativamente mais elevada quando comparada com a do grupo salina + LPS. Portanto, é cabível afirmar que a metirapona foi capaz de atenuar a hipotermia gerada pelo LPS. No entanto, o pré-tratamento com a metirapona não foi capaz restabelecer a temperatura retal para níveis normais pois era ainda menor do que o observado nos controles.

Quanto ao pré-tratamento com mifepristone, seguido de LPS, foi possível constatar uma diminuição significativa da temperatura retal em comparação ao controle e ao grupo MIFE + salina. Dessa forma, pode-se afirmar que o tratamento com LPS, mesmo no grupo que foi pré-tratado com mifepristone, causou hipotermia nos animais prenhes.

Segundo Fewell et al (2010), o LPS é capaz de produzir resposta sistêmica, alterando também a temperatura corporal, dependente do estado fisiológico do animal. Embora, segundo o mesmo autor, a resposta mais frequentemente encontrada seja a hipertermia, mudanças fisiológicas ocorridas durante o quadro gestacional podem alterar o tipo de resposta sistêmica levando ao estado hipotérmico. Fewell et al (2010) afirmaram que durante a gestação, especialmente em períodos próximos ao parto, há mudança nos centros de termorregulação no SNC, diminuindo sua atividade, ocasionando em hipotensão e perda de calor.

Segundo Dogan et al (2000), não é possível generalizar afirmando que a aplicação de LPS resulte necessariamente em hipertermia, uma vez que o sorotipo da bactéria gram negativa utilizada é fundamental para o estabelecimento do tipo de resposta termorregulatória a ser encontrada.

Nesse sentido, Akarsu e Mamuk (2007) estudaram a influência de diversos sorotipos de LPS na resposta de hipotermia e de febre administrados intraperitonealmente em ratos acordados, utilizando a dosagem de 250 µg/kg. Os resultados encontrados indicam que o sorotipo 055:B5 provocou uma resposta hipotérmica inicial seguida de febre, enquanto que o sorotipo 0111:B4 causou uma resposta monofásica mais potente onde foi constada apenas a hipotermia (DOGAN; ATAUGLU; AKARSU, 2000). Vários estudos demonstraram que o LPS é capaz de provocar hipotermia seguida ou não de quadros de febre em ratos (FILKINS; DI LUZIO, 1968; NASCIMENTO et al, 2013; UENO et al, 1982), e em camundongos (KOZAK, 1997; PAUL et al, 1999; WANG et al, 1997). Adicionalmente outros autores afirmaram que a resposta de hipotermia é observada quando concentrações acima de 0.5 mg/kg de LPS, consideradas altas, são utilizadas, (DOGAN; ATAUGLU; AKARSU, 200).

Embora existam diferenças metodológicas entre nosso estudo e outros descritos na literatura, o trabalho de Nascimento et al (2013) demonstrou que a injeção intraperitoneal de LPS cujo serotipo é 0127:B8, provocou tanto em fêmeas virgens quanto em fêmeas lactantes, um quadro de hipotermia após 2 horas da aplicação. Nossos resultados são também similares aos achados de Aguila et al (2006) e Toyama (2012), os quais mostraram também a diminuição da temperatura corpórea após 2 e até 3 horas após o tratamento com LPS.

Segundo Romanovsky e Szekely (1998), a hipotermia encontrada em resposta ao LPS é uma maneira adaptativa do organismo se defender contra o desafio imunológico. Ainda nesse

sentido, Toyama (2012) afirmou que a hipotermia encontrada em fêmeas prenhes que receberam LPS foi devido a um mecanismo neuroprotetor materno contra isquemia provocada pelo LPS.

Toyama (2012) correlacionou a diminuição da temperatura corporal de camundongos fêmeas prenhes tratadas com LPS ao aumento de TNF- $\alpha$ , cujo bloqueio realizado por meio de anticorpo foi capaz de reduzir esses efeitos (TOLLNER et al, 2000) e secreção já foi demonstrada em macrófagos periféricos (KOZAK, 1997). Além do mais, tem sido proposto que o TNF- $\alpha$  desempenha um papel criogênico endógeno na modulação da resposta febril da temperatura corporal (LONG et al, 1990, 1992; LEON et al, 1997). Sendo assim, pressupõe que o TNF- $\alpha$  medeia a hipotermia através de um papel antipirético que previne o aumento da temperatura a níveis danosos causada pela exposição ao LPS.

Sabe-se que o período gestacional é uma fase que altera de maneira significativa o balanço de citocinas pirogênicas e antipiréticas/criogênicas seguidas da exposição a um composto pirogênico exógeno (ASHDOWN et al, 2007; FOFIE; FEWELL; MOORE, 2005). Não obstante, Fewell et al (2010) demonstraram que a administração de 160  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de *E. coli* LPS aumentou as concentrações plasmáticas de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-1ra e TNF- $\alpha$  em ratas não prenhes. Os mesmos autores descreveram que o LPS promoveu em ratas prenhes apenas aumento de IL-1ra e TNF- $\alpha$  sem alterar os níveis de citocinas pirogênicas, como IL-6 e IL-1  $\beta$ . Tais achados demonstraram que a gestação modifica o balanço entre citocinas pirogênicas e criogênicas. Estudos demonstram que a terapia com base em anti-TNF atenua a diminuição da temperatura provocada a partir da administração de altas dosagens de LPS (TOLLNER et al, 2000). Estudos demonstram que a terapia com base em anti-TNF atenua a diminuição da temperatura provocada a partir da administração de altas dosagens de LPS (TOLLNER et al, 2000). Além disso, pode-se afirmar que há maior concentração plasmática de TNF- $\alpha$  após a indução da endotoxemia, sendo que a concentração máxima ocorre entre um ou duas horas após a aplicação do LPS (BUENO et al, 1999; PEIRÓ et al, 1999)

Giusti-Paiva et al (2003), demonstraram a correlação positiva entre o aumento dos níveis de vasopressina e a diminuição da temperatura corporal, trabalhando com ratos machos. Os autores afirmam ainda que a observação da temperatura corporal assume um comportamento bifásico, uma vez que há, nas primeiras duas horas, queda na temperatura corpórea, seguida de elevação da mesma após duas horas com concomitante decaimento dos níveis de vasopressina.

Entretanto, outros autores (ROMANOVSKY et al, 1998) demonstraram que a injeção intravenosa de 10 µg/Kg em ratos induziu resposta trifásica, causando posteriormente febre, revelando que o tempo necessário para que a resposta febril seja desencadeada em ratos da linhagem Wistar é de até 300 minutos.

Rosa et al (2003), demonstraram em equinos que aplicação de LPS produziu elevação da temperatura retal e o aumento de TNF- $\alpha$  com concomitante redução da motilidade intestinal entre 1h15min e 6 h após aplicação da endotoxina. Porém, nos animais que foram pré-tratados com dexametasona 30 minutos antes da injeção de LPS, houve ausência de febre. Segundo os autores, a ausência de febre nestes animais pode estar relacionada pela diminuição ou mesmo inibição da produção de prostaglandina e ainda pela inibição da síntese de TNF- $\alpha$  (MORRIS et al, 1991). A dexametasona reduz a transcrição do gene para TNF e também diminui a tradução do RNAm de TNF (BEYAERT; FIERS, 1998). Tais achados vão de encontro aos nossos resultados, uma vez que também não foi observada febre em camundongos prenhes no 10º ddg pré-tratados com dexametasona e submetidos ao LPS. Em nossos estudos, também não observamos diminuição da temperatura retal nas prenhes desse grupo se comparado com o grupo controle (salina + veículo), porém aumento da temperatura em relação ao grupo salina + LPS, o que sugere o papel da dexametasona na prevenção da hipotermia gerada pelo LPS.

Já a respeito dos achados sobre a temperatura retal no grupo pré-tratado com metirapona, percebe-se que a mesma não foi capaz de evitar a hipotermia gerada pelo LPS em comparação com o grupo controle, embora tenha aumentado significativamente a temperatura se comparado com o grupo salina + LPS.

A metirapona é capaz de potencializar a hipotermia induzida por canabinoides em camundongos machos (PRYCE; GIOVANNONI; BAKER, 2007). Além disso, a metirapona intraperitoneal de 150 mg/kg foi capaz de causar uma leve hipotermia em ratos (DROUET et al, 2012). Estudos apontam que a hipotermia apresenta um efeito neuroprotetor, mas que a atividade da metirapona, no sentido de potencializar a hipotermia, não está relacionada à esta neuroproteção (ADACHI et al, 1999; DROUET et al, 2012; SMITH- SWINTOSKY et al, 1996; ZHAO; STEINBERG; SAPOLSKY, 2007). Na verdade, a diminuição da temperatura corporal está correlacionada a uma inibição global do metabolismo energético, uma vez que a metirapona causa diminuição do consumo de oxigênio e de utilização de glicose (BRUNO; METZGER; MALAISSE, 1972; DROUET et al, 2012; WERNER, 1988). Além disso, já foi demonstrado

anteriormente que a metirapona é capaz de diminuir a temperatura corporal com concomitante aumento da concentração de glicose sanguínea (DROUET et al, 2010 e 2012; WERNER, 1988).

Diferente dos estudos procedidos em ratos e camundongos machos, em nosso estudo a metirapona por si só não foi capaz de causar hipotermia, sendo diagnosticada hipotermia apenas nos animais MET+ LPS. Esses resultados sugerem que a gestação possa interferir na termorregulação de modo a proteger a hipotermia que deveria ser gerada por meio da aplicação de metirapona.

Nota-se que o pré-tratamento com mifepristone também não foi capaz de evitar a hipotermia gerada a partir da aplicação do LPS. Em nossos estudos observamos a diminuição significativa da temperatura retal nos grupos MIFE + LPS quando comparado com o grupo Salina + LPS ou com o grupo MIFE + salina.

A combinação entre mifepristone e canabinoides provoca uma potencialização da hipotermia gerada através da aplicação de endocanabinoides (PRYCE; GIOVANNONI; BAKER, 2003). Acredita-se que essa interação possa ser um efeito secundário da sub regulação dos efeitos tônicos do N-metil-D-aspartato na temperatura corporal (RAWLS et al, 2002). Por outro lado, o pré-tratamento com mifepristone foi capaz suprimir a hipotermia gerada pela aplicação de hidrocortisona e através do estresse de contenção por 6 horas (KAINUMA et al, 2009).

A administração de mifepristone em ratas prenhes não foi capaz de alterar a temperatura basal (FREEMAN et al 1970; MOORE; FEWELL, 2006; NAKAYAMA; SUZUKI; ISHIZUKA, 1975). Tais trabalhos corroboram com nossos achados, uma vez que o grupo MIFE + salina não apresentou diferença significativa na análise da temperatura quando comparado com o grupo controle.

Diferente dos dados obtidos em nosso estudo, Moore e Fewell (2006) descreveram que o mifepristone era capaz de atenuar as respostas de hipotermia frente à administração ao LPS de *E. coli* em ratas prenhes no 16º ddg. Nesse sentido, nossos resultados podem diferir dos resultados obtidos por esses autores em função dos mesmos terem investigado a ratas prenhes no período final da gestação, momento em que são elevados os níveis de corticosterona e reduzidos os de progesterona (MORISHIGE; PEPE; ROTHCHILD, 1973; PEPE; ROTHCHILD, 1974).

## 6.2 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO

No estudo comportamental pelo teste do labirinto em cruz elevado foi observado que o tratamento de fêmeas prenhes no 10º ddg com LPS diminuiu significativamente a média de entradas nos braços abertos, na plataforma central e nos braços fechados, sem que o pré-tratamento com dexametasona e mifepristone alterassem significativamente esses resultados.

Já quando o pré-tratamento utilizado foi a metirapona, o tratamento com LPS não apresentou diferença significativa nos parâmetros de tempo de exploração, seja no braço aberto, na plataforma central ou no braço fechado quando comparados com o grupo controle através do pós-teste. No pós-teste, o tratamento com LPS em fêmeas pré-tratadas com salina, apresentou diferença significativa nos parâmetros de entrada no braço aberto, entradas na plataforma central e entradas no braço fechado. Desse modo, portanto, a aplicação de LPS em fêmeas de camundongos prenhes reduziu de modo significativo a média de entradas em todas as zonas do labirinto em cruz elevado, demonstrando um efeito do LPS na redução da capacidade exploratória / locomotora nos animais tratados.

Sabe-se que a avaliação da ansiedade é o principal aspecto avaliado no referido teste. O aumento da atividade nos braços abertos (porcentagem de entrada e porcentagem de tempo gasto) indica redução da ansiedade (LISTER, 1987).

Por outro lado, mudanças no número total de entradas e/ou mudanças no número de entradas no braço fechado podem indicar efeitos não-específicos da atividade locomotora (MENARD; TREIT, 1999)

Segundo Pellow e et al (1986), o tempo de exploração dos animais nos braços abertos do labirinto elevado é uma medida confiável a fim de indicar-nos um comportamento semelhante à ansiedade. Nesse sentido, sabe-se que os animais possuem aversão por lugares abertos, sendo estes menos explorados (HOGG, 1996). Portanto, um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos, como o tempo de exploração do mesmo, revela um comportamento ansiolítico (LISTER, 1987), enquanto drogas que diminuem as atividades no braço aberto são ansiogências (GIANLORENÇO, 2009).

A averiguação da exploração do braço aberto é a medida clássica e referencial para o presente estudo a fim de que se possa categoricamente afirmar comportamentos semelhantes à ansiedade nos animais. De acordo com nossas análises estatísticas, observamos que não houve

alteração significativa no tempo de exploração do braço aberto, e portanto, do comportamento de ansiedade em nenhum dos grupos experimentais analisados em nosso estudo.

Porém, encontra-se diferença significativa no que diz respeito ao parâmetro de entradas no braço aberto. Nesse sentido, nossos resultados corroboram com os achados de Zavan (2011). A diminuição na frequência de entradas no braço aberto pode estar relacionada também com desvios em relação a capacidade locomotora e exploratória dos animais tratados.

A análise do número de entradas nos braços abertos e fechados é considerada como sendo uma medida de atividade locomotora dos animais submetidos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado (BOERNGEN-LACERDA; SOUZA-FORMIGONI, 2000; FILE, 2001; LACERDA, 2006; LISTER, 1987; RAMOS et al, 1997). Além disso, segundo diversos outros autores, a análise do número de entradas nos braços fechados contribui também para análise do fator da ansiedade (LISTER, 1987; RODGERS; JOHNSON, 1995).

A exploração no braço aberto do labirinto elevado é capaz de indicar também comportamentos relacionados ao medo. Diante disso, sabe-se que a exploração no braço aberto, mensurada através da entrada e do tempo de exploração, juntamente com outras medidas etológicas adicionais como o movimento de esticar (oriundo do inglês “SAP” - stretched attend postures, na qual o animal estica o corpo e volta à posição original sem que haja deslocamento) e o movimento de mergulho (imersão de cabeça) indica-nos desvios comportamentais não apenas de comportamento semelhante à ansiedade, mas também de medo (BARBALHO, 2007; RODGERS et al, 1997).

No presente estudo, em relação ao pré-tratamento com dexametasona, nota-se que os animais tratados com LPS (seja nos grupos salina + LPS ou DEXA + LPS) tiveram uma diminuição significativa no número de entradas no braço fechado sem que houvesse alteração no tempo de exploração tanto do braço aberto quanto também do braço fechado. O mesmo acontece nos animais em relação ao pré-tratamento com mifepristone (MIFE + LPS e salina + LPS de seu respectivo conjunto). A possível explicação para tal fato concerne na ideia de que haja um déficit locomotor/exploratório ocasionado pela administração do lipopolissacarídeo de *E. coli*.

O número total de entradas juntamente com o parâmetro de entradas no braço fechado são indicativos da atividade locomotora desempenhada pelos animais expostos ao labirinto em cruz elevado (FILE et al, 1992; LISTER, 1987; MENARD; TREIT, 1999). Esse conceito foi introduzido a partir do primeiro estudo fatorial a respeito das variáveis do labirinto em cruz

elevado (LISTER, 1987). A partir de então, e após diversas replicações do referido estudo, diversos outros autores passaram a considerar o parâmetro de entradas no braço fechado como uma medida de atividade locomotora no labirinto em cruz elevado (BOERNGEN-LACERDA ; SOUZA-FORMIGONI, 2000; FILE, 2001; LACERDA, 2006; LISTER, 1987; RAMOS; MORMEDE, 1997).

Embora classicamente o teste do labirinto em cruz elevado sirva para indicar-nos comportamento semelhante à ansiedade é necessária cautela ao se fazer tal pressuposto, uma vez que resultados ansiolíticos e/ou ansiogênicos podem ser falsos-positivos devido a alterações na locomoção do animal (CORNÉLIO, 2005). Portanto, considerando que a frequência média de entradas no braço fechado está correlacionada com a atividade locomotora dos animais (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; FILE, 1992; LACERDA, 2006; LISTER, 1987) nossos dados apontam para uma diminuição da atividade locomotora de todos os animais analisados em nosso estudo desde que tratados com LPS quando expostos ao teste do labirinto em cruz elevado no 10º dia de gestação.

Outro parâmetro analisado em nosso estudo foi a frequência média de entradas na plataforma central. Nossos resultados apontam para uma diminuição no referido parâmetro em fêmeas prenhes tratadas com LPS, sem que o pré-tratamento com dexametasona e mifepristone pudessem prevenir tal acontecimento.

Wall e Meisser afirmaram que a exploração e a entrada na plataforma central estão associadas com o fator de tomada de decisão, uma vez que é associada à resposta de conflito entre esquiva e aproximação do braço aberto. (WALL; MEISSER, 2001). Segundo os mesmos autores e Lacerda (2006), a presença dos animais nesta localidade do labirinto em cruz elevado indica a avaliação de risco. Lacerda afirma ainda que é necessário ter cautela ao se considerar a exploração da plataforma central como medida de ansiedade.

Como classicamente considerado, os ratos e camundongos apresentam aversão ao braço aberto, preferindo explorar largamente os braços fechados. Tal constatação é explicada a partir da neofobia, que nada mais é que o medo da novidade, além da elevação do braço aberto. (FILE, 2001; LISTER, 1987; PELLOW et al, 1985). Como a plataforma central assegura um local característico de avaliação de risco e perigo, os animais normais tendem a ser mais cautelosos ao se aproximarem da plataforma central, exibindo movimentos mais vagarosos, além de alta frequência de retornos aos braços fechados (RODGERS, 1993).

Rodgers e Jonhson (1995) ampliaram a análise dos índices de ansiedade no LCE incluindo a observação de comportamentos etológicos como levantamentos, mergulhos, esticadas, exploração do ambiente através do olfato, autolimpeza, além de retornos aos braços fechados (saída do braço fechado com apenas um par de patas, com posterior retorno ao mesmo braço).

Para complementar os achados comportamentais e conferir a possibilidade de uma atividade ansiolítica e ou ansiogênica do tratamento com LPS durante a prenhez de camundongos, foram realizadas análises complementares nos testes de Labirinto em cruz elevado.

Nossos resultados apontam para uma diminuição significativa na frequência média de *rumping* em animais tratados no 10º dia de gestação com LPS, sem que o pré-tratamento com dexametasona, metirapona ou mifepristone pudessem interferir de maneira significativa nos achados.

O ato de empinar o corpo colocando as patas dianteiras nas paredes laterais do labirinto, levantando a cabeça e se apoiando sob as duas patas dianteiras é caracterizado como *rumping* ou *rearing*. É uma medida importante a ser observada nos testes etológicos, pois indicam aumento da atividade de ansiedade nos animais. Pode ser aplicada como importante ferramenta de análise no teste do labirinto em cruz, aplicados e descritos por vários autores (BARBALHO, 2007; GIANLORENÇO, 2009; LACERDA, 2006; MAGALHÃES, 2011; SERAFIM, 2008).

O comportamento de levantar-se consiste na postura bípede do animal, apoiando-se nas patas posteriores, estando ereto ou semi-arqueado. Esse comportamento, junto com a quantidade de entradas nos braços fechados e a quantidade total de entradas, é considerado por alguns autores como um indicador da atividade motora (COLE; RODGERS, 1993; CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994). É mais usado para mensurar a atividade de locomoção vertical e pode-se observar também que sua frequência tende a aumentar nos braços fechados do labirinto em cruz elevado (MARTINEZ et al, 2002).

Porém, é necessário que se destaque que o movimento de *rumping* também pode ser influenciado pelo fator ansiedade, sobretudo quando os animais são expostos a um ambiente novo e se encontram num conflito entre o medo e a exploração (BOERNGEN-LACERDA; SOUZA-FORMIGONI, 2000; LACERDA, 2006).

Diante do descrito na literatura, portanto, os resultados obtidos por meio da análise da frequência média de *rumping* deste trabalho indica, mais uma vez, que o tratamento com LPS promoveu uma diminuição na capacidade exploratória dos animais expostos ao Labirinto em Cruz Elevado. Nos animais dos grupos MET + salina e MIFE + salina foi também observada redução significativa na frequência média de *rumping*. Sendo que tanto Metirapona como mifepristone são fármacos inibidores da síntese de glicocorticoides, é plausível que a inibição destes hormônios tenha levado a diminuição da frequência de *rumping* e da capacidade motora destes animais, hipótese reforçada pelo fato de não observamos em nossos estudos o mesmo resultado nos animais onde foi administrado o glicocorticoide exógeno dexametasona.

Outro parâmetro analisando durante o teste do labirinto em cruz elevado foi a frequência média de esticar. Este parâmetro consiste na análise da frequência de movimentos no qual o animal se estica a fim de examinar o ambiente na qual fora inserido e volta à sua posição original. Originalmente é chamado de “*stretched attend postures*”. Esse tipo de movimento constitui um movimento de avaliação de risco (“*risk assessment*”). Naturalmente, os animais tendem a se aproximarem de maneira cautelosa do braço aberto do labirinto, numa posição de saída da plataforma central, realizando o movimento de esticar, retornando ao braço fechado posteriormente (LACERDA, 2006; RODGERS, 1992). Nesse tipo de movimento, o animal coloca suas patas traseiras fixas enquanto que as dianteiras se movem para frente a fim de identificar a localidade do braço aberto, retornando, em seguida, para a posição original.

O movimento de esticar apresenta a função primordial de avaliação de risco predatório (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989) ou de verificar e confirmar o perigo iminente diante da exposição do animal ao labirinto elevado (ESPEJO, 1997), podendo estar também diretamente relacionada o medo (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994). Além disso, esse tipo de movimento apresenta correlação positiva com os níveis de corticosterona como resultado à exposição ao LCE (RODGERS et al, 1999).

Estudos apontam que uma redução no comportamento de esticar, juntamente com um aumento no comportamento de mergulho no LCE, preconiza uma atividade ansiolítica (CRUZ; FREI. GRAEFF, 1994; KOCHENBORGER, 2012; RODGERS et al, 1997). Esse tipo de comportamento apresenta também ambivalência com a aproximação-esquiva (RODGERS et al, 1999). Além do mais, sabe-se também que a frequência de movimentos de esticar é maior nos momentos iniciais da sessão, onde os animais buscarão coletar informações a respeito do

ambiente novo no qual foram inseridos (RODGERS et al, 1996). De acordo com as informações coletadas, o animal poderá, então, traçar a melhor estratégia comportamental, de acordo com o local no qual foi inserido (AMARAL; SANTOS GOMES, NUNES-DE-SOUZA, 2010; BLANCHARD et al, 1993; RODGERS et al, 1999).

Embora esse tipo de comportamento esteja muito relacionado com alterações no que diz respeito à ansiedade, análises farmacológicas e fatoriais mostraram que o movimento de esticar também está relacionado com a capacidade de avaliação de risco por parte dos animais expostos ao LCE (RODGERS; JOHNSON, 1995).

Em nossos estudos, foi revelado que os animais tratados com LPS, independente do pré-tratamento utilizado, seja salina, dexametasona, metirapona ou mifepristone, apresentaram uma significativa redução no comportamento de esticar. Nesse sentido, embasado pelos trabalhos científicos acima citados, pode-se afirmar que esses animais, no qual fora administrado o LPS de *E. coli* apresenta uma menor atividade de avaliação de risco. Ou seja, o LPS é capaz de contribuir de modo significativo a fim de diminuir o número de vezes que o animal avalia o perigo e o risco iminentes no labirinto em cruz elevado.

Nosso trabalho levanta ainda a hipótese de que esse tipo de comportamento esteja sendo prejudicado pelo tratamento com LPS devido sua diminuição da capacidade exploratória. Embora tal parâmetro esteja relacionado com o comportamento de avaliação de risco, o tratamento com LPS pode diminuir, primeiramente, a capacidade locomotora e exploratória do animal, fazendo com que ele apresente um menor número de movimentos de esticar. Além disso, trabalha-se também a hipótese da questão motivacional intrínseca nesse aspecto. A administração do LPS em animais é capaz de gerar o comportamento doentio que pode ser estudada a partir de uma visão motivacional (DANTZER, 2001; KINOSHITA, 2007; LARSON et al, 2001). Trabalhando em cima dessa abordagem, o presente trabalho aponta para a hipótese de que o animal tenha organizado suas prioridades e desempenhe um menor número médio de movimentos de esticar por uma questão motivacional. Na verdade, a hipótese seria de que o animal tratado com LPS esteja, de fato, em comportamento doentio e, sendo assim, apresente uma prioridade reduzida para a exploração do labirinto em cruz elevado e conseqüentemente uma redução no número de movimentos de avaliação de risco.

O grupo DEXA + salina apresentou um aumento significativo no número médio de movimentos de esticar quando comparado com o grupo controle. Estudos afirmam que a

corticosterona, que é pertencente à classe dos glicocorticoides, relacionam-se positivamente com a intensidade de movimentos de avaliação de risco (MIKICS et al, 2005; RODGERS et al, 1999). Ainda nesse sentido, tem-se que os hormônios glicocorticoides atuam de modo a aumentar a síntese de noradrenalina no *locus coeruleus* estimulando a liberação desse referido neurotransmissor na região basolateral da amígdala (McINTYRE et al, 2003; QUIRARTE; ROOZENDAAL; McGAUGH, 1997). Os hormônios glicocorticoides são capazes de atuar ainda na neurotransmissão serotoninérgica, a qual, por sua vez, está associada com os movimentos de avaliação de risco, de maneira positiva (GRIEBEL et al, 1997; SETEM et al, 1999; SIZE, 1976).

Portanto, é possível que em nossos estudos o pré-tratamento com dexametasona seguida do tratamento com salina, tenha aumentado a frequência de movimentos de avaliação de risco por agir aumentando a síntese de noradrenalina ou agir ainda na neurotransmissão serotoninérgica.

Analisando o comportamento de mergulho no LCE, sabe-se que tal comportamento é definido como o ato do animal examinar embaixo dos braços abertos, com os olhos voltados para a direção do chão. A análise do índice de mergulhos é válida para observar atividades ansiolíticas, ansiogências e de impulsividade. Quando há um aumento no número de mergulhos, podemos afirmar que há um aumento na impulsividade do animal (MAGALHÃES et al, 2011). O comportamento de mergulhos também está correlacionado à ansiedade (ANSELONI; BRANDÃO, 1997).

Em nossos estudos, o LPS foi capaz de diminuir significativamente a frequência de mergulhos no LCE, e os pré-tratamentos com dexametasona, metirapona e mifepristone não foram capazes de prevenir esse efeito. Diversos trabalhos descrevem que comportamento de mergulhar a cabeça pode ser considerado como um indicador de atividade exploratória, além de poder sofrer alteração em quadros de transtorno de ansiedade (FERNANDES; FILE, 1996; LISTER, 1987; RODGERS; JOHNSON, 1995;). Sabe-se que a partir de estudos de análise fatorial, foi afirmado que o mergulho de cabeça a partir de áreas protegidas está correlacionado diretamente com o fator ansiedade. Já a frequência total de movimentos de mergulho está associada com a atividade exploratória (HOLMES; RODGERS, 1999; RODGERS; JOHNSON, 1995).

Há de ressaltar que os grupos MET + salina e MIFE + salina, ao serem comparados com o grupo controle apresentaram uma significativa diminuição no número médio de movimentos de mergulhos na exposição dos animais no teste do labirinto em cruz elevado. Tal indício pode ser

resultado da diminuição da exploração no aparato. Tais achados podem ser importantes quando comparados com o pré-tratamento com dexametasona seguidas da administração com salina, que não apresentou redução no parâmetro de mergulhos. Isso indica-nos que os glicocorticoides no 10º dia de gestação de camundongos podem contribuir para o tipo de comportamento em questão.

Outro tipo de comportamento analisado durante a exposição ao LCE foi o número médio de *grooming*. Por definição, sabe-se que esse tipo de movimento é caracterizado quando os animais levam as patas anteriores e posteriores em direção à boca ou à cabeça, podendo haver, ou não, a continuidade destes movimentos com a região das orelhas e podendo existir o movimento de *lamber* em diversas regiões do corpo, inclusive na região genital (PESTANA, 2010). Segundo estudo de MacFarlan e Reeder (1974), animais gastam parte significativa do tempo realizando movimentos de *grooming* e tal tipo comportamental pode ser aumentado em animais apreensivos (ARCHER, 1973). O movimento de *grooming* tem sido associado ainda em correlação positiva com comportamento semelhante à ansiedade, além de apresentar correlação negativa com outros tipos de comportamento (RODGERS; JOHNSON, 1995). Tais pressupostos foram condizentes com nossos achados, uma vez que a administração do LPS em animais que foram pré-tratados previamente com salina, aumentou significativamente a frequência média de *grooming* com concomitante diminuição de outros padrões comportamentais como a frequência média de *rumping*, esticar e mergulhos.

Pode-se afirmar que o tratamento com LPS foi capaz de provocar um comportamento semelhante à ansiedade, a partir da análise da frequência de *grooming*. Porém, caso fosse de fato diagnosticado tal comportamento, haveria de se esperar que outras alterações significativas fossem diagnosticadas no teste do labirinto em cruz, como a aumento do tempo de permanência no braço fechado. Contudo, tal evidenciação não foi significativa no nosso estudo. Na verdade, nossos resultados do tratamento com LPS frente à exposição ao labirinto em cruz elevado levam em direção à diminuição da capacidade exploratória/locomotora dos animais. De fato o comportamento semelhante à ansiedade já foi diagnosticado em estudos prévios a partir do tratamento com LPS (LACOSTA; MERALI; ANISMAN, 1999; PAIVA et al, 2010; SWIERGIEL; DUNN, 2007). Porém, nosso estudo vem trazer à discussão um aspecto proposto ainda por Hart (1988) em relação ao número de episódios de auto-limpeza.

Durante o comportamento doentio associado a quadros de febres, comportamentos que levam a uma perda de calor são diminuídos, a exemplo do que acontece com o *grooming*,

enquanto outros movimentos são realizados a fim de produção de calor, como tremores, ou que ainda movimentos que minimizam a perda de calor (BRIESE, 1997; CONH, 2003; DANTZER, 2006; HAINSWORTH, 1967; HART, 1988).

Em nosso estudo, a febre em animais prenhes no 10º dia de gestação mediante o tratamento com LPS, não foi diagnosticada. Ao contrário, foi diagnosticada hipotermia após 2 horas da aplicação do LPS. Portanto, é possível que os animais de nosso estudo, que se apresentam hipotérmicos mediante à aplicação do LPS, tenham aumentado o seu número médio de *grooming* como estratégia de aumento da temperatura cutânea. O movimento de *grooming* pode ser interpretado ainda como um movimento relacionado ao estresse. Alguns autores afirmam que a esse tipo de comportamento seja ativado em situação de estresse e que animais que apresentassem maior frequência nesse padrão comportamental seriam mais emocionais (MOYAHU; VALENCIA, 2002; MURPHY et al, 1996; WEISS et al, 2004).

Portanto, diante dos resultados apresentados no presente estudo, é cabível afirmar que o tratamento com LPS em fêmeas de camundongos prenhes no seu 10º dia de gestação, provocou um aumento significativo na frequência de *grooming* devido à hipotermia averiguada mediante análise da temperatura retal, sendo possível também de associar ao nível de estresse do animal.

Nossos resultados indicam ainda que o pré-tratamento com dexametasona seguida da aplicação com LPS, diminuiu a frequência de *grooming*. O mesmo foi observado mediante o pré-tratamento com metirapona e mifepristone e seguidas de LPS. Ou seja, tanto o grupo MET + LPS quanto o grupo MIFE + LPS apresentam redução significativa na frequência média de *grooming* durante a exposição ao labirinto o que permitiu-nos concluir que a inibição de glicocorticoides pode evitar o aumento do comportamento de *grooming* causado pelo LPS.

Coletivamente, os resultados acerca do comportamento do animal tratado com LPS submetido ao teste do labirinto em cruz elevado, indicam uma redução da capacidade exploratória e locomotora dos mesmos.

Para comprovar, de fato, a diminuição na locomoção e queda no comportamento exploratório, utilizamos o teste do campo aberto com o intuito de averiguar os efeitos do tratamento com LPS e do pré-tratamento com glicocorticoide e inibidores da síntese de glicocorticoides nos comportamentos semelhante à ansiedade e déficits no que diz respeito a capacidade de exploração/locomoção.

Os roedores parecem preferir a periferia ao centro do aparelho quando expostos pela primeira vez ao campo aberto (CAROLA et al, 2002; LISTER, 1990; PRUT; BELZUNG, 2003; RAMOS et al, 1997). Porém, a novidade de uma primeira exposição a um novo ambiente, como o campo aberto, pode ocasionar em imobilidade ou extrema locomoção na periferia do aparelho (FILE, 2001). A locomoção normalmente é medida pelo número de linhas cruzadas pelo animal, tempo para realizar o primeiro cruzamento e também verificando o tempo de permanência na periferia e no centro (LACERDA; 2006).

No presente estudo foi observada diferença significativa no número de cruzamentos entre os quadrantes centrais, periféricos, além de acentuada redução no número de cruzamentos entre centro e periferia e significativa redução também no número de cruzamentos totais. Nesse sentido, nosso estudo propõe que o LPS foi capaz de diminuir, de fato, a capacidade exploratória/locomotora do animal, caracterizando um quadro de comportamento doentio. Tal evidência foi encontrada até mesmo nos animais que receberam como pré-tratamento a dexametasona, a metirapona e a mifepristona ou seja esses fármacos não foram capazes de reverter o comportamento doentio que diminuiu a capacidade motora destes animais

No referido teste, os roedores submetidos ao mesmo tendem a preferir a exploração e a permanência nos quadrantes periféricos em detrimento da região central devido ao efeito de tigmotaxia (CAROLA et al, 2002; LISTER, 1990; PRUT; BELZUNG, 2003; RAMOS et al, 1997). Dessa forma, a tigmotaxia poderia estar relacionado com o fator de ansiedade no teste do campo aberto (CHOLERIS et al, 2001). O emprego do teste do campo aberto poderia ainda se relacionar com o estudo da ansiedade, uma vez que um aumento na ambulação do animal e maior permanência do mesmo na região central poderiam indicar uma redução da ansiedade (LISTER, 1990; CHOLERIS et al, 2001).

Nossos resultados demonstram que houve aumento no tempo de permanência no centro do teste do campo aberto com concomitante diminuição no tempo de exploração da região periférica nos animais tratados com LPS. Tal resultado encontrado pode indicar uma redução da ansiedade. No entanto, em animais pré-tratados com mifepristone e submetidos ao LPS, não foram encontradas diferenças significativas no tempo de permanência no centro e na periferia. Embora o resultado não tenha sido considerado significativo pelo pós-teste estatístico usado em comparação com o grupo controle (MIFE + LPS vs grupo controle), o fator tratamento com LPS foi considerado significativo na realização do teste de ANOVA *two-way*. Contudo, os

resultados obtidos pela utilização do teste de campo aberto confirmam os obtidos no LCE que diagnosticou diminuição da capacidade exploratória

Ainda no que diz respeito ao emprego do teste do campo aberto como averiguação do estado semelhante à ansiedade em animal, a literatura científica mostra que tal proposta é criticada por autores uma vez que as medidas utilizadas para indicar o aumento ou a redução da ansiedade (tempo de permanência no centro) poderiam ser influenciadas por várias medidas, como, por exemplo, a própria atividade locomotora e de exploração dos animais (FILE, 2001; LACERDA, 2006). Por exemplo, caso um animal apresente um alto grau de exploração na periferia, porém com exploração reduzida na região central, não significaria necessariamente um alto grau de ansiedade, mas pode representar também um efeito estimulante de uma determinada droga ou ainda a ação comportamental de exploração e locomoção mais acentuados numa região protegida do campo aberto (LACERDA, 2006).

Nosso trabalho, portanto, parte do pressuposto que um aumento no tempo de exploração na região central, juntamente com uma diminuição no tempo de exploração na periferia, se deve, num fator mais preponderante, à diminuição da capacidade exploratória e locomotora gerada através da aplicação do LPS. A existência de um comportamento semelhante à redução da ansiedade deveria estar acompanhada de alterações proeminentes significativas também na realização do teste do labirinto em cruz elevado, como já mencionado anteriormente na discussão.

Cumpra salientar que pela análise do campo aberto o grupo MET + salina apresentou significativa redução no número de cruzamentos entre centro e periferia e no número de cruzamentos totais, quando comparado com o grupo controle. Nesse sentido, nossos resultados corroboram com os achados de Canini et al (2009) que afirmaram que a metirapona é capaz de diminuir de maneira aguda a locomoção em ratos. Tais autores afirmam que a metirapona induz um decréscimo na locomoção concomitante a uma diminuição no comportamento exploratório no campo aberto, além de provocar queda na velocidade de locomoção dos animais, sendo seu mecanismo de ação independente de glicocorticoides.

Foi evidenciado pelo presente estudo também que há uma significativa redução no número de cruzamentos entre os quadrantes centrais no grupo MIFE + salina. Tal resultado pode ser indicativo de que a inibição da síntese de glicocorticoides a nível de receptores pode aumentar

o medo do animal para explorar o aparato, aumentando, desse modo, a tigmotaxia, ou diminuir a capacidade exploratória.

Outro resultado obtido no presente trabalho é o aumento significativo no tempo necessário para que os animais do grupo DEXA + LPS realizassem o primeiro cruzamento quando foi inserido no campo aberto. A combinação entre o pré-tratamento com dexametasona e o tratamento com LPS aumentaram significativamente o tempo necessário para o primeiro cruzamento no teste do campo aberto, tanto em comparação com o grupo controle quanto na comparação com o grupo salina + LPS. Embora não existam relatos na literatura, esses resultados sugerem que a combinação entre a dexametasona e o LPS é capaz de aumentar o medo do animal recém exposto ao campo aberto que somada a ação do LPS, o qual prejudica a capacidade exploratória e locomotora, culminaria com o aumento da latência para o primeiro cruzamento.

Já o grupo MIFE + salina também apresentou um significativo aumento no tempo de latência para o primeiro cruzamento quando comparado com o grupo controle. O grupo MIFE + LPS, por sua vez, apresenta uma redução significativa desse parâmetro comparado com o grupo MIFE + salina. Ou seja, o pré-tratamento com mifepristone seguida pelo tratamento com salina, foi capaz de aumentar significativamente o tempo para que o animal recém introduzido no campo aberto realizasse o primeiro cruzamento. Isso pode ser indicativo de diminuição da capacidade exploratória ou ainda aumento do comportamento semelhante ao medo nestes animais.

No teste do campo aberto, a locomoção e também o movimento de levantar (*rumping*) são consideradas características locomotoras e exploratórias possíveis de serem alteradas mediante a administração de drogas. Tal como exposto anteriormente, o movimento de *rumping* está vinculado com a capacidade locomotora e exploratória dos animais (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; JOHANSON; AHLENIUS, 1989; LACERDA, 2006). Através de tal exposto, podemos, mais uma vez, afirmar que o tratamento das fêmeas prenhes com LPS foi capaz de diminuir acentuadamente a capacidade locomotora e exploratória dos animais uma vez que em todos os grupos de animais que receberam LPS em nosso estudo, independente do pré-tratamento utilizado, houve diminuição significativa na frequência média de *rumping* em comparação com o grupo controle.

Ao se analisar a frequência média de movimentos de *rumping*, foi observado nos grupos MET + salina e MIFE + salina uma significativa redução na frequência média de em relação ao controle. Como ambos os pré-tratamentos funcionam de modo a inibir a síntese de

glicocorticoide, é possível que esses hormônios sejam importantes para desempenhar tal padrão de resposta comportamental no campo aberto.

Na realização do teste de campo aberto também foi diagnosticada a redução significativa na frequência média de esticar em grupos tratados com LPS. Tal fato também esteve presente no grupo pré-tratado com dexametasona que recebeu como tratamento a salina (DEXA + salina) e no grupo MIFE + salina. A frequência média de esticar no campo aberto, tal como acontece no labirinto em cruz elevado, é uma medida de avaliação de risco (LACERDA, 2006). Porém, é tida também como uma medida referente à capacidade exploratória dos animais (PESTANA, 2010). Tal medida é utilizada também com finalidade de indicar comportamento semelhante à ansiedade e para avaliar o grau de sedação dos animais (ARCHER, 1973). No caso do emprego do teste do campo aberto com intuito de avaliar o grau de sedação dos animais, sabe-se que o efeito sedativo é observado a partir da diminuição das locomoções horizontais, assim como diminuição da frequência de *grooming* e da atividade vertical de exploração do ambiente (BELZUNG; PRUST, 2003).

O grupo DEXA + salina também apresentou diminuição significativa na frequência de movimentos de esticar. Tal explicação pode estar concentrada na diminuição de movimentos de avaliação de risco (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989). Além disso, o movimento de esticar pode estar relacionado ao medo (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994). De acordo com os nossos dados, os animais pertencentes ao grupo DEXA + salina poderiam apresentar uma relação com o medo. Cumpre ressaltar que os animais expostos ao campo aberto encontram-se em conflito, uma vez que a introdução no aparato de campo aberto gera sobre o animal medo de um local desconhecido. Este comportamento tende a diminuir de acordo com o tempo e à medida com que o animal explore a localidade (CRUZ et al, 1997). Portanto, diante de uma situação de medo, os animais que foram pré-tratados com dexametasona e posteriormente receberam salina poderiam apresentar uma situação de medo diminuindo, desse modo, os movimentos de avaliação de risco.

O mesmo é válido para o grupo MIFE + salina, uma vez que fora encontrado também uma diminuição na frequência de movimentos de esticar em relação ao controle. Tais animais apresentariam também, diminuição na avaliação de risco, acompanhada de uma situação de medo. Outros autores sugeriram que esta resposta hormonal acontece antes da exploração real do ambiente aversivo, quando o animal realmente detecta o perigo (SOUZA, 2010). Em seres humanos tal premissa é verdadeira, uma vez que a antecipação de eventos estressantes produz um

aumento dos níveis de cortisol (MASON, 1968). Diante, portanto, do uso da mifepristone, um inibidor da síntese de glicocorticoides, era de se esperar, a diminuição da frequência média de movimentos de avaliação de risco a qual foi observada em nosso estudo.

Outra medida analisada no teste do campo aberto foi a frequência média de defecações nos animais expostos no referido teste. Nesse sentido, foi encontrado que o grupo MET + LPS apresenta uma significativa redução no referido parâmetro quando comparado com o grupo MET + salina. A defecação pode estar relacionada com índices de estado emocional (HALL, 1934). Alguns autores encontram correlação negativa existente entre a atividade locomotora e a defecação (STÖHR et al, 1998). Porém, Paré (1964) em seu estudo sugeriu que a atividade locomotora, mensurada através das ambulações, e o índice de defecações em animais expostos ao teste do campo aberto são variáveis independentes. No Hall (HALL, 1934), afirma-se que uma diminuição no índice de defecações com concomitante elevação da atividade locomotora seria indicativa de uma alta reação de emocionalidade. Diferente do observado na literatura, embora tenhamos encontrado no grupo MET + LPS uma diminuição na frequência média de defecações, esta não foi acompanhada de uma elevação da atividade locomotora e sim de uma diminuição desse parâmetro. Nossos resultados sugerem que os animais MET + LPS se encontram em estado doentio e que suas prioridades tenham sido alteradas devido a este estado sendo assim de forma motivacional, é possível que esses animais tenham apresentado prioridade de sobrevivência em detrimento ao gasto energético na realização do ato de defecar.

Por meio do teste de reconhecimento espontâneo de objetos, foi possível constatar que em todos os grupos em que houve o tratamento com LPS ocorreu uma significativa redução no tempo de exploração global dos objetos. Adicionalmente, foi observada a diminuição significativa da taxa de discriminação dos objetos na terceira etapa do teste para todos os pré-tratamentos, exceto para a metirapona, e diminuição significativa na exploração dos objetos A3 e B para todos os pré-tratamentos utilizados com posterior aplicação do LPS.

Nesse teste, os animais expostos tendem a explorar mais tempo os objetos novos em detrimento aos objetos já conhecidos (ENNACEUR; MICHALIKOVA; CHAZOT, 2006). É importante que se ressalte que o teste pode ser interferência de variáveis importantes, como a ansiedade e também a questão da capacidade exploratória e locomotora (ENNACEUR; MICHALIKOVA; CHAZOT, 2006; GRAY, 1982). Além disso, afirma-se que os componentes

emocionais, tal como o medo, podem interferir de maneira significativa no teste de reconhecimento espontâneo de objetos (ENNACEUR, 2010).

O presente trabalho levanta a hipótese de que a diminuição da exploração encontrada não esteja correlacionada ao déficit na capacidade de retenção de informação a curto prazo, mas sim esteja relacionada à diminuição da capacidade exploratória e locomotora ocasionada pela administração do LPS. Embora classicamente a análise da taxa de discriminação, no teste de reconhecimento espontâneo de objetos, seja o parâmetro indicativo de prejuízos na capacidade de retenção de informação a curto prazo (ENNACEUR; DELACOUR, 1988; ENNACEUR; MICHALIKOVA; CHAZOT, 2006; GARCIA-CAPDIVILA et al., 2009) nosso trabalho propõe que a perda da capacidade exploratória / locomotora esteja influenciando de modo significativo no resultado. Portanto, não podemos inferir categoricamente que há prejuízo na questão da memória a curto prazo, uma vez que a exploração global, bem como a exploração dos objetos A3 e B encontram-se diminuídas. Ou seja, não há preferência pela exploração do objeto familiar em detrimento do objeto novo na terceira etapa do teste, uma vez que a exploração de ambos os objetos foi diminuída. Portanto, há prejuízo locomotor e não no que tange à memória a curto prazo. A exceção para tal acontecimento foi somente na combinação entre mifepristone + LPS, onde há, de fato, perda de memória a curto prazo, uma vez que o objeto novo foi menos explorado em comparação com o objeto já familiar.

Analisando especificamente o resultado apresentado pela metirapona, nota-se que ela foi capaz de diminuir a exploração global dos objetos e também foi capaz de diminuir a exploração do objeto A3 e B na terceira etapa de realização do teste, quando foi aplicado como pré-tratamento a salina. Ou seja, a metirapona, sem a combinação com o tratamento com LPS, foi capaz de diminuir, de modo significativo, tanto a exploração global dos objetos quanto os objetos A3 e B na etapa de reconhecimento. Porém, é necessário que se observe que não há diferença significativa, do ponto de vista estatístico, no que diz respeito à taxa de discriminação dos objetos. Mais uma vez, é possível afirmar que não há prejuízo na memória a curto prazo destes animais. A explicação para tal achado consiste no fato de que a metirapona diminui a locomoção agudamente (CANINI et al, 2009).

Especificamente em relação ao pré-tratamento com mifepristone, nota-se que há preferência pela exploração do objeto familiar em detrimento do novo, causando um efeito significativo de diminuição da taxa de discriminação a níveis abaixo de zero. Nesse caso,

portanto, pode-se afirmar que há um prejuízo na memória a curto prazo além de uma diminuição da capacidade exploratória. Nota-se que o grupo MET + salina, ou seja, a mifepristone sem a combinação com LPS, apresenta redução significativa na exploração global dos objetos, na exploração do objeto A3 e também na exploração do objeto B, sendo estes, portanto, indicativos de que a mifepristone diminui a capacidade de exploração destes animais que foram expostos ao teste de reconhecimento espontâneo de objetos. Diante do resultado significativo em relação à taxa de discriminação dos objetos, pode-se afirmar que a mifepristone em associação ao LPS causa prejuízo na capacidade de retenção de memória a curto prazo nestes animais. A mifepristone é um potente antagonista de receptores de glicocorticoides do tipo II e de progesterona (ROBBINS; SPITZ, 1996), ou seja, apresenta um efeito anti-progesterona. Vários estudos têm demonstrado o papel benéfico da progesterona na memória. Em mulheres, por exemplo, a fase lútea do ciclo menstrual favorece a retenção de memória, os quais são relacionados à elevada concentração de progesterona (ERTMAN; ANDREANO; CAHILL, 2011). Foi demonstrado ainda que a administração subcutânea, porém não central, de allopregnenolona melhorou a memória espacial e de longo prazo (FRYE; STURGIS, 1995). Maki et al (2001) sugeriram que a progesterona pode beneficiar funções cognitivas e a memória em mulheres que receberam reposição hormonal contendo progesterona. A administração tanto aguda quanto crônica de progesterona combinado com estradiol em ratas ovariectomizadas melhorou a memória no labirinto aquático (MARKHAM; PYCH; JURASKA, 2002). Foi demonstrado ainda que a progesterona administrada nas doses de 10 mg/kg e 5 mg/kg de animal melhoraram a memória de ratas ovariectomizadas no teste de reconhecimento espontâneo de objetos (LEWIS, ORR; FRICK, 2008). Portanto, coletivamente, esses dados demonstram a importância da progesterona na memória. Uma vez que a mifepristone é um antagonista de progesterona, é possível que a perda de memória a curto prazo diagnosticado nos animais tratados com esse fármaco em nosso estudo aconteça por ação do bloqueio da síntese progesterona.

Além das referidas análises citadas anteriormente no nosso trabalho, averiguou-se também o comportamento semelhante à depressão. Para tal análise, lançamos mão do teste do Nado Forçado. Na realização deste teste foi encontrado que o tratamento com LPS foi capaz de aumentar significativamente o tempo boiando com concomitante diminuição do tempo nadando, sem que o pré-tratamento com inibidores da síntese de glicocorticoides pudessem evitar tal acontecimento. Tais dados são condizentes com os achados da literatura científica de Zavan

(2011); de Paiva et al (2010), Soncini et al (2012), Ribeiro et al (2012), Jain et al (2001) e Swiergiel e Dunn (2007), os quais notaram aumento no tempo de imobilidade nos animais tratados com LPS quando submetidos ao teste do nado forçado. Tais achados são indicativos de um comportamento semelhante à depressão nos animais. Portanto, é cabível afirmar que o tratamento com LPS aumentou o tempo de imobilidade do nado forçado sendo este um estado semelhante à depressão.

Desse modo, nossos estudos comportamentais corroboram com diversos achados na literatura científica ao afirmar que a administração do LPS provoca, de fato, comportamento doentio, diagnosticado a partir de uma redução da capacidade exploratória e locomotora, acompanhada de um estado semelhante à depressão e possíveis desvios no que diz respeito à comportamento semelhante à ansiedade (CORREIA et al, 2008; DANTZER et al, 1998a, 1998b; de PAIVA et al, 2010; DINARELLO, 2004; ENANGA et al, 2002; KENT et al, 1996; KLUGER, 1991; LEONARD, 2001; MATSUMURA; KOBAYASHI, 2004; McCARTHY; 1985; RIBEIRO et al, 2012; ROMANOVSKY, 2004; SONCINI et al, 2012).

O LPS promove o comportamento doentio por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (DINARELLO, 1991; KENT et al, 1992). As citocinas atuam no cérebro provocando alterações comportamentais típicas do comportamento doentio (DANTZER, 2001; KENT et al, 1992; RAMACHANDRA; SEHON; BERCZI, 1992; ROTHWELL; HOPKINS, 1995). As citocinas presentes na circulação, embora não sejam capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, estimulam a produção de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) através da mediação da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), além de influenciar na produção da prostaglandina microsomal sintetase 1 (mPGES1). Tal ativação promove a ativação dos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico, gerando alterações comportamentais (CUSCHIERI et al, 2006; ENGBLOM et al, 2002 e 2003, KIRSTEN, 2008; SONCINI et al, 2012; USHIKUBI et al, 1998; ZAVAN, 2011). Linthorst et al evidenciaram que a diminuição da atividade geral de ratos, verificada através de escores de locomoção e outros, estava associada com o aumento das concentrações extracelulares de serotonina (5HT) e de seu metabólito ácido 5-hidroxi-indolacético na região do hipocampo (KINOSHITA, 2007; LINTHORST et al, 1995).

O comportamento semelhante à ansiedade após a aplicação do LPS já foi visto em diversos trabalhos (de PAIVA et al, 2010; RIBEIRO et al, 2012; SWIERGIEL; DUNN, 2007). Porém, é necessário que se afirme que de acordo com a perspectiva motivacional do

comportamento doentio, o medo e a ansiedade poderiam sobrepor o comportamento doentio induzido por LPS ou IL-1 (DANTZER, 2001; KINOSHITA, 2007). Nossos resultados indicam que a redução da capacidade exploratória foi o principal efeito causado pela administração do LPS. No entanto, há a perspectiva de que parâmetros como aumento de tempo de permanência nos quadrantes centrais do campo aberto juntamente com aumento da frequência de *grooming*, entre outros, poderiam estar relacionados com um comportamento semelhante à ansiedade. Contudo, nosso trabalho sugere a hipótese de que o comportamento semelhante à ansiedade observado em alguns parâmetros seja devido a um déficit locomotor/exploratório, sendo este último, o efeito principal.

Nosso trabalho, portanto, revela que os glicocorticoides tem pouca influência no comportamento doentio gerado pelo tratamento com LPS em camundongos prenhes no 10º ddg, o que sugere fortemente que esse tipo de comportamento seja ocasionado por citocinas pró-inflamatórias e não diretamente por modificações nos níveis de glicocorticoides nesses animais.

### 6.3 ANÁLISE DA NINHADA MEDIANTE O PRÉ-TRATAMENTO COM DEXAMETASONA, METIRAPONA E MIFEPRISTONE

Quando procedida a análise da viabilidade gestacional, foi observado que as fêmeas tratadas com LPS apresentaram significativa redução no número médio de filhotes nascidos a cada ninhada quando comparadas com o grupo controle, sendo que o pré-tratamento com dexametasona ou mifepristone não foram capazes de evitar tal acontecimento.

No que diz respeito a diminuição significativa de filhotes tratados através de LPS, nossos dados são similares ao trabalho desenvolvido por Toyama (2012), onde foi observado que a exposição ao LPS no 18º dia de gestação em camundongos SWISS ocasionou morte fetal, sendo dependente da dosagem de exposição ao LPS. Segundo Toyama, os animais testados na dose de 300µg/Kg apresentaram 100 % de aborto. Já as fêmeas que receberam a dosagem de 150µg/Kg de LPS apresentaram 55% de aborto espontâneo. A mesma autora afirma ainda que as citocinas pró-inflamatórias geradas pela exposição ao LPS atingem o líquido amniótico e prejudicam o correto desenvolvimento da gestação. O trabalho realizado por Oksvig et al observaram que em ratos Sprague-Dawley expostos a baixas doses de LPS no 15º dia de gestação tiveram elevação na concentração de citocinas no soro materno e líquido amniótico 4 horas após administração de

LPS. Os autores revelaram que o LPS é capaz de induzir não somente aborto espontâneo, mas também reabsorções embrionárias e morte embrionária uterina (AVITSUR; COHEN; YIRMIYA, 1997; KIRSTERN, 2008; XU et al, 2006; ZHAO et al, 2008). Porém, apesar de provocar a significativa redução no número da prole, não há alterações tanto no peso total quanto no peso individual da prole, além de não serem diagnosticadas também danos no desenvolvimento físico e nos reflexos da prole cujas mães receberam LPS (KIRSTEN et al, 2010).

A ação do LPS a partir dos receptores denominados de toll-like receptors é necessária para a geração da falha gestacional já observada anteriormente em modelos murinos (CLARK et al, 2004). A endotoxina é capaz de liberar, tal como dito anteriormente, citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1, IL-6 e o TNF (CHUA; ROFE; COYLE, 2006). Certas citocinas ajudam no estabelecimento do sucesso da gestação, como por exemplo, IL-4, IL-6 e IL-10. Outros, no entanto, são danosas para o embrião podendo causar falhas gestacionais (DAHER et al, 2004). Nesse sentido, a perda embrionária é ocasionada devido a mudanças imunológicas que ocorrem no ambiente uterino e também devido a mudanças hormonais na gestação. Estudos prévios afirmam que a aplicação do LPS pode contribuir, de maneira significativa, para o término da gestação em qualquer período em que for aplicado, mas não provoca mudanças no funcionamento do sistema endócrino de ratas prenhes (RIOUX-DARRIEULAT; PARANT; CHEDID, 1978).

Interessantemente, em nossos estudos por meio do pré-tratamento com metirapona de camundongos prenhes submetidos ao LPS em seu 10º dia de gestação foi observado o aumento significativo no número médio de filhotes quando comparado com o grupo salina + LPS e esse número foi significativamente igual ao do controle. Portanto, pode-se afirmar de forma inédita que a metirapona foi capaz de evitar a perda fetal e conseqüente redução no número de filhotes nascidos por ninhada.

Sabe-se que a metirapona bloqueia a enzima 11- $\beta$ -hidroxilase, enzima importante na conversão de 11-desoxicortisol em corticosterona, porém a síntese de progesterona não é prejudicada (CANINI et al, 2009; JENKINS et al, 1958). Assim, há o bloqueio da produção da corticosterona, mas a síntese de progesterona não está inibida (MOLDOW et al, 2005). É sabido que a metirapona apresenta a capacidade de inibir a enzima conversora final na produção de corticosterona, mas, por outro lado, ela é capaz de aumentar a síntese dos precursores da corticosterona (MURPHY, 1991). Estudos demonstram ainda que a progesterona aparece em

concentrações plasmáticas elevadas após a administração de metirapona em animais que não foram submetidos a protocolos de estresse (HUESTON; DEAK, 2014). Portanto, a administração de metirapona é capaz de aumentar a síntese de progesterona, uma vez que este é considerado um precursor da corticosterona (HUESTON; DEAK, 2014).

A progesterona tem comprovada ação antiinflamatória durante o estresse (HUESTON; DEAK, 2014). É sabido que a progesterona pode diminuir a síntese de COX-2 como também aumentar sua quebra metabólica (ISHIHARA et al, 1995). Além disso, a progesterona inibe a atividade de NF $\kappa$ B diminuindo também a sinalização de IL-1 (HUESTON; DEAK, 2014; KALKHOVE, 1996). A progesterona, durante a fase da gestação, age como imunossupressora protegendo o feto de ataques imunológicos do sistema imunológico materno (KELLY, 1994). Em fêmeas geneticamente modificadas para a falta de expressão de receptores para progesterona foi encontrado inflamação uterina, sugerindo, desse modo, que a progesterona é um agente anti-inflamatório importante durante a gestação (LYDON et al, 1995).

Outro resultado significativo do nosso estudo diz respeito a ação abortiva da mifepristone, uma vez que o uso de tal composto como pré-tratamento, com ou sem administração do LPS, não permitiu o nascimento de nenhum filhote. A ação abortiva da mifepristone já era esperada devido a dados extensos na literatura a respeito da ação deste composto (AGARWAL, 1996; NARVEKAR et al, 2004; SPITZ, 2006). Porém, é importante que se ressalte que o mecanismo exato de ação da mifepristone na questão contraceptiva ainda não está totalmente elucidado (AGARWAL, 1996; CHEN et al, 2010; ZHOU et al, 2011).

Portanto, nossos resultados indicam que o pré-tratamento com dexametasona, diante da aplicação com LPS, não foi capaz de reverter ou evitar o comportamento doentio provocado pela endotoxemia nem tão pouco foi capaz de evitar as falhas gestacionais derivadas do lipopolissacarídeo. É importante que se ressalte que o pré-tratamento com dexametasona diante da aplicação do LPS foi extremamente eficaz no sentido de evitar a hipotermia provocada pela endotoxemia. O presente trabalho aponta fortemente para a ação da dexametasona a fim de diminuir a síntese de TNF- $\alpha$ , a qual se caracteriza por promover o desbalanço na termorregulação provocando, desse modo, a hipotermia nos animais prenhes. Dessa maneira, o uso da dexametasona como pré-tratamento parece ser importante ao exercer o presente efeito antipirético, candidatando o presente fármaco a ser usado na prevenção da hipotermia durante casos de endotoxemia na gestação

Já o pré-tratamento com metirapona diante da indução da endotoxemia evitou significativamente a perda fetal, sem, no entanto, alterar os parâmetros comportamentais, uma vez que o comportamento doentio foi diagnosticado. O uso da metirapona foi capaz de atenuar a hipotermia gerada mediante a aplicação do LPS. Nesse sentido, os dados referentes à capacidade da metirapona, quando aplicada previamente à administração do LPS, evitar quadros de aborto são inéditos na literatura científica e merecem elevado destaque. Nossos achados apontam que a metirapona é capaz de aumentar a concentração plasmática de progesterona, atuando de modo a proteger o feto contra ataques imunológicos causados pela administração do LPS. Sendo assim, a progesterona apresenta um papel anti-inflamatório durante a gestação de relevância significativa, além de diminuir a atividade de NFκB e a sinalização de IL-1. Portanto, o uso da metirapona pode ser indicado a fim de prevenir os abortos imunológicos causado pela endotoxemia em gestantes.

O pré-tratamento com mifepristone, por sua vez, não evitou o comportamento doentio nem tão pouco evitou a hipotermia. Além disso, podemos concluir que a mifepristone tem grande potencial de causar aborto em camundongo quando administrado no 10º ddd, uma vez que seu uso provocou total perda da gestação em todos os animais investigados. Diante disso, a mifepristone se caracteriza como potente droga abortiva capaz de interromper a gestação mesmo findado o período implantacional. Ainda não havia sido investigado a associação entre a mifepristone e o tratamento com LPS o que revela o ineditismo do trabalho. Diante dos nossos achados, o uso da mifepristone, independente da fase gestacional, não deve ser adotado, uma vez que já fora extensamente comprovado na literatura científica sua capacidade abortiva.

## 7 CONCLUSÃO

- O tratamento com LPS em fêmeas prenhes foi capaz de provocar hipotermia após 2 horas de aplicação;
- O LPS provocou comportamento doentio evidenciado por quadros de redução da capacidade exploratória/locomotora nos testes do labirinto em cruz elevado e do campo aberto;
- A administração do LPS causou ainda comportamento semelhante à depressão evidenciado no teste do nado forçado;
- O LPS foi capaz de diminuir o número médio de filhotes nascidos a cada ninhada, podendo ser considerado modelo de aborto;
- O pré-tratamento com dexatametasona, seguido da aplicação do LPS, evitou a hipotermia nos animais prenhes;
- A metirapona, usado como pré-tratamento ao LPS, foi capaz de atenuar a hipotermia gerada pelo LPS;
- Nenhum pré-tratamento utilizado foi capaz de evitar o comportamento doentio diante da aplicação do LPS, sugerindo que tal tipo de comportamento se deve às citocinas pró-inflamatórias;
- O pré-tratamento com metirapona, sem a posterior aplicação do LPS, diminuiu a exploração dos animais evidenciado pela queda da frequência de mergulhos no LCE, da frequência de *rumping* no LCE e no campo aberto e também pela queda na capacidade exploratória no teste de reconhecimento espontâneo de objetos;
- A mifepristone, sem a aplicação da endotoxina, provocou diminuição da frequência de mergulhos no LCE e diminuição exploração vertical (*rumping*) no LCE e no campo aberto, aumentando o tempo de latência para o primeiro cruzamento também, evidenciando redução motora ou comportamento semelhante ao medo;
- O pré-tratamento com mifepristone, seguida da aplicação do LPS, provocou perda da memória a curto prazo nas fêmeas prenhes;
- O pré-tratamento com metirapona foi capaz de evitar completamente os abortos provocados pela endotoxemia devido ao provável aumento da síntese de progesterona

caracterizando prospectivamente essa droga como candidata a ser avaliada quanto aos seus mecanismos de ação e como fármaco capaz de prevenir aborto;

- A mifepristone é droga potente em sua capacidade abortiva e seu uso seguido ou não da aplicação do LPS, provocou aborto em todos os animais testados em nosso estudo.

## REFERÊNCIAS

ABE, H.; ISHIDA, Y.; IWASAKI, T. Perirhinal N-methyl-d-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats. **Neurosci Lett**, v. 356, p.191–194, 2004.

ADACHI, N. et al. Metyrapone alleviates ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus. **Eur. J. Pharmacol**, v. 373, p. 147–152, 1999.

ADAIKAN, P. G.; KOTTEGODA, S. R. RU-486. **Drugs Future**. v. 9, p. 755-756, 1984

ADER, R. On the development of psychoneuroimmunology. **Eur J Pharmacol**, v. 405, p. 167-76, 2000.

ADER, R.; COHEN, N. Behaviorally conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. **Science**, v. 215, n. 4539, p. 1534-6, 1982.

ADER, R.; COHEN, N. Behaviorally conditioned immunosuppression. **Psychosomatic Medicine**, v. 37, n. 4, p. 333- 40, 1975.

ADER, R.; COHEN, N. Conditioning and Immunity. **Psychoneuroimmunology**. 3. ed, Academic Press San Diego, 2000.

AGARWAL, M.K. The Antigluocorticoid Action of Mifepristone. **Phmmacol. Ther**, v. 70, n. 3, 183-213, 1996.

AGUILA, F. A.; BRANCO, L. G. S.; ROCHA, M. J. da. Hipotermia após choque endotóxico induzido por LPS não é abolida por lesão da região AV3V. **SIIC. USP**, 2006.

AIKEN, J.W. Prostaglandins and prostaglandin synthetase inhibitors: studies on uterine motility and function, in: Prostaglandin Synthetase Inhibitors, eds. **H.J. Robinson and J.R. Vane (Raven Press, New York)** p. 289, 1974.

AKARSU, E.S., MAMUK, S. Escherichia coli lipo- polysaccharides produce serotype-specific hypothermic response in biotelemetered rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, p. R1846–R1850, 2007.

ALVES, G.J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmunomodulation: the cross-talk between nervous and immune systems. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 29, n. 4, p. 363-9, 2007.

AMARAL, M. C. do. **O Efeito da dexametasona na fertilidade do cão**. Dissertação (Mestrado). 58f. Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Paraná. UFPR. Curitiba. 2000.

AMARAL, V. C.; SANTOS GOMES, K.; NUNES-DE-SOUZA R. L. Increased corticosterone levels in mice subjected to the rat exposure test. **Hormones and Behavior**, v.57, p.128-133, 2010.

ANSELONI, V.Z.; BRANDÃO, M.L. Ethopharmacological of behavior of rats using variations of the elevate plus-maze. **Behavioural Pharmacology**, v. 8, p. 533 – 540, 1997.

ARCHER, J. – Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behavior**, v. 21, n.2, p. 205-35, 1973.

ASHDOWN et al., 2007 Interleukin-1 receptor antagonist as a modulator of gender differences in the febrile response to lipopolysaccharide in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 292, p. R1667–R1674, 2007.

ATKINSON, H. C.; WADDELL, B. J. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rat pregnancy and lactation: circadian variation and interrelationship of plasma adrenocorticotropin and corticosterone. **Endocrinology**, v. 136, p. 512-520, 1995.

AUBERT, A. et al. Pyrogens specifically disrupt the acquisition of a task involving cognitive processing in the rat. **Brain Behav. Immun**, v. 9, n. 2, 129–148, 1995.

AUBERT, A. et al. Differential effects of lipopolysaccharide on pup retrieving and nest building in lactating mice. **Brain Behav. Immun**, v. 11, n. 2, p. 107–118, 1997

AUBERT, A. Sickness and behavior in animals: a motivational perspective, **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 1029–1036, 1999.

AUBERT, A.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Differential effect of lipopolysaccharide on food hoarding behavior and food consumption in rats. **Brain Behav. Immun**, v. 11, n. 3, 229–238, 1997.

AVITSUR, R.; COHEN, E.; YIRMIYA, R. Effects of interleukin-1 on sexual attractivity in a model of sickness behavior. **Physiology & Behavior**, v. 63, p. 25-30, 1998.

AVITSUR, R.; POLLAK, Y.; YIRMIYA, R. Different receptor mechanisms mediate the effects of endotoxin and interleukin-1 on female sexual behavior. **Brain Research**, v. 773, p. 149-161, 1997.

BARBALHO, C. A. **Papel dos Receptores GABA-Benzodiazepínicos da Amígdala na Modulação da Ansiedade em Camundongos Ingênuos e Reexpostos ao Labirinto em Cruz Elevado**. 2007. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). UFSCAR. 2007.

BARLOW, S. M.; MORRISON, P. J.; SULLIVAN, F. M. Effects of acute and chronic stress on plasma corticosterone levels in the pregnant and non-pregnant mouse. **Journal of Endocrinology**. v. 66, p. 90-9, 1975.

BASSO, A. S. et al. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 140, n. 1-2, p. 69-77, 2003.

BELZUNG, C.; PRUST, L. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3-33, 2003.

BENEDIKTSSON, R. et al. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. **Clinical Endocrinology (Oxf)**, v. 46, p. 161-166, 1997.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-Neuro-Endocrine Interactions: Facts and Hypotheses. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 1, p. 64-102, 1996.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. The cytokine-HPA axis feed-back circuit. **Zeitschrift für Rheumatologie**, v. 59, p. 26-30, 2000.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A.; SORKIN, E. Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. **Journal of Immunology**, v. 126, n. 1, p. 385-7, 1981.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DA PRADA M.; LELLER H. A. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. **Cellular immunology**, v. 48, p. 346-355, 1979.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DINARELLO, C.A. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, v. 233, p. 652– 654, 1986.

BESEDOVSKY, H.; FELIX, D.; HAAS, H. Hypotalamic changes during the immune response. **European Journal of Immunology**, v. 7, n. 5, p. 323 – 325, 1977.

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; KELLER, M.; MULLER, J. Changes in blood hormone levels during the immune response. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 150, p. 466-470, 1975.

BESEDOVSKY, H.O., DEL REY, A., SORKIN, E., DINARELLO, C.A. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**; v.233, p.652–4, 1986.

BEVIER. D. E. Atopic dermatitis in dogs. **Veterinary Clinics of North America** , v. 20, p.7-10, 1990.

BEYAERT, R.; FIERS, W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. In: MIRE-SLUIJS, A., THORPE, R. (Eds). **Citokines**. California: Academic, p.335-360, 1998

BLALOCK, J.E.; SMITH, E.M. Human leucocyte interferon: structural and biological relatedness to adrenocorticotropic hormone and endorphins. **Proc. Natl Acad Sci USA** v. 77, p. 4597-5972, 1980.

BLANCHARD, R. J. et al. Defense system psychopharmacology: An ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioural Brain Research**, v.58, p.155-165, 1993.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Antipredator defensive behavior in a visible burrow system. **J. Comp. Psychol.**, 103, 70-82, 1989.

BLUTHÉ, R. M.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. **Brain Research**, v. 573, p. 318 – 320, 1992.

BLUTHE, R. M. Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. The first demonstration that section of the vagus nerves blocks immune-to-brain communication and abrogates lipopolysaccharide-induced sickness behaviour without compromising the peripheral immune response. **C R Acad. Sci.** III, v. 317, p. 499–503, 1994.

BOERNGEN-LACERDA, R.B; SOUZA-FORMIGONI, M.L, O. SOUZA. Does the increase in the locomotion induced by the ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v.67, p. 225-232, 2000.

BOLLES, R. C. Cognition and motivation: Some historical trends. In B. Weiner (Ed.), *Cognitive views of human motivation* (pp. 1–20). New York: **Academic Press**, 1974

BRIESE, E. Selected temperature correlates with intensity of fever in rats. **Physiol Behav** 61:659–60, 1997.

BROUSSARD, J.R. et al. Effects of dexamethasone administration to diestrus cows on systemic progesterone, estrogen and uterine cyclooxygenase production. **Animal Reproduction Science**, v. 47, p. 263-271, 1997.

BROWN, R. W. et al. The ontogeny of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action in development. **Endocrinology**, v. 137, p. 794-797, 1996.

BRUNO, O.D.; METZGER, P.; MALAISSE, W.J. Inhibitory effect of metyrapone on glucose utilization by brain and muscle and on insulin release by the pancreas. **Acta Endocrinol.** (Copenh) v.70, p.710–718, 1972.

BRUNTON, P. J.; RUSSELL, J. A.; DOUGLAS, A. J. Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. **Journal of Neuroendocrinology**. v. 20, p. 764–776, 2008.

BUENO, A.C. et al. Plasma and urine nitric oxide concentrations in horses given below a low dose of endotoxin. **Am. J. Vet. Res.**, v.60, p.969-976, 1999.

BUHIMSCHI, C. S. et al. Fetal adrenal gland volume and cortisol/ dehydroepiandrosterone sulfate ratio in inflammation-associated preterm birth. **Obstetrics and Gynecology**, Hagerstown, MD, v. 111, n. 3, p. 715 – 722, 2008.

BURRELL, R. Human responses to bacterial endotoxin. **Circ Shock**. v.43 (3), p.137-53, 1994.

BUTTGEREIT, F.; WEHLING, M.; BURMESTER, G. R. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited. **Arthritis Rheum**, v.41, n.5, May, p.761-7, 1998.

CADOR, M.; DULLUC, J.; MORMEDE, P. Modulation of the locomotor response to amphetamine by corticosterone. **Neuroscience**, v.56, p.981–988, 1993.

CALVERT, C.A; CORNELIUS, L.M. The most common indications for using corticosteroid hormones in veterinary practice. **Veterinary Medicine**, v.82, p.826-831, 1990.

CANINI, F. et al. Metyrapone decreases locomotion acutely. **Neuroscience Letters** v.457, p. 41–44, 2009.

CAROLA, V. et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behavior in inbred mice. **Behavioral Brain Research** v.134, p.49-57, 2002.

CHART, J.J.; SHEPPARD, H. Pharmacology and biochemistry of some amphenone analogues and other adrenal cortical inhibitors. **J. Med. Pharm. Chem.** v.1, p.407, 1959.

CHEN, X.Y, et al. The effect of mifepristone on the peripheral blood natural killer cell's cytotoxicity and expression of CD94/NKG2A and NKG2D during the implantation phase. **Fertility and Sterility** Vol. 93, No. 8, May 15, 2010.

CHENG, S. C.; HARDING, B. W.; CARBALLEIRA, A. Effects of metyrapone on pregnenolone biosynthesis and on cholesterol- cytochrome P-450 interaction in the adrenal. **Endocrinology** v.94, p.1451-1458, 1974.

CHOLERIS, E. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** v.25, p. 235-260, 2001

CHUA, S. C. et al. Cloning of cDNA encoding steroid 11 $\beta$ -hydroxylase (P450c11). **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, DC, v. 84, p. 7193–7197, 1987.

CHUA. J. S. C.; ROFE. A. M.; COYLE. P. Dietary zinc supplementation ameliorates LPS-induced teratogenicity in mice. **Pediatric Research**, v. 59, n. 3, p. 355–358, 2006

CHURCHILL, S. et al. Role of aldosterone in sodium retention of pregnancy in the rat. **American Journal of Physiology**, v. 240, p. R175-181, 1981.

CINTRA, A. et al. Prenatal development of glucocorticoid receptor gene expression and immunoreactivity in the rat brain and pituitary gland: a combined in situ hybridization and immunocytochemical analysis. **Neuroendocrinology**, v. 57, p. 1133- 1147, 1993.

CLARK, D. A. et al. Ecology of danger-dependent cytokine-boosted spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model. I. Synergistic effect of LPS (TNF- $\alpha$  + IFN- $\gamma$ ) on pregnancy loss. **American Journal of Reproductive Immunology**. v.52 (6), p.370–378, 2004.

COLE, J.C.; RODGERS, J.R. An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze. **Behav Pharmacol**. v.4 (6),p.573-580, 1993.

COHN, D. **Efeito da administração de LPS sobre o comportamento de camundongos dominantes e submissos: uma abordagem etofarmacológica ao estudo do comportamento doentio**. Dissertação (Mestrado). 147f. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia. Programa de Pós Graduação Patologia Experimental e Comparada. São Paulo. 2003

CORREIA, M.S.F. Efeitos da exposição de ratos adultos ao lipopolissacarídeo (LPS) no comportamento estereotipado e na catatonia experimental. **Rev Inst Ciênc Saúde**. v.26 (2), p.215-20, 2008.

CRUZ, A. P. M. et al. Modelos Animais de Ansiedade: Implicações Para a Seleção de Drogas Ansiolíticas. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**. Vol.13 n3, p269-278, 1997.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and behavior**, v.49, p.171-176, 1994.

CUSCHIERI, J., BILLIGREN, J., MAIER, R.V. Endotoxin tolerance attenuates LPS-induced TLR4 mobilization to lipid rafts: a condition reversed by PKC activation. **J Leukoc Biol.** v.80 (6), p.1289-97, 2006.

DAHER, S. et al. Cytokines in recurrent pregnancy loss. **Journal of Reproductive Immunology.** v.62 (1-2), p.151–157, 2004.

DANIELSSON, K. G.; MARIONS, L.; BYGDEMAN, M. Effects of mifepristone on endometrial receptivity. **Steroids** v.68, p.1069–75, 2003

DANTZER, R. Cytokine, sickness behavior, and depression. **Immunol Allergy Clin North Am** v.29, p.247–64, 2009.

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

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. **Eur J Pharmacol** v.500, p399–411, 2004

DANTZER, R. et al. Cytokines and sickness behavior. **Ann N Y Acad Sci.** v.840, p.586-90, 1998a.

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

DANTZER, R. et al. Molecular basis of sickness behavior. **Ann N Y Acad Sci.** v.856, p.132-8. 1998b.

de CATANZARO, D.; GORZALKA, B.B. Effects of dexamethasone, corticosterone, and ACTH on lordosis in ovariectomized and adrenalectomized-ovariectomized rats. **Pharmacol Biochem Behav** v.12, p. 201-206, 1980.

de CATANZARO, D.; KNIPPING, R. P.; WIGMORE, S. W. Facilitation of estrogen-induced receptivity through metyrapone administration in ovariectomized rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v.18 (4), p.535–9. 1983.

de PAIVA, V.N. et al. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. **Behav Brain Res** v.215, p.146–51, 2010.

DEAK, T.; BELLAMY, C., BORDNER, K.A. Protracted increases in core body temperature and in-terleukin-1 following acute administration of lipopolysaccharide: implications for the stress response. **Physiol Behav** v.85, p. 296– 307, 2005

DELLAGIOIA, N.; HANNESTAD, J. A critical review of human endotoxin administration as an experimental paradigm of depression. **Neurosci Biobehav Rev.** v.34 (1), p.130–143, 2010

DHABHAR, F. S.; et al. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. **J. Immunol.**, v. 157, n.4, p. 1638-1644, 1996.

DIEDERICH, S. et al.  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2: A important pharmacokinetic determinant for the activity of synthetic mineralo- and glucocorticoids. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 12, p. 5695-5701, 2002.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. **Blood**, v. 77, p. 1627- 1652, 1991.

DINARELLO, C.A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. **J Endotoxin Res**; v.10 (4), p.201-22, 2004.

DOGAN, M., ATAOGU, H., EYUP, S. AKARSU. Effects of different serotypes of Escherichia coli lipopolysaccharides on body temperature in rats. **Life Sci.** v.67, p.2319-29, 2000.

DOHERTY, M.L.; et al. Effects of dexamethasone on cell-mediated immune responses in cattle. **American Journal of Veterinary Research.** v.56, p. 1300-1306, 1995.

DOLLERY, C. **Therapeutic Drugs.** Churchill Livingstone, Edinburgh, UK. 1991.

DOUGLAS, A. J. Mother-offspring dialogue in early pregnancy: Impact of adverse environment on pregnancy maintenance and neurobiology. *Prog Neuropsychopharmacol.* **Biol Psychiatry**, v.3, 2010.

DOUGLAS, A.J. **Vasopressin and oxytocin**, in: T. Steckler, N.H. Kalin, J.M.H.M. Reul (Eds.), *Handbook of Stress and the Brain. Part 1: The Neurobiology of Stress*, Elsevier, pp. 205–229. 2005.

DRAKE, A.J.; WALKER, B.R.; SECKEL, J.R. Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats. **American Journal of Physiology**, v. 288, p. 34-38, 2005.

DROUET, J. B. et al. Metyrapone effects on systemic and cerebral energy metabolism. **European Journal of Pharmacology** v.682, p. 92–98. 2012.

DROUET, J.-B. et al. Metyrapone blunts stress-induced hyperthermia and increased locomotor activity independently of glucocorticoids and neurosteroids. **Psychoneuroendocrinology** v.35, p.1299–1310, 2010.

DUNN, A. J. Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone. **Life Sci** v.43, p.429–35, 1988.

DUNN, A. J.; ANTOON, M.; CHAPMAN, Y. Reduction of exploratory behavior by intraperitoneal injection of interleukin-1 involves brain corticotropin-releasing factor. **Brain Research Bulletin**, v. 26, p. 539-542, 1991.

DUNN, A.J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clin Neurosci Res.** v.6, p.52-68, 2007

DUNN, A.J. et al. Reduced ingestion of sweetened milk induced by interleukin-1 and lipopolysaccharide is associated with induction of cyclooxygenase-2 in brain endothelia. **Neuroimmunomodulation**, v. 13, p.96–104, 2006.

DUNN, A.J. Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone. **Life Sci**; v.43, p.429–35, 1988.

ENANGA, B. et al. Sleeping sickness and the brain. **Cell Mol Life Sci.** May; v.59 (5), p.845-58, 2002.

ENGBLOM, D. et al. Microsomal prostaglandin E synthase1 is the central switch during immune-induced pyresis. **Nat Neurosci**; v.6, p.1137–8, 2003.

ENGBLOM, D., et al. Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood–brain barrier. **J Mol Med**; v.80,p.5–15, 2002.

ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. **Behavioural Brain Research**, 10.1016/j.bbr..12.036, 2010.

ENNACEUR, A.; MICHALIKOVA, S.; CHAZOT, P. L. Models of anxiety: responses of rats to novelty in an open space and an enclosed space. **Behavioural Brain Research**, v.171, p.26-49, 2006.

ENNACEUR A; DELACOUR J. A new one-trial for neurobiological studies of memory in rats. Behavioral data. **Behavioral Brain Res.**, v.31, p.47-59, 1988.

ESPEJO, E.F. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus- maze in male mice. **Behav Brain Res** v.87,p.233–238. 1997.

FAUCI, A S. Corticosteroid Therapy: Mechanisms of action and clinical consideration. **Ann. Intern. Med.**, v.84, p.304, 1976.

FELTEN, D. L. Neurotransmitter signaling of cells of the immune system: important progress, major gaps. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 5, n. 1, p. 2-8, 1991.

FELTEN, D.L. et al. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. **Immunology**, v.100, p. 225-260, 1987.

FERNANDES, C.; FILE, S. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.54, p.31-40, 1996.

FEWELL, J. E, LIU-TERTIL, L., ALEXANDER, B.N., A. Bacterial endotoxin induce hypothermia in pregnant rats: Role of tumor necrosis factor alpha. **J Thermal Biol**; v.35, p.360–5, 2010.

FEWELL, J. et al. Bacterial endotoxin induced hypothermia in pregnant rats: Role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Journal of Thermal Biology** Volume 35, Issue 7, Pages 360–365, 2010.

FILE, S. E. Factores controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behav Brain Res**, v. 125, p. 151-157, 2001.

FILE, S. E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behavioural Brain Research**, v.125, p.151- 157, 2001

FILE, S.E. et al. Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. **European Journal Pharmacology**, v.218, p. 9–14, 1992.

FILKINS, J.P., DI LUZIO, N.R. Endotoxin induced hypothermia and tolerance in the rat. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.29, p.724–6, 1968.

FOFIE A.E., FEWELL J. E., MOORE S. L. Pregnancy influences the plasma cytokine response to intraperitoneal administration of bacterial endotoxin in rats **Exp. Physiol.**, v. 90, p. 95–101, 2005.

FREEMAN, M.E. et al. Thermogenic action of progesterone in the rat. **Endocrinology**, v.86, p.717–720, 1970.

FRYE, C. A.; STURGIS, J. D. Neurosteroids affect spatial/reference, working, and long-term memory of female rats. **Neurobiol. Learn. Mem**, v.64. pp. 83–96, 1995.

GARCIA-CAPDEVILA, et al. Effects of long-term voluntary exercise on learning and memory process: dependency of the task and level of exercise. **Behavioral brain research**, v. 202, p. 162-170, 2009

GHADIRIAN, A.M. ET AL. The psychotropic effects of inhibitors of steroid biosynthesis in depressed patients refractory to treatment. **Biol Psychiatry**, v.37, p.369-375, 1995.

GIANLORENÇO, A.C.L. **Papel do Sistema Histaminérgico na memória emocional de camundongos expostos e reexpostos ao labirinto em cruz elevado**. Dissertação (Mestrado). 94f. Programa de Pós Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos. 2009.

GIUSTI-PAIVA, A. et al. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v.447, p.175–180, 2003.

GOEHLER, L. E. et al. Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 2799-806, 1999.

GOUJON, E. et al. Stress downregulates lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines in the spleen, pituitary, and brain of mice. **Brain. Behav. Immun.** v.9 (4), p. 292–303, 1995

GRAEFF, E. O.; HUNZIKER, M. H.; GRAEFF, F. G. Effects of ipsapirone and BAY R 1531 on learned helplessness. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, n. 9, p. 1141-4, 1989.

GRAY, J. A. **The neuropsychology of anxiety: an enquiry in to the functions of the septo-hippocampal system.** Oxford: Oxford University Press, 1982.

GRIEBEL, G. et al. Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus- maze test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.57, p.817-827, 1997.

GUYRE, P.M. et al. Glucocorticoid effects on the production and actions of immune cytokines. **J Steroid Biochem.** v.30 (1- 6), p.89-93, 1988.

HAINSWORTH, F.R. Saliva spreading activity and body temperature regulation in the rat. **Am J Physiol** v.212, p.1288–92, 1967

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v.18, p.385-403; 1934.

HANSEN, D. K. et al. Pharmacokinetic considerations of dexamethasone-induced developmental toxicity in rats. **Toxicol. Sci.**, v. 48, p. 230-239, 1999.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 12, n. 2, p. 123-37, 1988.

HAUGER, R.L. et al. Role of CRF receptor signaling in stress vulnerability, anxiety, and depression. **Ann N Y Acad Sci.** v.1179, p.120–43, 2009.

HENDERSON, T. A. et al. Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, Chevy Chase, MD,** v. 88, p. 440–449, 2003.

HERMAN, J.P. et al. Rapid regulation of corticotropin-releasing hormone gene transcription in vivo. **Mol. Endocrinol.** v.6; p.1061–1069, 1992.

HILLERER, K. M. et al. Exposure to chronic pregnancy stress reverses peripartum- associated adaptations: implications for postpartum anxiety and mood disorders. **Endocrinology.** v. 152, p. 3930–3940, 2011.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior,** v.53, p.271- 275, 1996.

HOLMES, A.; RODGERS, R. J. Responses of swiss-webster mice to repeated plus- maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? **Pharmacol. Biochem. Behav,** v.60 (2), p.473-488, 1997.

HOLMES, A.; RODGERS, R.J. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze **Neurosci. and Biobehav.,** v.23, p.971-980, 1999

HOLNESS, M. J.; SUGDEN, M. C. Dexamethasone during late gestation exacerbates peripheral insulin resistance and selectively targets glucose-sensitive functions in  $\beta$  cell and liver. **Endocrinol.,** v. 142, p. 3742-3748, 2001.

HUESTON, C. M.; DEAK, T. On the Time Course, Generality, and Regulation of Plasma Progesterone Release in Male Rats by Stress Exposure. **Endocrinology,** v.155-9, p.3527-37, 2014.

IKEGAMI, M. et al. Repetitive prenatal glucocorticoids improve lung function and decrease growth in preterm lambs. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, New York, NY,** v. 156. p. 178–184, 1997.

ISHIHARA, O. et al. Interleukin-1 beta-stimulated PGE2 production from early first trimester human decidua cells is inhibited by dexamethasone and progesterone. **Prostaglandins**, v.49 (1), p.15–26, 1995.

JAIN, N.K., KULKARNI, S.K., SINGH, A. Lipopolysaccharide-mediated immobility in mice: reversal by cyclooxygenase enzyme inhibitors. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v.23, p.441–4, 2001.

KAINUMA, E. Association of glucocorticoid with stress-induced modulation of body temperature, blood glucose and innate immunity. **Psychoneuroendocrinology**. Volume 34, Issue 10. Pages 1459–1468, 2009.

KELLY, R.W. Pregnancy maintenance and parturition: the role of prostaglandin in manipulating the immune and inflammatory response. **Endocr Rev**, v. 15(5), p.684–706, 1994.

KENT, S. et al. Mechanisms of sickness-induced decreases in food-motivated behavior. **Neurosci Biobehav Rev**, v.20 (1), p.171-5, 1996.

KENT, S. et al. Sickness behavior as a new target for drug development. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, p. 24- 28, 1992.

KENT, S.; BRET-DIBAT, J. L.; KELLEY, K. W. DANTZER, R. Mechanisms of sickness-induced decreases in food-motivated behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 20, n. 1, p. 171 – 175, 1996.

KENT, S.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Effects of lipopolysaccharide on food-motivated behavior in the rat are not blocked by an interleukin-1 receptor antagonist. **Neuroscience Letters**, v. 145, n. 1, p. 83-6, 1992.

KINOSHITA, D. **Avaliação dos efeitos do LPS sobre parâmetros comportamentais e imunológicos em camundongos idosos**. Dissertação (Mestrado). 133f. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia. Programa de Pós Graduação Patologia Experimental e Comparada. São Paulo. 2007

KIRSTEN, T.B. **Avaliação Comportamental e Neuroquímica da prole masculina de ratas expostas pré-natalmente ao lipopolissacarídeo**. Dissertação (Mestrado). 123f. Faculdade de

Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental e Comparada. São Paulo: USP; 2008.

KIRSTEN, T.B. et al. Prenatal lipopolysaccharide reduces motor activity after an immune challenge in adult male offspring. **Behavioural Brain Research**. v.211, n. 1, p.77–82, 2010.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiological Reviews**. v.71, n. 1, p.93-127, 1991.

KOCHENBORGER, L. Efeito da microinjeção de agonistas alfa- adrenérgicos na região da concha do núcleo accumbens sobre a ansiedade e ingestão de alimentos em ratos saciados. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.

KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends in Neuroscience**.v. 25, n. 3, p. 154-9, 2002.

KOZAK W, et al. Soluble tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor prevents decrease of body temperature in mice treated indomethacin and lipopolysaccharide. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.813, p. 264–71, 1997.

KOZAK, W. Regulated decrease in body temperature. In: Mackowiak PA, editor. **Fever: basic mechanisms and management**. Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 467–78, 1997.

LABORDE, J. B. et al. Prenatal dexamethasone exposure in rats: Effects of dose, age at exposure, and drug-induced hypophagia on malformations and fetal organ weights. **Toxicology Science, Princeton**. v. 19, n. 4, p. 545 – 554, 1992.

LACERDA, G.F.M.L de. **Ansiedade em modelos animais: efeitos de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial**. Dissertação (Mestrado). 74f. Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2006.

LACOSTA, S.; MERALI, Z.; ANISMAN, H. Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogenic-like effects. **Brain Research**. v.818, p.291–303, 1999.

LALITKUMAR, P. G. et al. Mifepristone, but not levonorgestrel, inhibits human blastocyst attachment to an in vitro endometrial three-dimensional cell culture model. **Human Reproduction**. v.22, p.3031–7, 2007.

LARSON, S.J.; DUNN, A.J. Behavioral effects of cytokines. **Brain, Behavior, and Immunity** v.15, p.371–387, 2001.

LEON, L.R. et al. Exacerbated febrile responses to LPS, but not turpentine, in TNF double receptor-knockout mice. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. R563–9, 1997.

LEONARD, B.E. The immune system, depression and the action of antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v. 25, n. 4, p.767-80, 2001.

LESAGE, J. et al. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behavior disturbances in the aged rat. **Journal of Endocrinology**. v. 181, p. 291–296, 2004.

LEWIS, M.C.; ORR, P. T.; FRICK, K. M. Differential effects of acute progesterone administration on spatial and object memory in middle-aged and aged female C57BL/6 mice. **Horm. Behav.**, v.54. pp. 455–462, 2008.

LICINIO, J.; FROST P. The neuroimmune-endocrine axis: pathophysiological implications for the central nervous system cytokines and hypothalamus-pituitary-adrenal hormone dynamics. **Braz J Med Biol Res**; v.33 (10), p.1141-8, 2000.

LINTHORST, A. C. et al. Effect of bacterial endotoxin and interleukin-1 beta on hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioral activity, and free corticosterone levels: an in vivo microdialysis study. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 2920 – 2934, 1995.

LISTER, G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmac. Ther**, v.46, p.321-340, 1990.

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

LONG, N.C. et al. Antiserum against tumor necrosis factor enhances lipopolysaccharide fever in rats. **Am J Physiol** v.258, p.332–7, 1990.

LONG, N.C., et al. Systemic injection of TNF- $\alpha$  attenuates fever due to IL-1 $\beta$  and LPS in rats. **Am J Physiol** v.263, p.987-9, 1992.

LYDON, J. P. et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. **Genes Dev.** v.9(18), p.2266-2278, 1995.

MACFARLAND, C.; W. G. REEDER. Cleaning symbiosis involving Galapagos tortoises and two species of Darwin's finches. **Z. Tierpsychol.** n.34, p.464-483, 1974.

MADDEN, K. S.; FELTEN, D. L. Experimental basis for neural-immune interactions. **Physiology Reviews**, v. 75, n. 1, p. 77-106, 1995.

MAGALHÃES, C.P.; et al. Programação Perinatal e o Comportamento Emocional em Ratos. **Neurobiologia**, v.74, p.1 jan./mar, 2011.

MAIER, S. F. et al. The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. **Annals of New York Academy of Science.** v. 840, n., p. 289-300, 1998.

MAKI, P.M.; ZONDERMAN, A.B., RESNICK, S.M. Enhanced verbal memory in nondemented elderly women receiving hormone-replacement therapy. **The American Journal of Psychiatry.** v. 158, p. 227-233, 2001.

MALLARD, B. A. et al. Bovine immunophysiology and genetics: A review of the research and career of Jeanne L. Burton. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 96-103, 2009.

MARKHAM, J.A.; PYCH, J.C.; JURASKA, J.M. Ovarian hormone replacement to aged ovariectomized female rats benefits acquisition of the morris water maze. **Hormones and Behavior.** v.42, p. 284-293, 2002.

MARTINEZ, J. C. et al. The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus maze. **Behavioural Processes.** v.60, p.15-26, 2002.

MASON, W. "Over-all" hormonal balance as a key to endocrine organization. **Psychosomatic Medicine**, v.30, p.791-808, 1968.

MATSUMURA, K.; KOBAYASHI, S. Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. **Frontiers in Bioscience**. v. 9, p. 2819-26, 2004.

McCARTHY, D. O.; KLUGER, M. J.; VANDER, A. J. Effect of centrally administered interleukin-1 and endotoxin on food intake of fasted rats. **Physiology and Behavior**, v. 36, n. 4, p. 745 – 749, 1986.

MCCARTHY, D. O.; KLUGER, M. J.; VANDER, A. J. Suppression of food intake during infection: is interleukin-1 involved? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 42, n. 6, p. 1179 – 1182, 1985.

MCCARTHY, F.D. et al. Dietary energy density and frame size effects on composition of gain in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**. v.60, n. 3, p.781-90, 1985.

McINTYRE, C. K. et al. Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.985, p.273-293, 2003.

MENARD J.; TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neuroscience Biobehavioral Review**, v.23, p. 591–613, 1999.

MIKICS, E. et al. Behavioral specificity of non- genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. **Hormones and Behavior**, v.48, p.152-162, 2005.

MILKOVIC, K. et al. Maintenance of the plasma corticosterone concentration of adrenalectomized rat by the fetal adrenal glands. **Endocrinology**, v. 93, p. 115-118, 1973.

MILLER, N. E. Some psychophysiological studies of motivation and of the behavioral effects of illness. **Bull. Br. Psychol. Soc.** v.17, p.1–20, 1964.

MOLDOW, R. L. et al. Blockage of glucocorticoid, but not mineralocorticoid receptors prevents the persistent increase in circulating basal corticosterone concentrations following stress in the rat. **Neuroscience Letters** v.374, p.25–28, 2005.

MOORE, S. L.; FEWELL, J. E. Mifepristone (RU38486) influences the core temperature response of term pregnant rats to intraperitoneal lipopolysaccharide. **Experimental Physiology**, v.91, p.741-746, 2006.

MORISHIGE, W.K.; PEPER, G.J.; ROTHCHILD, I. Serum luteinizing hormone, prolactin and progesterone levels during pregnancy in the rat. **Endocrinology** v.92, p.1527–1530, 1973.

MORRIS, D. et al. Dexamethasone reduces endotoxin-induced tumor necrosis factor activity production in vitro by equine peritoneal macrophages. **Cornell Vet.**, v.81, p.267-276, 1991.

MOSS, T. J. M. et al. **Programming effects in sheep of prenatal growth restriction and glucocorticoid exposure.** American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, Rockville Pike, Bethesda, MD, v. 281, p. R960–R970, 2001.

MURPHY, B.E.P. et al. Response to steroid suppression in major depression resistant to antidepressant therapy. **J Clin Psychopharmacol**, v.11, p.121-126, 1991.

MURPHY, B.E.P. Treatment of major depression with steroid suppressive drugs. **J Steroid Biochem Molec Biol** v.39, p.2392- 44, 1991.

MURPHY, S. P. et al. Interferon Gamma in Successful Pregnancies. **Biology Reproduction**, n. 80, p. 848-859, 2009.

MURPHY, C.A. et al. Lesion of the habenular efferent pathway produces anxiety and locomotor hyperactivity in rats: a comparison of the effects of neonatal and adult lesions. **Behavioural Brain Research**, v.81, p. 43-52, 1996.

ERTMAN, N.; ANDREANO, N.; CAHILL, J.M. Progesterone at encoding predicts subsequent emotional memory. **Learn. Mem.** v.18, p. 759–763, 2011.

NAKAYAMA, T.; SUZUKI, M.; ISHIZUKA, N. Action of progesterone on preoptic thermosensitive neurones. **Nature** v.258, p.80, 1975.

NARVEKAR, N. et al. Low-dose mifepristone inhibits endometrial proliferation and up-regulates androgen receptor. **J Clin Endocrinol Metab** v.89, p.:2491–7. 2004

NASCIMENTO, A. et al. Temporal Analysis of Lipopolysaccharide-Induced Sickness Behavior in Virgin and Lactating Female Rats. **Neuroimmunomodulation** v.20:305–312, 2013.

NEUMANN, I. D. Brain mechanisms underlying emotional alterations in the peripartum period in rats. **Depress Anxiety**, v. 17, p. 111-121, 2003.

NYRIENDA, J. M. et al. Glucocorticoids exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and cause glucose intolerance in adult offspring. **Journal of Clinical Investigation, Ann Arbor, Michigan**, v. 101, n. 10, p. 2174 – 2181, 1998.

O'DWYER A-M et al. Treatment of major depression with metyrapone and hydrocortisone. **J Affect Disord** v.33, p.123-128, 1995.

OHKAWA, T. et al. Effect of an acute maternal stress on the fetal hypothalamo-pituitary-adrenal system in late gestational life of the rat. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 98, p. 123-129, 1991.

OHMURA, Y.; YOSHIOKA, M. The roles of corticotropin releasing factor (CRF) in responses to emotional stress: is CRF release a cause or result of fear/anxiety? **CNS Neurol Disord Drug Targets**; v.8, p.459–69, 2009.

PAFFARO JR, V.A., et al. Subset Classification of Mouse Uterine Natural Killer Cells By DBA Lectin Reactivity. **Placenta**. V.24, p.479, 2003.

PAIVA, I.; RIBEIRO, C. Terapêutica farmacológica da doença de Cushing. **Acta Méd Port** v.18, p.69-76, 2005.

PALERMO-NETO, J.; FLORIO, J. C.; SAKATE, M. Developmental and behavioral effects of prenatal amitraz exposure in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 16, p. 65-70. 1994.

PALERMO-NETO, J.; SAKATE, M.; FLORIO, J. C. Developmental and behavioral effects of postnatal amitraz exposure in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 989-997, 1997.

PAPICH, M.G.; DAVIS, L.E. Glucocorticoid therapy. **Current Veterinary Therapy**, v.10, p.54-62, 1989.

PARÉ, W.P. Relationship of various behaviors in the open field test of emotionality. **Psychological Reports**, v.14, p.19-22, 1964.

PARNET, P. et al. Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior. **J Neuroimmunol** v.125, p.5-14, 2002.

PARNHAM, M. J. The effect of metyrapone on uterine prostaglandin output and smooth. **Eur J Pharmacol.** v.40, p.285–290, 1976.

PARNHAM, M. J.; SNEDDON, J.M. The influence of metyrapone on the synthesis and release of prostaglandins from the pregnant rat uterus in vitro. **Brit. J. Pharmacol.** v.55, p.535, 1975.

PARNHAM, M.J.; SNEDDON, J.M. Metyrapone inhibits prostaglandin synthesis and release from the pregnant rat uterus in vitro. **Brit. J. Pharmacol.** v.54,278P, 1975.

PAUL, L., FRAIFELD, V., KAPLANSKI, J. Evidence supporting involvement of leu- kotrienes in LPS-induced hypothermia in mice. **Am J Physiol.** v.276, p.52–8, 1999.

PEIRÓ, J.R. et al. Clinical and laboratory evaluation after intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS). **J. Equine Vet. Sci.**, v.19, p.185-189, 1999.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plusmaze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** v.24, p.525-529, 1986.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neurosciences Methods.** v.14: 149-167, 1985.

PEPE, G.J.; ROTHCHILD, I. A comparative study of serum progesterone levels in pregnancy and various types of pseudopregnancy in the rat. **Endocrinology** v.95, p.275–279, 1974.

PESTANA, F. Avaliação Comportamental e dos Níveis Séricos e Metabolismo Periférico dos Hormônios Tireoidianos em Ratos Submetidos ao Estresse Social Seriado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2010.

PORSOLT, R.O., BERTIN, A., JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arc International Pharmaceuticals Thermalife**. v. 229, p.327-336, 1977.

PRUT, L; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology** v. 60061, p.1- 31, 2003.

PRYCE, G.; GIOVANNONI, G.; BAKER, D. Mifepristone or inhibition of 11 $\beta$ - hydroxylase activity potentiates the sedating effects of the cannabinoid receptor- 1 agonist  $\delta$  (9)-tetrahydrocannabinol in mice. **Neurosci Letters Journal**. v. 341, p.164–166, 2003.

QUENBY, S. et al. Prednisolone reduces preconceptual endometrial natural killer cells in women with recurrent miscarriage. **Fertility and Sterility, Birmingham, AL**. v. 84, p. 980 – 984, 2005.

QUENBY, S., FARGUHARSON, R. Uterine natural killer cells, implantation failure and recurrent miscarriage. **Reproductive Biomed Online**. v.13, n. 1, p.24-8, 2006.

QUIRARTE, G. L.; ROOZENDAAL, B.; McGAUGH, J. L. Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.94, p.14048-14053, 1997.

RAMACHANDRA, R.N., SEHON, A.H., BERCZI, I. Neuro-hormonal host defence in endotoxin shock. **Brain, Behavior, and Immunity**. v.6 (2), p.157-69, 1992.

RAMOS, A. et al. A multiple-test study of anxiety-related behaviors in six inbred rat strains. **Behavioral Brain Research**. v.85, p.57-69, 1997.

RAMOS, A.; MORMEDE, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v.22, p.33-57, 1997.

RAVEN et al. The relationship between the effects of metyrapone treatment on depressed mood and urinary steroid profiles. **Psychoneuroendocrinology**. v. 21, n. 3, p. 277-286, 1996.

RAVEN, P.W., CHECKLEY, S.A., TAYLOR, N.F. Extra-adrenal effects of metyrapone include inhibition of the 11 $\alpha$ -oxoreductase activity of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: a model for 11 $\alpha$ -HSD I deficiency. **Clinical Endocrinology** v.43, p.637-644, 1995.

RAWLS, S. M. A. et al. N- methyl-D-aspartate antagonists and WIN 55212-2 [4,5-dihydro-2-methyl-4(4-morpholinylmethyl)-1-(1-naphthalenyl-carbonyl)-6H-pyrrolo[3,2,1-i,j]quinolin-6-one], a cannabinoid agonist, interact to produce synergistic hypothermia. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 303, p.395–402, 2002

REICHE, E. M.; NUNES, S. O.; MORIMOTO, H. K. Stress, depression, the immune system and câncer. **The Lancet Oncology**. v. 5, p. 617-625, 2004.

RIBEIRO, D. E. et al. Inhibition of nitric oxide synthase accentuates endotoxin-induced sickness behavior in mice. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**. v.103, n. 3, p.535–40, 2012.

RIOUX-DARRIEULAT F., PARANT M., CHEDID L. Prevention of endotoxin induced abortion by treatment of mice with antisera. **Journal of Infectious Diseases**. v.137, n. 1, p.7–13, 1978.

ROBBINS, A.; SPITZ, I.M. Mifepristone: clinical pharmacology. **Clinical Obstetrics and Gynecology**. v.39, p.436–450, 1996.

ROCHA, VANESSA DE MOURA SÁ. Aspectos neuroimunes de camundongos mantidos em uma relação social estável. Tese de doutorado em Ciências. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. 2006.

RODGERS R.J, COLE J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S.J., Hendrie, C.A. (Eds.), **Ethology and Psychopharmacology**. Wiley, Chichester, p. 9–44, 1994.

RODGERS RJ, C.J. Anxiety enhancement in the murine elevated plusmaze by immediate prior exposure to social stressors. **Physiology & Behavior**, v.53, n. 2, p. 383-8, 1993.

RODGERS, R. J. et al. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiology & Behavior**. v.68, p.47-53, 1999.

RODGERS, R. J; JOHNSON, N.J.T. Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Murine Elevated Plus-Maze Test of Anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v.52, p. 297-303, 1995.

RODGERS, R.J. et al. Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v.54, p.41-50, 1996.

RODGERS, R.J. et al. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, v.30, p.289–304, 1997.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S.J., Hendrie, C.A. (Eds.), **Ethology and Psychopharmacology**. Wiley, Chichester, p. 9–44, 1994.

ROMA, L. P. Mecanismos Moleculares do Efeito Citotóxico da Dexametasona em Linhagens de célula beta e ilhotas pancreáticas. Tese de doutorado. Instituto de Biologia. Doutorado em Biologia Funcional e Molecular. Universidade Estadual de Campinas. 2009

ROMANOVSKY AA, SIMONS CT, KULCHITSKY VA: ‘Biphasic’ fevers often consist of more than two phases. **American Journal of Physiology**. v. 275, p. R323– R331, 1998.

ROMANOVSKY, A.A. Signaling the brain in the early sickness syndrome: are sensory nerves involved? **Frontiers in Bioscience**. v.1, p. 9:494-504, 2004.

ROMANOVSKY, A.A., SZEKELY, M. Fever and hyperthermia: two adaptive thermoregulatory responses to systemic inflammation. **Medical Hypotheses** v.50, p. 219–26, 1998.

ROSA, P. C. S. et al. Effects of diclofenac and dexamethasone on horse experimental endotoxemia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 55, n. 3, Belo Horizonte, 2003.

ROTHWELL, N. J.; HOPKINS, S. J. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. **Trends Neuroscience**, v. 18, p. 130-136, 1995.

ROTLLANT, D. et al. Evidence that metyrapone can act as a stressor: effect on pituitary–adrenal hormones, plasma glucose and brain c-fos induction. **European Journal of Neuroscience**. v.16; p.693–700, 2002.

SALUK-JUSZCZAK, J.; WACHOWICZ, B. The proinflammatory activity of lipopolysaccharide. **Postepy Biochemii**, v. 51, n. 3, p. 280-287, 2005.

SANDMAN, C. A.; KASTIN, A. J. The influence of fragments of the LPH chains on learning, memory and attention in animals and man. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 13, p. 39-60, 1981.

SAPHIER, D. et al. Multiunit electrical activity in conscious rats during an immune response. **Brain Behaviour and Immunity**, v. 1, n. 1, p. 40-51, 1987.

SARKAR, N. N. The potential of mifepristone (RU486) as a female contraceptive drug. **International Journal of Clinical Practice**. v.56, p. 140–4, 2002.

SECKL, J. R.  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 4, p.597–602, 2004.

SERAFIM, K.R. **L-Histidina reduz déficit estado dependente na evocação da memória em camundongos reexpostos ao labirinto em cruz elevado**. Dissertação (Mestrado). 66f. Pós Graduação na Universidade Federal de São Carlos, para o título de Mestre em Fisioterapia. São Carlos. 2008.

SETEM, J. et al. Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.62, p.515-521, 1999.

SEYLE H. What is stress? **Metabolism**, v. 5, p. 525 – 530. 1956.

SIZE, P. Y. Glucocorticoid regulation of the serotonergic system of the brain. **Advances in Biochemistry and Psychopharmacology**, v.15, p.251-265, 1976.

SLATTERY, D. A.; NEUMANN, I. D. No stress please! Mechanisms of stress hyporesponsiveness of the maternal brain. **Journal of Physiology**. v. 586, p. 377– 385, 2007.

SMITH, C. A. et al. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. **Science**, v.248 , p. 1019–1023, 1990.

SMITH-SWINTOSKY, V.L. et al. Metyrapone, an inhibitor of glucocorticoid production, reduces brain injury induced by focal and global ischemia and seizures. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. v.16, p.585–598, 1996.

SONCINI, R. et al. Dipyrone attenuates acute sickness response to lipopolysaccharide in mice. **Neuroscience Letters** v. 516, p.114–8, 2012

SOUZA, L. A. de. Fatores hormonais, cognitivos e neuroanatômicos associados ao comportamento exploratório de ratos submetidos ao teste e reteste no labirinto em cruz elevado. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2010

SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária, 2ª ed., p. 227-237, 1999.

SPITZ, I.M. Progesterone receptor antagonists. **Current Opinion in Investigational Drugs** v.7, p.882–90, 2006.

STEWART, P. M. et al. Hypertension in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess due to mutation of the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene. **The Lancet, London**, v. 347, n. 8994, p. 88-91, 1996.

STÖHR, T. et al. Rat strain differences in open field behavior and the locomotor stimulating and rewarding effects of amphetamine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.59 (4): p. 813-818; 1998.

STONE, E.A. et al. Depressive behavior in mice due to immune stimulation is accompanied by reduced neural activity in brain regions involved in positively motivated behavior. **Biol Psychiatry** v.60, p.803–811, 2006.

STREETEN, D.H.P. **Corticosteroid Therapy**. J. A .M. A, v.232, p.944-947. 1975.

STUCK, A. E.; MINDER, C. E.; FREY, F. J. Risk of Infectious Complications in Patients Taking Glucocorticosteroids. **Reviews of Infectious Diseases, Oxford**, v. 11, n. 6, p. 954-963, 1989.

SWIERGIEL, A.H., DUNN, A.J. Effects of interleukin-1 $\beta$  and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. V.86, p.651–659, 2007.

TAVARES, E.P. **Aspectos morfofisiológicos e comportamentais da gestação de camundongos após tratamento prévio com danazol**. Dissertação (Mestrado). 100f. Programa

Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. Instituto de Biomedicina. Universidade Federal de Alfenas, 2011.

TOLLNER, B. The role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and metabolic responses of rats to intraperitoneal injection of a high dose of lipopolysaccharide. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**. v.440, p. 925–932, 2000.

TOYAMA, R. P. Avaliação comportamental e bioquímica de camundongos submetidos a um modelo experimental de inflamação associada a criolesão. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas. UFSC, Florianópolis, 2012.

TRAINER, P.J.; BESSER, M. Cushing's Syndrome. Therapy directed at the adrenal glands. **Endocrinology Metabolism Clinics of North America** v.23; 3: p.571-84, 1994

TREML, T. E. **O uso da dexametasona e a fertilidade do touro**. Dissertação (Mestrado) 54f. Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias. UFPR. Curitiba. 2010.

TURNBULL, A.V., LEE, S., RIVIER, C. Mechanisms of hypothalamic–pituitary–adrenal axis stimulation by immune signals in the adult rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.840, p.434–43. 1998.

UENO, R. et al. Role of prostaglandin D2 in the hypothermia of rats caused by bacterial lipopolysaccharide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.79:6093–7, 1982

USHIKUBI, F. et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Nature**. v.395, p.281–284, 1998.

VAN OVERVELD, F. J. et al. Inhibitory capacity of different steroids on neutrophil migration across a bilayer of endothelial and bronchial epithelial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 477, n. 3, p. 261-267, 2003.

VILAÇA JUNIOR, P. E. A. **Efeito da administração pré-natal de dexametasona sobre parâmetros sanguíneos e desenvolvimento hepático na prole de ratos**. Dissertação (Mestrado). 68f. Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. UFRPE. RECIFE. 2011.

WALL, P. M.; MEISSER, C. Ethological confirmatory factor analysis of anxiety-like behaviour in the murine elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**. v.114, p.199- 212, 2001.

WANG, J. et al. Effects of homologous interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha on the core body temperature of mice. **Neuroimmunomodulation**. v. 4, p. 230–6, 1997.

WANG, J., ANDO, T., DUNN, A.J. Effects of homologous interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha on the core body temperature of mice. **Neuroimmunomodulation** v.4, p.230–6, 1997.

WELBERG, L. A.; SECKL, J. R.; HOLMES, M. C. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 1047-1054, 2000.

WERNER, R., Effect of metopirone-ditartrate on thermogenesis in the guinea-pig. **Comp. Biochemistry and Physiology**. v. 90, 445–450, 1988.

WESTERHOF, I.; BROM, W.E.; MOL, J.A. Sensitivity of the hypothalamic-pituitary- adrenal system of pigeons. **Avian Diseases**. v. 38, p. 435-445, 1994.

WICK, G.; HU, Y.; SCHWARZ, S.; KROEMER, G. Immunoendocrine communication via the hypothalamo–pituitary–adrenal axis in autoimmune diseases. **Endocrine Reviews**, v. 14, p. 539–563, 1993.

WILLIAMS, M. T. et al. Changes in the hormonal concentrations of pregnant rats and their fetuses following multiple exposures to a stressor during the third trimester. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 21, p. 403-414, 1999.

WOLKOWITZ, O.M. et al. Ketoconazole administration in hypercortisolemic depression. **The American Journal of Psychiatry** v.150, p. 810e812, 1993.

YIRMIYA, R. et al. Behavioral effects of lipopolysaccharide in rats: involvement of endogenous opioids. **Brain Research**. v. 648, n. 1, p. 80-86, 1994.

YIRMIYA, R. et al. Interleukin-1 inhibits sexual behavior in female but not male rats. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 9, p. 220 – 233, 1995.

YU J, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. **Immunity**; v.24, p.575–590, 2006.

ZARROW, M. X.; PHILPOTT, J. E.; DENENBERG, V. H. Passage of 14C-4- corticosterone from the rat mother to the foetus and neonate. **Nature**, v. 226, p. 1058- 1059, 1970.

ZAVAN, B. Aspectos morfofisiológicos e comportamentais após inflamação induzida por LPS durante a gestação de camundongos. Dissertação (Mestrado). 106f. Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. Instituto de Biomedicina. UNIFAL-MG. Alfenas. 2011.

ZAVAN, B. et al. Immunohistochemical demonstration of blood vessels alpha-actin down-regulation in LPS-treated pregnant mice. **Physiology Research**. v. 61, n. 5, p. 551-3, 2012.

ZAVAN, B., AMARANTE-PAFFARO, A.M., JOAZEIRO, P.P, YAMADAT, A.T. PAFFARO JR, V.A. Adhesion Molecules in mouse pregnant uterus. **The Anatomical Record**. v. 293, p. 1081-1088, 2010.

ZHAO, H.; STEINBERG, G.K.; SAPOLSKY, R.M. General versus specific actions of mild-moderate hypothermia in attenuating cerebral ischemic damage. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. v.27, p.1879–1894, 2007

ZHOU, M. M. F. et al. Low-dose mifepristone increases uterine natural killer cell cytotoxicity and perforin expression during the receptive phase. **Fertility and Sterility**. v. 96, n. 3, 2011.