

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Efeitos transgeracionais da administração
prenatal de lipopolissacarídeo (LPS) no
comportamento maternal da prole de ratas**

Ana Maria de Souza Souto

Dissertação Apresentada ao Programa de
Mestrado em Medicina Veterinária da
Universidade Paulista – UNIP para obtenção do
título de mestre em Medicina Veterinária.

São Paulo
2010

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Efeitos transgeracionais da administração
prenatal de lipopolissacarídeo (LPS) no
comportamento maternal da prole de ratas**

Ana Maria de Souza Souto

Dissertação Apresentada ao Programa de
Mestrado em Medicina Veterinária da
Universidade Paulista – UNIP para obtenção do
título de mestre em Medicina Veterinária.
Área de Concentração: Imunopatologia
Orientador: Eduardo Fernandes Bondan

**São Paulo
2010**

Souto, Ana Maria de Souza

Efeitos transgeracionais da administração pré-natal de
lipopolissacarídeo (LPS) no comportamento maternal da prole de
ratas / Ana Maria de Souza Souto – São Paulo, 2010.

59 f.:il. color.

Dissertação (mestrado) – Apresentada ao Instituto de Ciências da
Saúde da Universidade Paulista, São Paulo, 2010.

Área de Concentração: Imunopatologia

“Orientação: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan”

“Co-orientação: Profa. Dra. Maria Martha Bernardi”

1. Núcleo accumbens. 2. Comportamento agressivo maternal. 3.
Mecanismos epigenéticos. I. Título.

UNIVERSIDADE PAULISTA UNIP
Programa de Mestrado em Medicina Veterinária

Candidata: **Ana Maria de Souza Souto**

Título da Dissertação: **Efeitos Transgeracionais da Administração Prenatal de Lipopolissacáideo (LPS) no Comportamento Maternal da Prole de Ratas.**

Orientador: **Eduardo Fernandes Bondan**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou a candidata:

() Aprovada

() Reprovada

1) Examinador (a) _____

Nome _____

Instituição _____

2) Examinador (a) _____

Nome _____

Instituição _____

3) Examinador (a) _____

Nome _____

Instituição _____

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Sobre o comportamento materno.....	1
1.2 Sobre a infecção materna perinatal.....	6
1.3 Sobre o lipopolissacarídeo	7
1.4 LPS e células gliais	10
1.5 Justificativa.....	11
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Animais, acasalamento e tratamento	13
3.2 Avaliação do CM em ratas lactantes	13
3.3 Avaliação da atividade geral em campo aberto de ratas lactantes	14
3.4 Sistema de observação computadorizada – ethovision	16
3.5 Avaliação do comportamento agressivo maternal (CAM) em ratas Lactantes.....	17
3.6 Marcação imuno–histoquímica da proteína glial fibrilar ácida (GFAP).....	18
3.7 Interpretação imuno-histoquímica	20
3.8 Delineamento experimental.....	21
4 RESULTADOS.....	23
Experimento 1.....	23
Experimento 2.....	24

Experimento 3.....	25
Experimento 4.....	26
5 DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÕES	34
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

“ Embora ninguém possa voltar atrás para fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora a fazer um novo fim.”

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à memória de meu pai, Sodario, o melhor pai do mundo. Com certeza sempre estará presente em meu coração.

À minha mãe Cleusa, a melhor mãe que alguém pode ter. Grande incentivadora em todos os momentos da minha vida.

E a toda a minha família - irmãos, tios, sobrinhos, primo, cunhadas -, sempre muito presentes e apoiando minhas decisões.

Sem a presença de todas essas pessoas na minha vida nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, porque está presente em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan, meu orientador, obrigada pela dedicação, compreensão, conhecimentos ensinados e enorme confiança depositada.

À Profa. Dra. Maria Martha Bernardi, que colaborou e me ajudou de forma extraordinária para este trabalho ser concluído. Obrigada pelo carinho, amizade, paciência e inúmeros e valiosos ensinamentos.

Aos funcionários do Biotério Multidisciplinar de Pesquisas da Universidade Paulista (UNIP), muito obrigada pelo cuidado, indispensável aos animais utilizados em meu experimento, e pela amizade.

Aos demais professores do Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, obrigada pelo conhecimento que me foi acrescentado e pelo auxílio, quando necessário.

E a todos aqueles que, mesmo sem serem citados, colaboraram para mais esta etapa da minha vida ser concluída. Muito, muito obrigada.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o de investigar as possíveis consequências da administração de uma endotoxina, o lipopolissacarídeo (LPS), no comportamento maternal de ratas cujas mães receberam o LPS na gestação. Para tanto, a prole feminina de ratas cujas mães foram tratadas com a endotoxina no 9,5º dia da gestação foram cruzadas, com observação de seu comportamento maternal e maternal agressivo, bem como da atividade geral em campo aberto. Após as observações comportamentais, os encéfalos destas fêmeas foram retirados e analisou-se, por imuno-histoquímica, a expressão astrocitária de GFAP no núcleo accumbens. Os resultados mostraram que, em relação aos animais do grupo controle, aqueles do grupo experimental apresentaram: 1) no comportamento maternal, aumento significante na latência para recolher os filhotes e agrupá-los; 2) no comportamento agressivo maternal, maior latência para o primeiro ataque, menor número e tempo de ataques, bem como diminuição da porcentagem de filhotes no ninho ao término das observações; 3) nenhuma alteração em parâmetros da atividade geral e na expressão astrocitária de GFAP do *núcleo accumbens*. Concluiu-se que a administração prenatal de LPS promove na prole feminina de ratas alterações importantes no cuidado materno, fato que tem importância na sobrevivência das demais gerações.

Palavra chave: lipopolissacarídeo, comportamento maternal, núcleo accumbens

ABSTRACT

This study investigated the prenatal effects of the lipopolissacharide (LPS) administration on maternal behavior aspects of female offspring rats. Thus, pregnant rats received, i.p route, 100 µg/kg of LPS (experimental group) or PBS (control group) in the 9,5 day of gestation. After delivery the female offspring rats of both groups were housed by treatment and in adult age were mated with male, without any treatment. The maternal behavior was observed in the 5th day of lactation. The general activity and the maternal aggressive behavior were performed in days 5 and 6 of lactation, respectively. After behavioral observations, the brains of these females were removed and submitted to immunohistochemical staining in order to observe GFAP astrocytic expression in the *nucleus accumbens* of both groups. In relation to the control group, results showed that: 1) the latency to retrieve each pup and the total time in seconds to retrieve all pups were reduced; 2) in the aggressive maternal behavior, the latency to the first attack to the intruder, the number of attacks and the time of attack, as well the percentage of pups in the nest, were reduced; 3) no differences were detected in the general activity and; 4) no difference was found between groups in relation to GFAP astrocytic expression. It was concluded that the LPS prenatal administration reduced the maternal behavior of the female offspring rats. These observations could have importance on survival of the following generations.

Key words: lipopolissacharide, maternal behavior, *nucleus accumbens*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Contacto da rata com os filhotes (retirado com permissão de TEODOROV <i>et al.</i> , 2010).....	2
FIGURA 2	Recolher dos filhotes (retirado com permissão de TEODOROV <i>et al.</i> , 2010).....	2
FIGURA 3	Agrupamento dos filhotes (retirado com permissão de TEODOROV <i>et al.</i> , 2010).....	3
FIGURA 4	Amamentação dos filhotes (retirado com permissão de TEODOROV <i>et al.</i> , 2010).....	3
FIGURA 5	Comportamento materno total (retirado com permissão de TEODOROV <i>et al.</i> , 2010).....	4
FIGURA 6	Lamber os filhotes (retirado com permissão de TEODOROV <i>et al.</i> , 2010).....	4
FIGURA 7	Estrutura do LPS. Retirado de Brooks; Butel; Morse (BROOKS <i>et al.</i> , 2000).....	8
FIGURA 8	Modelo estrutural da parede celular da <i>Escherichia coli</i> , destacando o lipopolissacárido conforme proposição de Raetz & Whitfield (RAETZ; WHITFIELD, 2002).....	8
FIGURA 9	Arena de campo aberto utilizada para a observação da atividade geral individual dos filhotes no dia pós-natal (PND) 60 por uma sessão de 5 minutos. A arena foi subdividida virtualmente pelo sistema computadorizado EthoVision®.....	15
FIGURA 10	Sistema de observação computadorizada EthoVision®. A: arena de campo aberto; B: câmera para captação das imagens; C: monitor de vídeo ligado ao computador; D: imagem digitalizada representada em pixels. O mesmo programa rastreia e analisa o comportamento animal.....	17
FIGURA 11	Latência para recolher os filhotes de ratas cujas mães receberam no 9,5º dia da gestação 100 µg/Kg de LPS ou o veículo do LPS. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão. N= 7 ratas/grupo * p< 0,05 em relação aos animais do grupo controle (teste t de Student).....	23
FIGURA 12	Atividade geral de ratas, observadas no 5º dia de lactação, cujas mães foram tratadas no 9,5º dia da gestação com o LPS ou seu veículo.n = 12/grupo. Teste t de Student.....	25

FIGURA 13 Astrócitos imunorreativos para GFAP no núcleo accumbens.
Grupo controle. Obj. 40x..... 27

FIGURA 14 Astrócitos imunorreativos para GFAP no núcleo accumbens.
Grupo experimental. Obj. 40x..... 27

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Delineamento Experimental.....	22
------------------	--------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Parâmetros do CM de ratas cujas mães receberam no 9,5 dias da gestação 100 µg/Kg de LPS ou o veículo do LPS. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão. N= 7 ratas/grupo * p< 0,05 em relação aos animais do grupo controle.....	24
TABELA 2	Comportamento agressivo maternal de ratas cujas mães receberam no 9,5º dia da gestação a endotoxina. N=12/grupo.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	complexo avidina-biotina-peroxidase
CAM	comportamento agressivo maternal
CM	comportamento materno ou maternal
CMT	comportamento materno total
CR3	receptores para o componente 3 do sistema complemento
DA	hidrocloridrato de dopamina
DAB	3,3' diaminobenzidina
DNA	ácido desoxirribonucléico
DOPAC	ácido 3,4 – dihidroxifenilacético
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
GABA	ácido gama-aminobutírico
GD	dia de gestação
GFAP	proteína glial fibrilar ácida
HE	hematoxilina-eosina
HPA	hipotálamo-pituitária-adrenal
IL-1β	interleucina 1-beta
IL-2	interleucina-2
IL-6	interleucina-6
ip	via intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	complexo principal de histocompatibilidade

NO	óxido nítrico
PBS	tampão fosfato salina
PND	dia de vida pós-natal
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
siRNA	segmentos mais curtos de nucléotideos
TNF-α	fator de necrose tumoral α
UNIP	Universidade Paulista
μg/Kg	micrograma/kilo
μm	micromêtro

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sobre o comportamento materno

Em mamíferos, o conjunto de cuidados que a mãe oferece aos filhotes é denominado comportamento materno ou maternal (CM). O CM é comportamento complexo, espontâneo, instintivo e com características espécie-específicas, determinadas por modificações fisiológicas que ocorrem pouco antes ou logo após o parto (NUMAN, 1994; MATTSON *et al.*, 2001). Durante esse período especial, a meta principal da fêmea é garantir a própria sobrevivência e de seus filhotes.

Em ratas, antes do nascimento dos filhotes, as mães constroem ninhos para promover a termorregulação de sua prole, pois ao nascerem os filhotes são incapazes de controlar sua temperatura corpórea. No ninho, as fêmeas lactantes podem ficar sobre os filhotes numa postura denominada *crouching* ou cifose fisiológica, na qual sua coluna fica arqueada, facilitando a amamentação, além de passarem tempo significativo lambendo a cria para limpá-la. A limpeza da área anogenital estimula a defecação e micção dos filhotes (GUBERNICK; ALBERTS, 1983), e favorece a diferenciação sexual do cérebro da prole masculina (DOHLER, 1991). As figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mostram alguns parâmetros típicos do CM em ratas.



Figura 1 - Contato da rata com os filhotes (retirado com permissão de TEODOROV *et al.*, 2010)



Figura 2 - Recolher dos filhotes (retirado com permissão de TEODOROV *et al.*, 2010).



Figura 3 - Agrupamento dos filhotes (retirado com permissão de TEODOROV *et al.*, 2010).



Figura 4 - Amamentação dos filhotes (retirado com permissão de TEODOROV *et al.*, 2010).



Figura 5 - Comportamento materno total (retirado com permissão de TEODOROV *et al.*, 2010).



Figura 6 - Lamber os filhotes (retirado com permissão de TEODOROV *et al.*, 2010).

Diversos fatores ambientais, psicológicos, biológicos e neurais interagem para promover e manter o CM. Como mudanças hormonais internas geram respostas fisiológicas e comportamentais compensatórias, mudanças ambientais também levam a alterações hormonais (SCHULKIN, 1999).

Muitos estudos foram feitos sobre a influência do sistema auditivo e da estimulação olfatória dos filhotes no comportamento maternal. Filhotes de ratas emitem vocalizações ultrassônicas, as quais têm função de manter níveis altos de respostas maternas. Essas vocalizações ocorrem quando os filhotes estão fora do ninho ou quando sua temperatura corporal declina até níveis críticos. As vocalizações ultrassônicas resultam em maior atenção da fêmea e são estratégia eficiente para manter a resposta maternal, em especial o lamber a região anogenital (TEODOROV *et al.*, 2010). Já se verificou que fêmeas saem de seus ninhos e orientam-se preferencialmente em direção ao ultrassom emitido pelos filhotes (TEODOROV *et al.*, 2010).

Existem outros comportamentos indiretamente associados com estado maternal importantes para a sobrevivência da prole (STERN; LONSTEIN, 2001). Por exemplo, fêmeas prenhas mudam seu padrão de limpeza de tal forma a lamber mais sua região mamária e promover crescimento das mamas. Além disto, fêmeas lactantes são hiperfágicas, aumentando o consumo de sais e apresentando placentofagia. Além disto, as ratas têm limite para alimentar sua prole; se o número deles excede a capacidade de nutri-los, elas os rejeitam ou os canibalizam seletivamente. O canibalismo também está relacionado à falta de experiência materna, redução de alimentos durante a gestação e estresse pré-natal (TEODOROV *et al.*, 2010).

O grau de desenvolvimento da prole influencia também os padrões de cuidado materno entre mamíferos. Inicialmente, a mãe está em constante contato com sua prole, mas com o aumento da idade dos mesmos e à medida que eles se tornam independentes, ocorre decréscimo na resposta materna. Por este motivo, as avaliações do comportamento materno são feitas na primeira semana após o parto, pois a prole é, nesse período, dependente exclusivamente do cuidado materno (STURMAN-HULBE, 1929; WEISNER; SHEARD, 1922; SERAFIM; FELICIO, 2001; TEODOROV *et al.*, 2010).

O controle do CM envolve fatores neuroendócrinos e neuroanatômicos. Os hormônios gestacionais preparam o animal para agir de forma maternal para com o filhote. Já os neurotransmissores regulam o CM durante a fase de manutenção e lactação. A primeira fase da regulação do CM determina o início rápido deste no pós-parto, sendo controlada por hormônios relacionados com a gestação e lactação (estrógeno, progesterona, prolactina e ocitocina).

A segunda fase, a de manutenção durante a lactação, é controlada principalmente por fatores não hormonais, sendo que o estímulo proveniente do filhote se mostra o mais importante (NUMAN, 1994).

Participam do controle do CM áreas cerebrais, como hipocampo, amígdala, área pré-óptica medial, área tegumental ventral e núcleo *accumbens* (SLOTNICK, 1967; TERLECKI; SAINBURY, 1978).

A dopamina (DA) parece ser o mais importante neurotransmissor que modula o CM (SILVA *et al.*, 2001; 2003; OLAZÁBAL *et al.*, 2004). Assim, lesões deste sistema reduzem drasticamente o CM e antagonistas de receptores da dopamina também o fazem. Já foi demonstrado que os níveis de DOPAC, o metabólito da DA, estão muito baixos no final da gestação, quando comparados com aqueles da lactação (SILVA *et al.*, 2003; TEODOROV *et al.*, 2010).

Os estudos sobre o papel de outros neurotransmissores no controle do CM demonstram um papel modesto da serotonina e do GABA (KENDRICK *et al.*, 1988).

1.2. Sobre a infecção materna perinatal

Diversos trabalhos mostram que as infecções durante a gestação podem causar inibição da implantação do blastocisto em estágios iniciais da gestação, partos prematuros, necrose placentária, aborto espontâneo (reabsorção embrionária), natimortos, restrição de crescimento intrauterino, danos nos órgãos fetais (sistema hematopoiético, adrenais, coração, cérebro, pulmões, pele e possivelmente outros), displasia broncopulmonar, hemorragia intraventricular, retard no desenvolvimento do esqueleto, retard mental e doenças mentais, dentre outros (COLLINS *et al.*, 1994; HARJU *et al.*, 2005; HAVA *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2006; ROMERO *et al.*, 2007).

Além disto, distintas evidências sugerem que, além de fatores genéticos, o ambiente pode ter participação na incidência de doenças mentais. A infecção materna perinatal é considerada fator de risco para algumas doenças psiquiátricas do desenvolvimento, como esquizofrenia e autismo. Meyer *et al.* (2005) propõem que distúrbios precoces no desenvolvimento do cérebro estariam implicados na incidência de doenças psiquiátricas como autismo, esquizofrenia e retard mental. Estudos epidemiológicos indicam que o risco aumenta com infecção materna pré-

natal, possivelmente em consequência de eventos relacionados às ações de citocinas liberadas no processo inflamatório. Estes autores comentam ainda que os períodos críticos em que a infecção materna poderia interferir com o desenvolvimento cerebral do feto seriam da metade ao terço final da gestação.

Shi *et al.* (2003) administraram o vírus influenza humano em camundongos fêmeas no 9,5º dia de gestação (GD), e analisaram posteriormente sua ninhada. Os filhotes apresentaram redução na interação social e aumento da ansiedade. Propôs-se, então, que as citocinas seriam responsáveis pelas modificações comportamentais, pois não foi encontrado qualquer vestígio do RNA viral na prole destes camundongos. Esse estudo e diversos outros permitem a extração para o ser humano, e mostram que danos comportamentais permanentes podem ser causados não só por problemas genéticos, drogas ingeridas durante a gestação e outros fatores, mas também por infecções virais ou bacterianas a que tantas mulheres grávidas são expostas constantemente.

Recentemente, Fortier *et al.* (2007) observaram que o lipopolissacarídeo é o agente mais efetivo na inibição da amplitude de resposta a um estímulo sonoro de sua prole na idade adulta. Este modelo comportamental revelaria as deficiências nas informações sensoriais que ocorrem na esquizofrenia.

Chez *et al.* (2007) mostraram, em pequeno número de pacientes autistas, a existência de aumento dos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no soro e no líquido cerebroespinal, sugerindo que mecanismos inflamatórios poderiam contribuir para a ocorrência de autismo.

1.3. Sobre o lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo, ou LPS, é um constituinte pertencente às paredes celulares de bactérias Gram-negativas. Consiste num lipídio complexo, denominado lipídio A, ao qual está ligado um polissacarídeo constituído de um núcleo (ou core) e de uma série terminal de unidades repetidas. O lipídio A consiste de unidades dissacarídicas de glicosamina fosforilada, às quais estão ligados vários ácidos graxos de cadeia longa (variando de acordo com a espécie bacteriana). O núcleo do polissacarídeo é semelhante em todas as espécies Gram-negativas que possuem

LPS. Todavia, cada espécie contém uma unidade de repetição particular. Em geral, as unidades de repetição consistem em trissacarídios lineares ou em tetra ou pentassacarídios ramificados (BROOKS *et al.*, 2000).

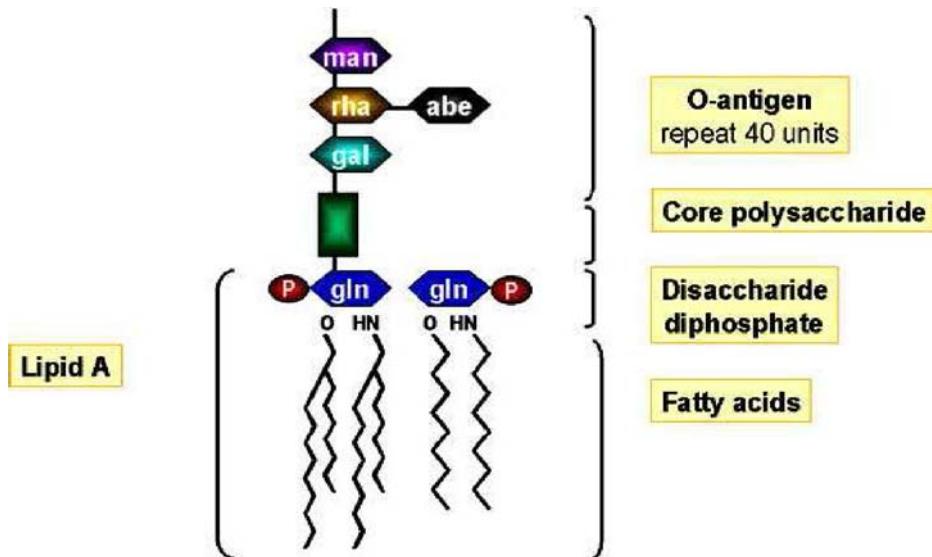


Figura 7 – Estrutura do LPS. Retirado de Brooks; Butel; Morse (BROOKS *et al.*, 2000)

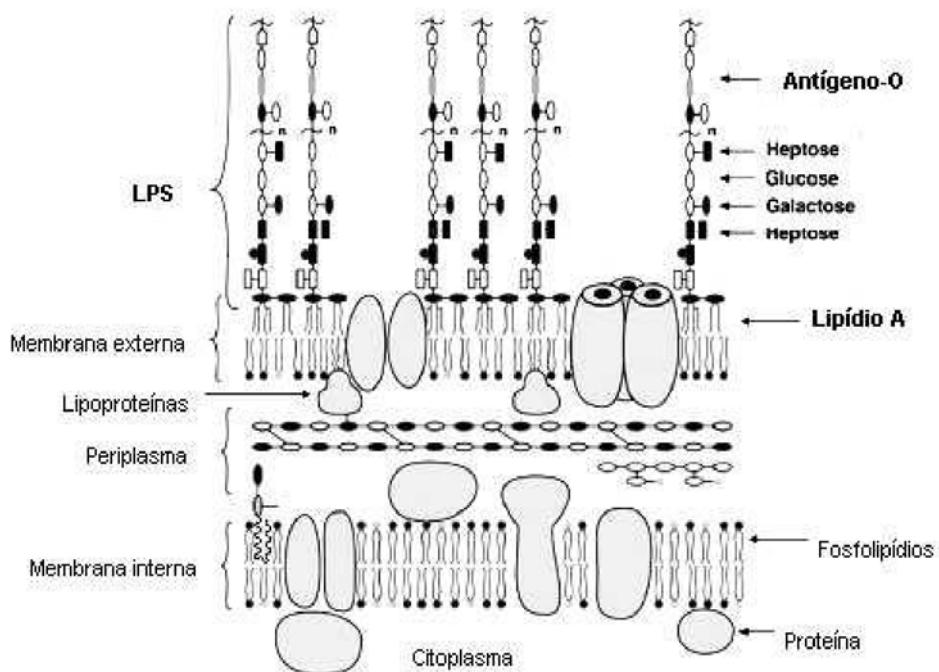


Figura 8 - Modelo estrutural da parede celular da *Escherichia coli*, destacando o lipopolissacarídeo conforme proposição de Raetz & Whitfield (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

As moléculas de LPS de carga negativa são ligadas de forma não covalente por cátions divalentes, tornando a membrana estabilizada e proporcionando uma

barreira contra moléculas hidrofóbicas (BROOKS *et al.*, 2000). As substâncias são termoestáveis, com peso molecular entre 3000 e vários milhões (JAWETZ *et al.*, 1998).

O LPS, que é extremamente tóxico para animais, apresentando efeito em concentrações menores que 1 nN (ADEREM *et al.*, 2000), é denominado endotoxina das bactérias Gram-negativas, pois está firmemente ligado à superfície celular, sendo liberado apenas quando as células são lisadas. Quando o LPS é clivado em lipídio A e polissacarídeo, toda a toxicidade (interação imune) está associada ao lipídio A. A especificidade antigênica é conferida pelas unidades terminais de repetição, que circundam a célula, formando uma camada de polissacarídeos hidrofílicos (BROOKS *et al.*, 2000).

O LPS liga-se à membrana externa por pontes hidrofóbicas. É sintetizado na membrana citoplasmática e transportado para sua posição exterior final, sendo sua presença necessária para a função de muitas proteínas da membrana externa (BROOKS *et al.*, 2000).

Dentro da área médica e veterinária, o LPS é muito utilizado nas mais diferentes linhas de pesquisa, inclusive testado em animais laboratoriais, como roedores. Comercialmente, para estudos toxicológicos, neuroimunológicos, dentre outros, uma das principais fontes do LPS é a bactéria *Escherichia coli*, por meio de um processo de extração fenólica (MIMS *et al.*, 1999).

A administração neonatal de LPS é considerada agente sistêmico estressor. Após a administração neonatal de LPS, o sistema endócrino (SHANKS *et al.*, 1994; SHANKS; MEANEY, 1994) e o imune (LEVINE *et al.*, 1994; PANG *et al.*, 2003; FAN *et al.*, 2005) são ativados. Existem evidências de que a ativação imune ativa o sistema dopaminérgico central. Por exemplo, a administração pré-natal de bactérias (FORTIER *et al.*, 2004) ou viral (ZUCKERMAN *et al.*, 2003) mimetiza o aumento da atividade motora em resposta à anfetamina na idade adulta. Acrescente-se ainda que a administração da interleucina -6 (IL-6) (ZALCMAN *et al.*, 1999) e interleucina-2 (IL-2) (MAGID *et al.*, 2005) potencializa as respostas a agonistas de receptores dopaminérgicos.

Algumas evidências indicam que as citocinas modulam o CM em ratas via sistema dopaminérgico do *núcleo accumbens* (HABR, 2008). Trabalho anterior de nosso laboratório mostrou que a administração de LPS no último dia da gestação modifica o CM de ratas (BERNARDI *et al.*, 2009). Por outro lado, este mesmo

tratamento administrado no 9,5º dia da gravidez não foi capaz de modificá-lo (Bernardi, comunicação pessoal).

1.4. LPS e células gliais

Em células gliais, a administração de LPS pode também induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α a partir de astrócitos (LIEBERMAN *et al.*, 1989; CHUNG; BENVENISTE, 1990).

Os astrócitos, micróglia e neurônios podem liberar óxido nítrico (NO) a partir da estimulação com LPS (MURPHY, 2000). O NO, por sua vez, pode mediar a morte neuronal e tem sido sugerido como potencializador da função imune e da autoimunidade, influenciando, por exemplo, oligodendrócitos em sua vizinhança imediata, e tornando suas bainhas de mielina mais suscetíveis à ação tóxica do TNF- α (MERRILL *et al.*, 1993).

O LPS, liberado da membrana externa de bactérias Gram-negativas durante o choque séptico, é detectado pela micróglia pelo receptor de membrana CD14 (NADEAU; RIVEST, 2000), o que promove produção adicional de IL-1 β e de TNF- α . A IL-1 β , por sua vez, também estimula o aumento da expressão de receptores CD14, sugerindo grande número de alças de *feedback* autócrinas e parácrinas sobre as células da micróglia após estimulação por LPS (FEARNS; LOSKUTOFF, 1997).

A micróglia ameboide responde à injeção intraperitoneal pós-natal de LPS com hipertrofia de seus processos, *up-regulation* de receptores CR3 (receptores para o componente 3 do sistema complemento) e expressão de moléculas MHC (complexo principal de histocompatibilidade) de classe I e II (XU; LING, 1994a,b).

A IL-1 e o TNF- α , ambos provenientes de astrócitos e de células da micróglia frente ao LPS, são reconhecidos como indutores da proliferação astrocitária *in vitro* (MERRILL, 1991, BENVENISTE, 1992). Assim, são capazes de estimular a formação da cicatriz glial *in vivo*, com aumento do número de astrócitos (astrocitose/hiperplasia) e de suas dimensões (astrogliose/hipertrofia), aumentando, inclusive, a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), o mais importante marcador celular da população astrocitária (BIGNAMI; DAHL, 1994).

Adicionalmente, sabe-se que o TNF- α é capaz de causar dano oligodendroglial (MERRILL, 1991; BENVENISTE, 1992), e a micróglia ativada pelo LPS pode induzir perturbação na integridade da barreira hematoencefálica (SUMI *et al.*, 2009).

Por outro lado, a produção astrocitária de IL-6 frente ao LPS revelou exercer efeito protetor sobre neurônios dopaminérgicos, aumentando sua sobrevivência em cultura (LI *et al.*, 2009), com a possibilidade, assim, de potencialmente interferir na iniciação e desenvolvimento do processo de neuroinflamação associado a doenças como esclerose múltipla, doença de Parkinson e doença de Alzheimer. Assim, os astrócitos parecem exercer, paradoxalmente, efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, de acordo com as circunstâncias, e ações muitas vezes neurotóxicas ou neuroprotetoras.

1.5. Justificativa

Vários trabalhos indicam que a redução do cuidado materno promove numerosas alterações que podem persistir nas várias gerações que se seguem (CHAMPAGNE *et al.*, 2008). Neste trabalho investigou-se o CM da prole feminina de ratas cujas mães foram tratadas no 9,5º dia da gestação com 100 μ g/Kg de LPS. Avaliaram-se dois aspectos do CM: o próprio CM e o CMA, sendo que este último denotaria o grau de defesa que tem a fêmea com relação à sua prole frente a um predador. A área do sistema nervoso central submetida a análise imuno-histoquímica, o *núcleo accumbens*, foi escolhida por ser uma das que modulam o CM. A hipótese para explicar os resultados se basearia em mecanismos epigenéticos, pois observações anteriores de nosso grupo mostram que as mães destas ratas não apresentaram alterações no cuidado materno.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O trabalho estudou os efeitos comportamentais na prole feminina de ratas, cujas mães foram tratadas no 9,5º dia de gestação com LPS, avaliando dois aspectos - o comportamento maternal (CM) e o comportamento agressivo maternal (CMA), além de se realizar o estudo imuno-histoquímico da população astrocitária no *núcleo accumbens* do cérebro dessas ratas.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o comportamento maternal de ratas lactantes, cujas mães foram tratadas no 9,5º dia de gestação com 100 µg/Kg de LPS;
- Avaliar a atividade geral em campo aberto de ratas lactantes;
- Avaliar o comportamento agressivo maternal (CAM) em ratas lactantes;
- Avaliar a marcação imuno-histoquímica da GFAP (proteína glial fibrilar ácida) astrocitária no *núcleo accumbens* dessas ratas.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1.Animais, acasalamento e tratamento

Foram utilizados ratos Wistar adultos (90 dias), mantidos no biotério Multidisciplinar de Pesquisas da Universidade Paulista (UNIP) e oriundos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). As ratas foram acasaladas com machos, e o dia de gestação (GD) 0 foi definido pela presença de espermatozoides no lavado vaginal. Essas fêmeas gestantes foram mantidas isoladas em gaiolas de polipropileno, em sala com temperatura, umidade e ciclo de luz controlados, com acesso liberado a água e alimento. As ratas foram tratadas com solução salina ou LPS de *E. coli* (sorotipo 0127:B8, Sigma), por via intraperitoneal (ip), no GD 9,5 na dose de 100 µg/kg. O parto foi ao natural, e os filhotes permaneceram (4 machos e 4 fêmeas por ninhada) com suas mães até o desmame no dia de vida pós-natal 21. Na idade adulta, as fêmeas dessas proles foram cruzadas e utilizadas nos experimentos do trabalho.

3.2.Avaliação do CM em ratas lactantes

O teste comportamental foi realizado no 6º dia de lactação durante a fase clara do ciclo de luz, entre 7h e 12h. Inicialmente, foi anotada a posição dos filhotes e da mãe na gaiola moradia, aproximadamente às 7h. De acordo com a apresentação, foi classificado com presença ou ausência de formação do ninho na gaiola moradia. Logo após, a ninhada foi retirada da gaiola, sendo colocada em outra gaiola sem maravalha, e onde permaneceu por uma hora. Após esse período, 8 filhotes foram colocados na gaiola, divididos em quadrantes, e o CM foi observado por 30 minutos, e depois checado por 45 e 60 minutos.

A observação do CM foi realizada medindo-se:

- Latência em segundos para buscar o primeiro filhote;

- Porcentagem de mães que buscaram o primeiro filhote;
- Latência (em segundos) para buscar cada um dos filhotes;
- Porcentagem de ratas que buscaram todos os filhotes em 30 minutos;
- Latência (em segundos) para agrupar esses filhotes dentro do ninho;
- Porcentagem de mães que agruparam todos os filhotes;
- Latência (em segundos) para a rata ficar sobre a ninhada em posição apropriada à amamentação (cifose);
- Latência (em segundos) para o CM total (CMT), o que significa ficar em posição de amamentação sobre o filhote por, pelo menos, 2 minutos consecutivos;
- Frequência de limpeza de filhotes pela mãe;
- Frequência de autolimpeza da mãe;
- Escore de ninho: ausência de ninho - escore 0; ninho mal definido - escore 1; ninho regular - escore 2; ninho bem definido - escore 3.
- Escore de agrupamento total dos filhotes, que foi estabelecido da seguinte maneira: escore 7 (todos os filhotes agrupados nos primeiros 5 minutos do início do CM); escore 6 (todos os filhotes agrupados entre 5 e 10 minutos do início do CM); escore 5 (todos os filhotes agrupados entre 10 e 15 minutos do início do CM); escore 4 (todos os filhotes agrupados entre 15 e 20 minutos do início do CM); escore 3 (todos os filhotes agrupados entre 20 e 25 minutos do início do CM); escore 2 (todos os filhotes agrupados entre 25 e 30 minutos do início do CM); escore 1 (não agrupamento total dos filhotes).

3.3. Avaliação da atividade geral em campo aberto de ratas lactantes

Este teste comportamental foi realizado no 5º dia de lactação, durante a fase clara do ciclo de luz, entre 13h e 17h, no Departamento de Patologia da FMVZ da USP. Intercalaram-se os animais dos grupos controle e experimental para evitar possíveis interferências do ciclo circadiano sobre o resultado. O aparato é construído segundo Broadhurst (1960), para observação da atividade geral dos animais. Este campo aberto é constituído de arena circular, com 97 centímetros de diâmetro, por

32,5 centímetros de altura, pintado em cinza escuro fosco (Figura 2) e subdividido virtualmente pelo sistema computadorizado EthoVision®.



Figura 9 - Arena de campo aberto utilizada para a observação da atividade geral individual dos filhotes no dia pós-natal (PND) 60 por uma sessão de 5 minutos. A arena foi subdividida virtualmente pelo sistema computadorizado EthoVision®.

O animal foi colocado individualmente no centro da arena e observado por um período de 5 minutos, com o ambiente sempre previamente limpo com álcool 5%, eliminando possíveis odores deixados por outros animais.

Os parâmetros observados e calculados automaticamente pelo EthoVision® foram:

Distância percorrida (cm): é a distância que o animal percorreu, em centímetros, pela arena de campo aberto, calculada pela somatória das distâncias medidas em linha reta, movidas pelo animal entre duas amostras consecutivas.

Velocidade média: é a velocidade média que o animal imprime em centímetros por segundo na arena do campo aberto.

Frequência de movimentos: número de movimentos executados em toda a sessão de observação.

Duração de movimentos: tempo médio em segundos que o animal apresentou movimentos.

Tempo de levantar: tempo em segundos em que o animal permaneceu apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, podendo ou não tocar com as patas anteriores as paredes do campo aberto.

Frequência de levantar: número de vezes que o animal apresenta postura de permanecer apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, podendo ou não tocar com as patas anteriores as paredes do campo aberto.

Tempo de autolimpeza: tempo em segundos do ato de lamber ou coçar os próprios pelos, membros e/ou região genital.

Frequência de autolimpeza: número de vezes que o animal permaneceu se lambendo ou coçando os próprios pelos, membros e/ou região genital.

3.4. Sistema de observação computadorizada - EthoVision®

Para as análises comportamentais, foi utilizado o EthoVision®, que é sistema de rastreamento em vídeo, de análise de movimento e reconhecimento comportamental (NOLDUS, 1997). Este sistema de observação indireta engloba um software EthoVision® – Video Tracking, Motion & Behavior Recognition System – versão 1.90 (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA), uma câmera filmadora (CCD-Iris Color Sony), monitor de vídeo (Sony) disposta dentro de uma sala reservada para o experimento, com iluminação difusa e sem qualquer ruído. Esta câmera está conectada a um microcomputador (Pentium 133, 16MB de memória RAM, 1,2 gB de disco rígido) com placa de captura de vídeo (TARGA + Truevision,n 2D NTSC), monitor SVGA, teclado e mouse, além de cabos e conectores localizado fora da sala (Figura 3).

As imagens recebidas pela câmera filmadora foram digitalizadas na placa de captura, e o programa gerou coordenadas espaciais (x e y) do centro de gravidade do animal em intervalos de tempo determinados, segundo taxa de amostragem de 6,67 amostras por segundo (ou seja, registra a localização do animal a cada 0,15 segundos). Essas coordenadas foram geradas pelo método de subtração das imagens do animal branco na arena escura (o campo aberto, no caso).

As imagens capturadas foram digitalizadas e analisadas pelo software. Os resultados foram exportados na forma de um arquivo “txt” (extensão de arquivo texto), e serão abertos na planilha do programa Microsoft Excel® 7.0.

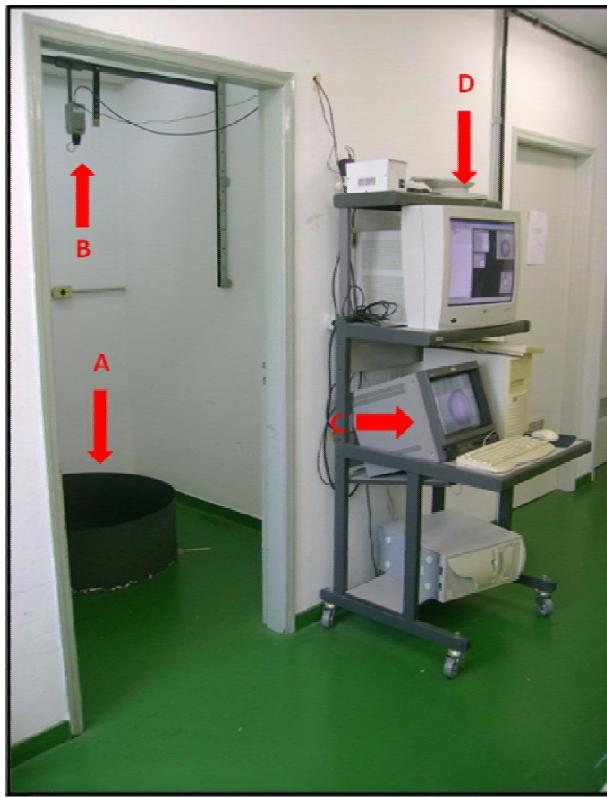


Figura 10 - Sistema de observação computadorizada EthoVision®. A: arena de campo aberto; B: câmera para captação das imagens; C: monitor de vídeo ligado ao computador; D: imagem digitalizada representada em pixels. O mesmo programa rastreia e analisa o comportamento animal.

3.5. Avaliação do comportamento agressivo maternal (CAM) em ratas lactantes

Este experimento foi feito no dia 6 da lactação, entre as 8h e 12h, durante a fase clara do ciclo de luz. Para tanto, foi introduzido na gaiola moradia das fêmeas, no lado oposto daquele das fêmeas, um rato macho de tamanho menor que a fêmea, denominado de *rato intruso*. A sessão de observação durou 10 minutos, e nesse período foram anotados os seguintes parâmetros:

- Latência (em segundos) para o primeiro ataque da fêmea em direção ao macho;
- Frequência de ataques da fêmea em direção ao macho;
- Duração dos ataques em segundos da fêmea em direção ao macho;
- Frequência de boxear;
- Duração de boxear em segundos;

- Frequência de recolher os filhotes;
- Frequência de esconder os filhotes;
- Frequência do intruso de farejar os filhotes;
- Porcentagem de filhotes no ninho ao final da observação.

3.6. Marcação imuno-histoquímica da Proteína Glial Fibrilar Àcida (GFAP)

Foram retirados os encéfalos das fêmeas dos grupos experimental e controle submetidas a estudos comportamentais, sendo os mesmos colocados em solução de formol a 10% em tampão fosfato de Sorensen (pH neutro), onde permaneceram por cerca de 3 dias. A seguir, foi realizada secção frontal do telencéfalo na altura do *núcleo accumbens*, entre o putâmen e a cabeça do núcleo caudado (área também denominada corpo estriado ventral), e cada amostra foi processada para posterior desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Cortes transversais de 5 µm da região escolhida foram obtidos, montados em lâminas histológicas e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE).

Cortes histológicos foram colhidos em lâminas silanizadas (Starfrost®-Objektträger, Medite Medizintechnik) para submissão à marcação imuno-histoquímica da GFAP, segundo o método indireto do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) (HSU *et al.*, 1981). A prova imuno-histoquímica foi realizada seguindo o protocolo utilizado por BONDAN *et al.* (2003):

Desparafinização e hidratação: os cortes colhidos em lâminas silanizadas foram submetidos à desparafinização em xanol e à hidratação em uma sequência de etanol absoluto, etanol a 95%, etanol a 70% e água destilada.

Bloqueio da peroxidase endógena: apesar de a maioria das enzimas endógenas ser destruída durante o processo de fixação do material, algumas enzimas presentes no tecido experimental podem reagir ao processo, formando produtos que também são marcados durante a prova imuno-histoquímica. Para prevenir a marcação inespecífica dos tecidos, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena. Desta forma, após a hidratação, os cortes foram banhados por 30 minutos em solução contendo 3% de peróxido de hidrogênio e 10% de metanol.

Posteriormente foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4), diluída 1:10 em água destilada.

Recuperação antigênica: a recuperação antigênica, preparando as fibras gliais (mascaradas pelos processos de fixação e parafinização) para ligação com anticorpos específicos, foi efetuada pelo método de irradiação por micro-ondas em amostras imersas em solução ácida. Para tal, as lâminas com os cortes aderidos foram imersas em tampão citrato 0,01M (ácido cítrico 0,01M e citrato de sódio 0,01M, em água destilada, 1:3, pH 6,0) e submetidas a três fervuras, de cinco minutos cada uma, em forno de micro-ondas convencional (potência máxima). Posteriormente, as lâminas foram resfriadas por 20 minutos e lavadas em PBS.

Incubação com anticorpo primário: todos os cortes foram incubados em câmara úmida, a 4º C, por 24 horas, com 200 µl de anticorpo primário policlonal anti-GFAP (Rabbit anti-cow GFAP, code number ZO334, DAKO), padronizado na diluição 1:1000, que, por titulação prévia, foi considerada a mais adequada (BONDAN *et al.*, 1993). Para a diluição foi utilizada solução contendo soro-albumina bovina a 5% em água destilada (1,25 ml), azida sódica a 5% em água destilada (2,5 ml) e PBS (59 ml). As lâminas foram, então, lavadas em PBS e submetidas a incubação com o anticorpo secundário.

Incubação com anticorpo secundário: os cortes foram incubados, durante uma hora, em câmara úmida, a 4º C, com 200 µl do anticorpo secundário biotinilado anti-imunoglobulinas de coelho e anti-imunoglobulinas de camundongo (Novostain Super ABC Kit, Novocastra) na diluição 1:100 em PBS. Após a lavagem das lâminas em PBS, 200 µl do conjugado estreptavidina-biotina-peroxidase (Novostain Super ABC Kit, Novocastra), diluído 1:100 em PBS, foram aplicados sobre as lâminas, as quais permaneceram por mais uma hora incubadas em câmara úmida a 4º C.

Revelação: após a lavagem das lâminas com PBS, aplicaram-se sobre os cortes 200µl de solução substrato-cromógeno (Sistema Substrato-Cromógeno-DAB+ Líquido DakoCytomation®), DAKO, constituída de 20 µl de cromógeno DAB (3,3' – diaminobenzidina em solução de cromógeno) e 1 ml de substrato tamponado (tampão HCl-imidazol, pH 7,5, contendo peróxido de hidrogênio), preparada imediatamente antes do uso. A reação da peroxidase forma um precipitado castanho visível à microscopia de luz, que corresponde à revelação dos抗ígenos. Os cortes foram lavados em água destilada e contracorados com hematoxilina por 30 segundos.

Desidratação: após as reações de coloração, as lâminas foram submetidas a desidratação em uma bateria de álcoois (etanol a 70%, etanol a 95% e etanol absoluto) e a diafanização em xanol, sendo posteriormente montadas com resina sintética sob lamínula.

Todas as reações foram acompanhadas por lâminas de controle negativo, que foram submetidas a todas as etapas do procedimento, com exceção da aplicação do anticorpo primário.

3.7. Interpretação imuno-histoquímica

Avaliação dos cortes em microscopia de luz: todos os cortes submetidos à prova imuno-histoquímica foram analisados, em microscopia de luz (com objetiva de 10x), para identificação e avaliação da distribuição e do comportamento morfológico das células marcadas para GFAP (coradas em castanho), comparando-se também tais observações com as obtidas na leitura das lâminas coradas por HE. Áreas de $302.952,5 \mu\text{m}^2$ do *núcleo accumbens* dos animais dos grupos experimental e controle, foram selecionadas para análise e comparação.

Quantificação da reatividade astrocitária: como a reatividade astrocitária se expressa com o aumento do nível de fibrilas gliais no interior dos astrócitos, tal processo foi determinado por colorimetria, quantificando, em μm^2 , a área corada em castanho contida em área total de $302.952,5 \mu\text{m}^2$. Para tal, utilizou-se um sistema computacional de análise de imagens, o Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA), considerado um eficiente sistema de quantificação de elementos marcados por reação imuno-histoquímica. Os resultados numéricos obtidos no software foram submetidos a análise estatística.

3.8.Delineamento experimental

Experimento 1: efeitos da administração de LPS no CM de ratas cujas mães receberam no 9,5º dia da gestação a mesma endotoxina.

Quatorze ratas provenientes de ratas que receberam no 9,5º dia da gestação 100 µg/Kg de LPS (7 ratas) ou seu veículo (7 ratas) foram cruzadas com machos sem qualquer tratamento e experientes sexualmente. No 6º dia da lactação, observou-se seu CM como descrito.

Experimento 2: efeitos da administração de LPS na atividade geral de ratas lactantes cujas mães receberam no 9,5º dia da gestação a mesma endotoxina.

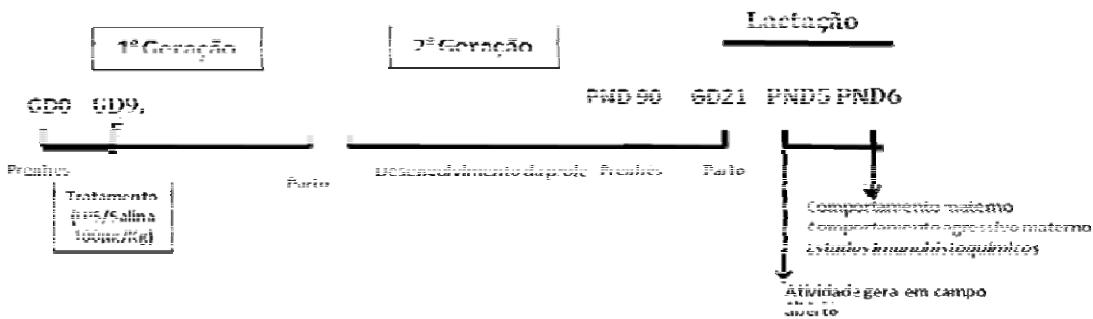
Vinte e quatro ratas provenientes de ratas que receberam no 9,5º dia da gestação 100 µg/Kg de LPS (12 ratas) ou seu veículo (12 ratas) foram cruzadas com machos sem qualquer tratamento e experientes sexualmente. No 5º dia da lactação, observou-se como descrito sua atividade geral em campo aberto.

Experimento 3: efeitos da administração de LPS no comportamento agressivo maternal de ratas cujas mães receberam no 9,5º dia da gestação a mesma endotoxina.

Vinte e quatro ratas provenientes de ratas que receberam no 9,5º da gestação 100 µg/Kg de LPS (12 ratas) ou seu veículo (12 ratas) foram cruzadas com machos sem qualquer tratamento e experientes sexualmente. No 6º dia da lactação, observou-se seu comportamento agressivo maternal como descrito.

Experimento 4: estudo imuno-histoquímico da expressão de GFAP no *núcleo accumbens* do cérebro de ratas cujas mães receberam no 9,5º dia da gestação o LPS.

Até duas horas após o CM (experimento1), os encéfalos das fêmeas dos grupos controle e experimental foram retirados e utilizados para o estudo imuno-histoquímico como descrito.



Esquema 1 - Delineamento experimental

Análise estatística: nos experimentos comportamentais, para verificar se as distribuições seguiam ou não a distribuição normal, empregou-se o teste de Bartlet. Como foi constatada a normalidade dos dados do CM, exceto para os valores em escores e de porcentagem, foi aplicado o teste estatístico t – de Student para dados não pareados. Os dados de escores, por não serem paramétricos, foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney, enquanto as porcentagens foram analisadas pelo teste do qui-quadrado.

Na análise da expressão de GFAP nos astrócitos do *núcleo accumbens*, a fim de se verificar se as observações mensuradas seguiam ou poderiam ser aproximadas da distribuição normal, empregou-se a prova estatística de Shapiro-Wilk, seguida da inspeção do gráfico de quantis (qq-plot). Posteriormente, métodos não paramétricos foram utilizados na análise estatística da amostragem, sendo a mediana utilizada como estimador da medida de posição e o intervalo interquartil – diferença entre os valores dos percentis 75 e 25 – empregado como estimador da medida de dispersão. Na análise da imunorreatividade para a GFAP na região escolhida, empregaram-se as provas estatísticas de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis. A significância estatística para todas as provas foi aceita em $\alpha \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Experimento 1: CM de ratas cujas mães receberam no 9,5º dia da gestação 100 µg/Kg de LPS.

A figura 11 ilustra os resultados das latências para recolher os filhotes de ratas do grupo controle e do grupo experimental. A análise estatística mostrou que as fêmeas do grupo experimental apresentaram maior latência para recolher os filhotes a partir do quarto filhote ($p < 0,05$).

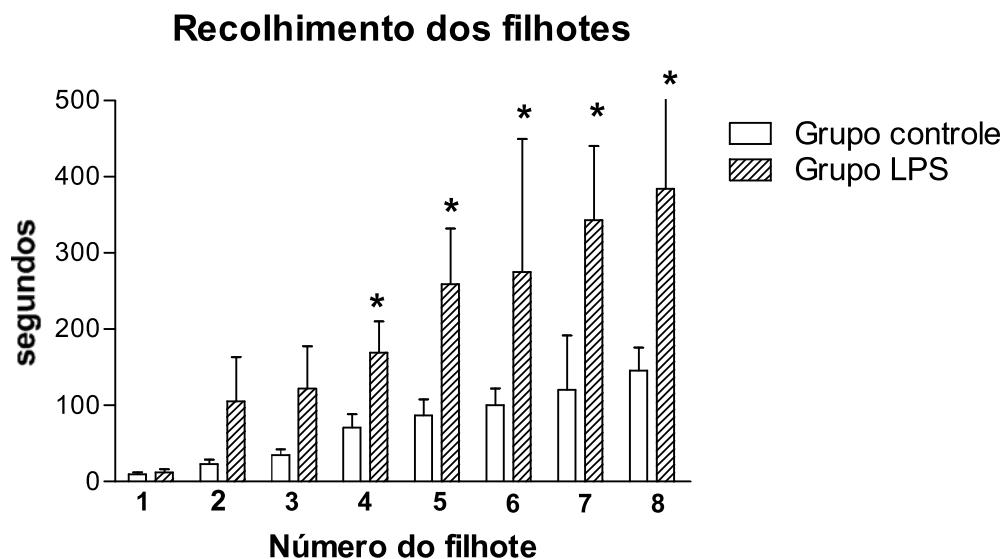


Figura 11 - Latência para recolher os filhotes de ratas cujas mães receberam no 9,5º dia da gestação 100 µg/Kg de LPS ou o veículo do LPS. São apresentados médias e respectivos erros-padrão. N= 7 ratas/grupo * $p < 0,05$ em relação aos animais do grupo controle (teste t de Student).

A tabela 1 mostra os resultados dos demais parâmetros do CM dessas ratas. Assim, verifica-se que a latência para recolher todos os filhotes foi显著mente maior nos animais do grupo experimental em relação àqueles do grupo controle. Este mesmo achado foi observado para a latência para o CM total. Os demais parâmetros não apresentaram diferenças significantes entre os dois grupos.

Tabela 1 - Parâmetros do CM de ratas cujas mães receberam no 9,5 dia da gestação 100 µg/Kg de LPS ou o veículo do LPS. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrão. N= 7 ratas/grupo * p< 0,05 em relação aos animais do grupo controle.

Parâmetros	Grupo controle	Grupo LPS	P
Latência para recolher 1º filhote	9,75±3,91	11,77±4,35	0,414
% de fêmeas que recolheram o 1º filhote	100	100	-
Latência para recolher todos filhotes (s)	146,19±29,23	384,40±116,01*	0,042
% de fêmeas que recolheram todos os filhotes	100	71,43	0,461
Latência para agrupamento de todos os filhotes	286,20±69,72	1.381,20±2.795,80	0,0720
Escore de agrupamento dos filhotes	6,57±0,29	5,14±0,73	0,097
% de fêmeas que agruparam os filhotes	100	71,43	0,461
Latência para CM total	762,00±171,00	1656,60±48,00*	0,006
% de fêmeas que apresentaram cifose e CM total	100	71,43	0,461
Frequência de autolimpeza	10,29±3,97	16,50±2,71	0,216
Frequência de limpeza dos filhotes	34,86±6,13	33,43±4,11	0,850
Escore do ninho	2,29±0,18	1,71±0,29	0,119

As latências e frequências foram analisadas pelo teste t de Student; as porcentagens foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado; os escores foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney.

Experimento 2: efeitos da administração de LPS na atividade geral de ratas lactantes cujas mães receberam no 9,5º dia da gestação a mesma endotoxina.

A figura 12 ilustra os resultados obtidos para a atividade geral de ratas, observadas no 5º dia de lactação, cujas mães foram tratadas no 9,5º dia da gestação com o LPS ou seu veículo. A análise estatística não mostrou diferenças significantes entre os grupos.

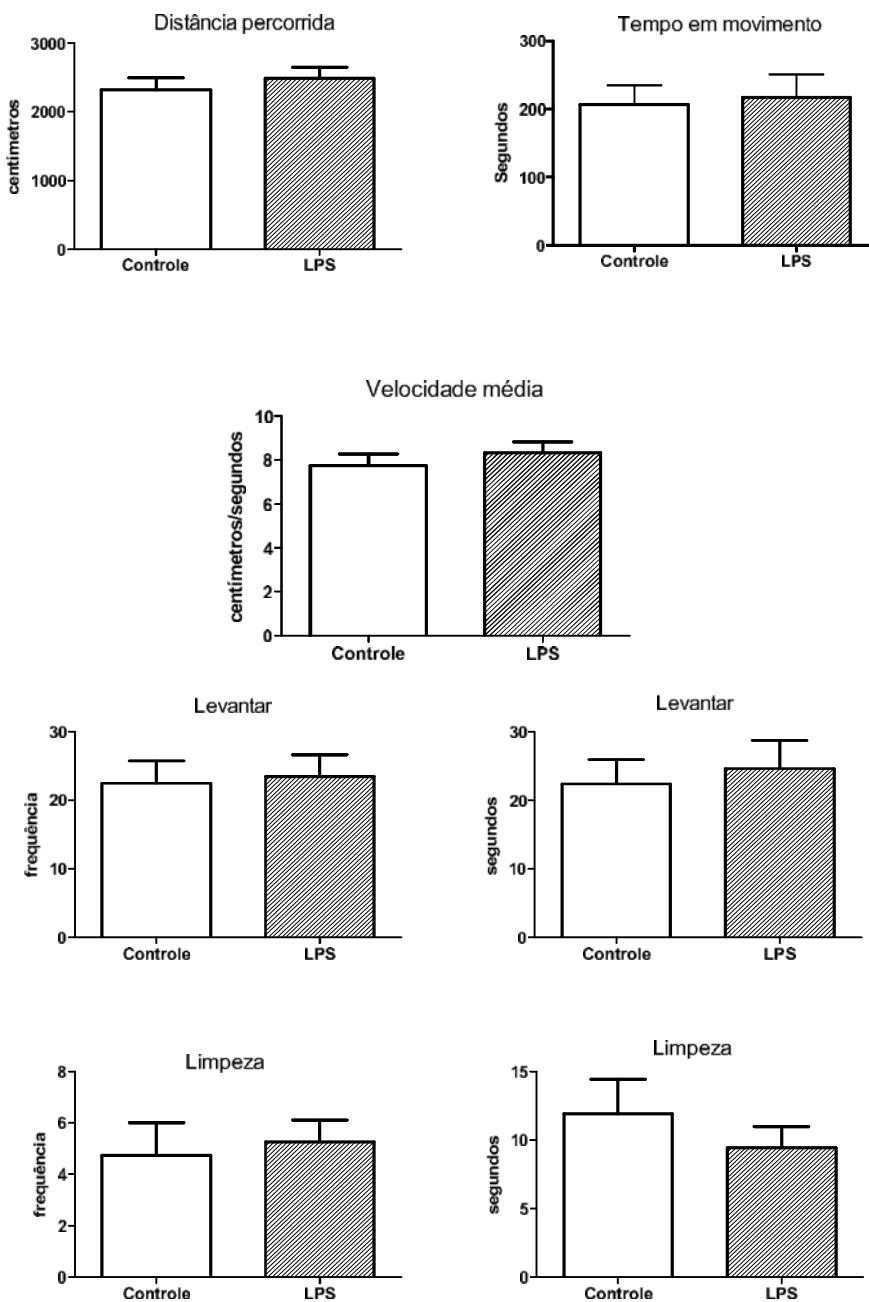


Figura 12 - Atividade geral de ratas, observadas no 5º dia de lactação, cujas mães foram tratadas no 9,5º dia da gestação com o LPS ou seu veículo. n = 12/grupo. Teste t de Student.

Experimento 3: efeitos da administração de LPS no CMA de ratas cujas mães receberam no 9,5º dia da gestação a endotoxina.

A tabela 2 mostra os resultados obtidos no teste de comportamento maternal agressivo de ratas cujas mães receberam no 9,5º dia da gestação a endotoxina. O teste t de Student indicou que a latência para o primeiro ataque de ratas do grupo experimental foi显著mente maior que daqueles animais do grupo controle. Por outro lado, este grupo apresentou frequências e tempos de ataque ao intruso

significamente menores em relação aos animais do grupo controle. Ao final dos experimentos, a porcentagem de filhotes no ninho era menor nos animais do grupo experimental em relação àqueles do grupo controle. Os demais parâmetros não foram diferentes entre os grupos, porém notou-se tendência à redução no tempo de boxear nos animais do grupo experimental.

Tabela 2. Comportamento agressivo maternal de ratas cujas mães receberam no 9,5º dia da gestação a endotoxina. N=12/grupo.

Parâmetros	Grupo controle	Grupo LPS	P
Latência para 1º ataque	80,75±12,24	178,67±23,71**	0,0013
Frequência de ataques	15,0±2,7	4,6±0,59**	0,0011
Tempo de ataque(s)	12,0±2,5	2,7±0,81**	0,0036
Freqüência de boxear	7,2±1,6	5,0±0,87	0,2442
Tempo de boxear	2,0±0,47	0,97±0,16	0,0581
Freqüência de recolher os filhotes	3,9±1,2	3,2±0,74	0,6099
Freqüência de esconder os filhotes	4,2±1,0	2,1±0,58	0,0910
Freqüência de o intruso farejar os filhotes	0,91±0,34	2,2±0,63	0,0911
% se filhotes no ninho	82	54**	0,0001

**diferença estatisticamente significante em relação aos animais do grupo controle (teste t de Student). As porcentagens foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado.

Experimento 4: estudo imuno-histoquímico do *núcleo accumbens* do cérebro de ratas cujas mães receberam no 9,5º dia da gestação o LPS.

A análise dos cortes marcados para GFAP, tanto dos animais experimentais quanto dos animais controle, foi realizada em microscopia de luz, avaliando-se a distribuição e o comportamento morfológico das células positivas para GFAP. Foram consideradas como positivas para a proteína as células cujo citoplasma apresentou-se corado em marrom intenso.

As áreas (em μm^2) de expressão de GFAP no *núcleo accumbens*, apresentadas na forma de mediana (intervalo interquartil), para os animais dos grupos experimental e controle foram, respectivamente, 6673,43 (12543,22) e 7113,31 (13425,30), não sendo verificada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos pela análise estatística realizada.

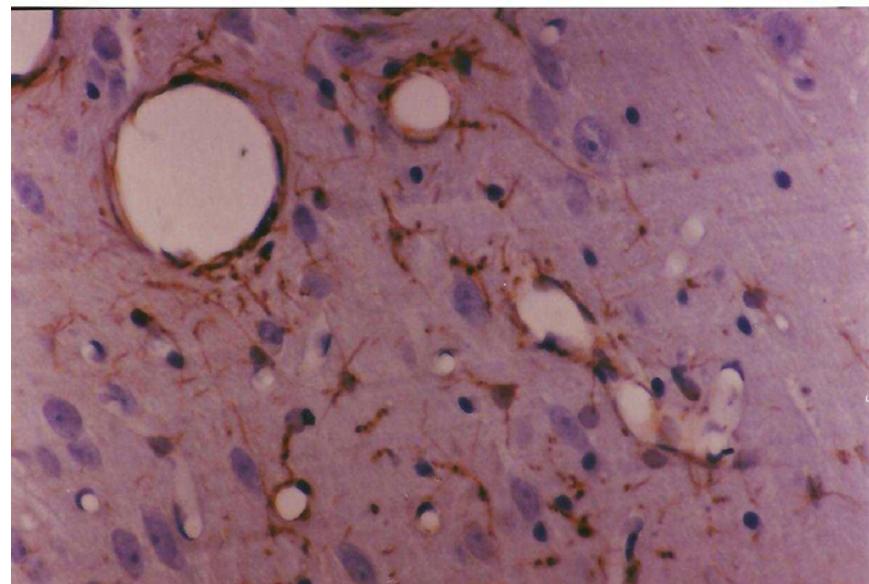


Figura 13 - Astrócitos imunorreativos para GFAP no núcleo accumbens. Grupo controle. Obj. 40x.

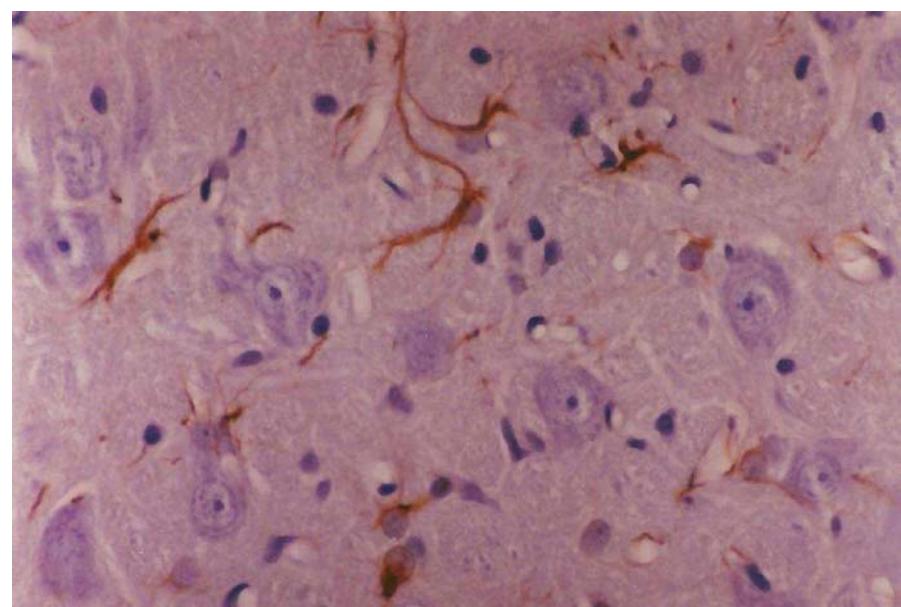


Figura 14 - Astrócitos imunorreativos para GFAP no núcleo accumbens. Grupo experimental. Obj. 40x.

5. DISCUSSÃO

A administração de LPS a ratas no GD 9,5 promoveu alterações no comportamento de sua prole feminina. Foram verificados no CM e em relação às ratas do grupo controle: 1) aumento na latência para busca dos filhotes a partir do quarto filhote; 2) aumento na latência para busca de todos filhotes; 3) maior latência para apresentar o CM total. No CMA, verificaram-se, em relação às ratas do grupo controle: 1) maior latência para o primeiro ataque; 2) menor frequência de ataques; 3) menor duração dos ataques; e 4) menor porcentagem de filhotes no ninho ao final do experimento. Estes resultados, sem dúvida, apontam para um prejuízo no CM das ratas cujas mães receberam o LPS.

Desde que as alterações mais claras no CM foram aquelas referentes à busca dos filhotes, e que o prejuízo neste parâmetro reflete a motivação no CM (NUMAN, 2007), os estudos imuno-histoquímicos foram feitos no núcleo *accumbens*, pois, segundo a literatura, esta é a área mais importante na motivação do CM (HANSEN, 1994). Não houve diferença entre os grupos quanto à expressão, no *núcleo accumbens*, do mais importante marcador da população astrocitária - a proteína glial fibrilar ácida (ou GFAP), não havendo, dessa forma, qualquer indício de que a resposta imune desencadeada pelo LPS durante a gestação tenha induzido alterações morfológicas e funcionais detectáveis na população de astrócitos da região estudada. Muito embora se saiba que a administração de LPS possa induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF- α , a partir de astrócitos, e estimular a formação de cicatriz glial *in vivo* (LIEBERMAN *et al.*, 1989; CHUNG; BENVENISTE, 1990), não houve evidência de aumento do número de astrócitos (astrocitose) ou de suas dimensões (astrogliose) no *núcleo accumbens*, importante área no controle do comportamento materno (SLOTNICK, 1967; TERLECKI; SAINBURY, 1978), tanto nas filhas de ratas injetadas prenatalmente com LPS quanto naquelas injetadas com solução salina.

O CM requer participação ativa da rata, a qual recolhe seus filhotes de volta ao ninho quando os mesmos se afastam deles, agrupam-nos, ficam sobre eles e os lambem. Os estímulos desses comportamentos dependem das vocalizações dos filhotes, de sua movimentação e de pistas olfatórias (NUMAN, 1999, NUMAN; STOLZENBERG, 2009). Desta forma, a fêmea garante que sua prole ataque seu mamilo e o sugue. Dados da literatura mostram que esses comportamentos são

motivados, e diversos experimentos comprovam a afirmação. Verifica-se que fêmeas lactantes apresentam melhor desempenho que as não lactantes em modelos de labirinto, em testes de aprendizado, ou mesmo quando administrados choques para manter contato ou recolher sua prole (NUMAN, 2007; BRIDGES *et al.*, 1972).

Os presentes resultados mostraram que as ratas cujas mães foram tratadas com LPS no GD 9,5 apresentaram maior latência total para recolher e agrupar os filhotes. Além disto, a latência para recolher os filhotes foi显著mente menor a partir do quarto filhote, enquanto o início do CM não foi alterado, mas a sua manutenção foi prejudicada.

Por outro lado, os parâmetros ditos consumatórios do CM não foram alterados nessas ratas. KEER e STERN (1999) mostram que a administração de microinjeções de flupentixol, um antagonista de receptores dopaminérgicos D1 e D2, na região shell do *núcleo accumbens*, prejudica o recolher e o lamber dos filhotes, mas aumenta o comportamento de amamentar de ratas lactantes. Esses achados envolvem o sistema dopaminérgico dessa área com o componente apetitivo do CM.

No mesmo sentido, HABR (2008) mostrou que a IL-2 modula a transmissão dopaminérgica no *núcleo accumbens*, área envolvida com o controle do CM. Nesse caso, as doses empregadas não interferiram com a função motora, mas com a motivação materna, pois aumentou a latência para a busca dos filhotes e aumentou o CMA. Tanto a administração sistêmica como a local desta interleucina reduziu os níveis do metabólito da dopamina nessa área (HABR, 2008), sugerindo papel da dopamina extracelular.

No entanto, embora se tenha observado redução na busca dos filhotes, neste trabalho não foi detectada alteração nos componentes consumatórios do CM, ou seja, todas as fêmeas apresentaram CM total e cifose.

Desta forma, sugere-se que as fêmeas cujas mães foram tratadas com o LPS apresentaram menor motivação no CM que aquelas do grupo controle.

Um modelo para o estudo do comportamento agressivo é o CMA de fêmeas, um tipo de agressão com componente importante de medo. Diferentemente dos machos, o CMA de ratas fêmeas lactantes comprehende, além do padrão ofensivo, o padrão defensivo. Em ratas lactantes, nos primeiros dez dias da lactação, observam-se altos níveis de comportamento agressivo contra o intruso, macho ou fêmea, reduzindo-se gradativamente após esse período (GIOVENARDI *et al.*, 1998).

Existem consideráveis evidências de que a administração perinatal de LPS promove efeitos persistentes no desenvolvimento e no comportamento da prole de ratos. O presente estudo revelou que a exposição à endotoxina bacteriana na vida prenatal prejudicou o desempenho do comportamento maternal agressivo da prole feminina na idade adulta. O fato refletiu-se pela menor frequência de ataques e maior latência para os ataques e para o primeiro ataque ao macho intruso. Verificou-se ainda redução no tempo de boxear destas fêmeas em direção ao intruso. Além disto, as fêmeas tratadas prenatalmente com LPS esconderam menos seus filhotes, e permitiram que o intruso farejasse mais tempo a sua prole.

O quadro mostra que a inflamação materna prenatal promoveu profundas alterações no cuidado materno quando eles estão expostos a um possível predador, o rato intruso.

O CMA depende da ativação de diferentes sistemas de neurotransmissão, e de diferentes áreas cerebrais interligadas entre si (para revisão ver NUMAN; STOLZENBERG, 2009). A dopamina (KEER; STERN, 1989; STOLZENBERG *et al.*, 2007), o GABA (ARRATI *et al.*, 2005), a serotonina (OLIVIER; MOS, 1992), a ocitocina (FAHRBACH *et al.*, 1985), a vasopressina (NUMAN; STOLZENBERG, 2009), o sistema opioide (TEODOROV *et al.*, 2008) e a prolactina (TERKEL *et al.*, 1979; BRIDGES; RONSHEIM, 1990) modulam o CMA. As áreas centrais mais relevantes no controle do CMA e que têm íntima relação entre si são a área pré-optica medial, o *núcleo accumbens*, a área tegmental ventral e a amígdala (NUMAN; STOLZENBERG, 2009).

Como dito, a dopamina, por meio dos receptores D1 e D2, é um dos mais importantes neurotransmissores que controlam o CM (BYRNES *et al.*, 2002). Antagonistas dopaminérgicos em doses que não afetam a atividade motora reduzem o CM (SILVA *et al.*, 2001, 2003). O fato ocorreu nos presentes experimentos, pois a atividade geral das fêmeas não foi modificada quando de sua observação em campo aberto. Desta forma, afirma-se que as alterações no desempenho motor não foram a causa da redução observada no CM.

A ativação imune em períodos precoces da vida intrauterina ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), resultando em liberação de corticosterona (NAKANO *et al.*, 1987; ENGELAND *et al.*, 2006). Portanto, o LPS é considerado um estressor sistêmico. Existem evidências de que a ativação imune altera o sistema dopaminérgico, por exemplo, a administração prenatal de bactérias (FORTIER *et al.*,

2004) ou vírus (ZUCKERMAN *et al.*, 2003) mimetiza o aumento da atividade motora em resposta à anfetamina administrada na idade adulta. Além disto, a administração de citocinas, como interleucina-6 (ZALCMAN *et al.*, 1999) e interleucina-2 (MAGID *et al.*, 2005), potencializa as respostas de agonistas dopaminérgicos.

Portanto, a redução no CMA observada em fêmeas cujas mães foram tratadas no período prenatal com LPS pode ser consequência do estresse produzido pela endotoxina, o qual reduziu os níveis de dopamina na prole feminina destas ratas e, portanto, o CMA.

O estresse durante a gestação e no período de periparto aumenta o risco de distúrbio do humor na prole na vida adulta dos filhotes (O'HARA; SWAIN, 1996; KOFMAN, 2002). Dado importante é que as respostas fisiológicas à exposição ao estresse na gestação e lactação são significantemente atenuadas, em humanos e em animais (STERN *et al.*, 1973; NEUMANN *et al.*, 1998; 2002; LUCASSEN *et al.*, 2009; RUSSELL *et al.*, 1999; LIGHTMAN *et al.*, 2001; KAMMERER *et al.*, 2002; DE WEERTH; BUITELAAR, 2005). Acredita-se que essas adaptações visam proteger os fetos da exposição excessiva aos glicocorticoides (WELBERG; SECKI, 2001). Além disto, os esteroides gonadais são reguladores importantes da atividade do eixo HPA e da liberação do hormônio hipotalâmico liberador de corticotrofina (KIRSCHBAUM *et al.*, 1999; YOUNG *et al.*, 2001). Portanto, a atenuação dos circuitos centrais relacionados ao estresse seria importante para o bem-estar da mãe, evitando flutuações dramáticas de esteroides circulantes.

Este trabalho mostrou que a administração de uma endotoxina no 9,5º dia da gestação promove alterações no cuidado materno e no CMA frente a um intruso. A fêmea reduz os cuidados com a prole e também seus mecanismos de defesa dos filhotes, provavelmente em razão de ter sido exposta durante seu desenvolvimento às citocinas liberadas intraútero. Os resultados podem ter implicações evolucionárias ligadas a alterações epigenéticas que explicam a transmissão transgeracional de agressões ambientais. Um dado importante é que o LPS administrado no mesmo dia da gestação e na mesma dose não foi capaz de alterar o CM das mães das ratas (Bernardi, comunicação pessoal), reforçando ainda este último aspecto.

O termo epigenética refere-se a todas as mudanças reversíveis e herdáveis no genoma funcional que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA (KROLL, 2004; LIU; FREEDMAN, 2005; MOORE, 2005; TUSIE-LUNA, 2005; GARG, 2006; SOUSSI *et al.*, 2006). Champagne *et al.* (2006) definiram epigenética como a soma

de fatores genéticos e não genéticos agindo sobre células a fim de seletivamente controlar a expressão gênica que produz uma complexidade fenotípica crescente durante o desenvolvimento. Logo, seu estudo está direcionado para compreender de que maneira padrões de expressão são transmitidos aos descendentes, como ocorre a mudança de expressão espaço-temporal de genes durante a diferenciação de um tipo de célula, e como fatores ambientais podem modificar a expressão de genes.

Basicamente, os mecanismos principais de alterações epigenéticas são: (1) metilação do DNA; (2) modificações de histonas; e (3) ação de RNAs não codificadores. Os padrões de metilação de DNA são os mais conhecidos desses três mecanismos, embora modificações de histonas também sejam bastante discutidas (RAKYAN *et al.*, 2002; ANWAY *et al.*, 2005).

Segundo TANG; HO (2007), a metilação do DNA está relacionada normalmente ao silenciamento de genes. As modificações de histonas mais bem estudadas são as acetilações, fosforilações e ubiquitinações, formando o que se denomina código de histonas, determinando a conformação da cromatina. Já a ação de RNAs não codificadores está relacionada ao silenciamento pós-transcricional de genes por meio do mecanismo de RNA de interferência, no qual ocorre o bloqueio da tradução ou degradação do RNAm alvo. Além da ação bloqueadora da transcrição, os siRNA podem ser associados à metilação de sequências de DNA. Todos esses mecanismos parecem estar interligados para a organização estrutural da cromatina, tornando-a mais acessível ou não aos fatores de transcrição. As mudanças epigenéticas são fortemente influenciadas pelo ambiente. Qualquer alteração ambiental, ataque de patógenos ou tipo de alimentação podem acarretar mudanças epigenéticas (TANG; HO, 2007). O estresse ambiental, incluindo a hibridação e a poliploidização, são determinantes na ocorrência de variações epigenéticas. Sendo assim, a epigenética está intimamente relacionada ao aumento de variabilidade fenotípica dos indivíduos, tendo papel relevante na evolução. TANG e HO (2007) propõem que uma das causas do aumento da incidência de certos tipos de doenças nos dias de hoje seriam os fenótipos resultantes de alterações epigenéticas em períodos críticos do desenvolvimento de um organismo.

É possível que a exposição materna ao LPS tenha promovido alterações motivacionais em sua prole feminina que culminaram em redução no CM da prole dessas ratas por possíveis mecanismos epigenéticos.

Os presentes resultados são indicativos de que infecções maternas talvez levem a alterações em longo prazo do comportamento maternal da prole. Fato instigante é que a própria mãe que recebeu o LPS não apresentou alterações no CM. Evidentemente, este é um trabalho inicial sobre o tema, e apenas constata o fenômeno, sendo importante, em trabalhos futuros, o esclarecimento dos mecanismos subjacentes a essas alterações.

6. CONCLUSÕES

A administração prenatal de LPS no 9,5º dia da gestação promoveu na prole feminina de ratos:

- quanto ao comportamento maternal (CM), aumento significante na latência para recolher os filhotes e agrupá-los;
- quanto ao comportamento agressivo maternal (CMA), maior latência para o primeiro ataque, menor número e tempo de ataques, e diminuição da porcentagem de filhotes no ninho ao término das observações;
- nenhuma alteração em parâmetros da atividade geral e na expressão astrocitária de GFAP no núcleo accumbens.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.
- ANWAY, M. D.; CUPP, A. S.; UZUMCU, M.; SKINNER, M. K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. **Science**, v. 308, p. 1466–1469, 2005.
- ARRATI, P. G.; CARMONA, C.; DOMINGUEZ, G.; BEYER, C.; ROSENBLATT, J. S. GABA receptor agonists in the medial preoptic area and maternal behavior in lactating rats. **Physiology & Behavior**, v. 87, p. 51-65, 2006. Epub 2005 Nov 17. PubMed PMID: 1629794.
- BENVENISTE, E. N. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. In: BLALOCK, J. E. **Neuroimmunoendocrinology**. 2. ed. Basel: Karger, 1992. p. 106-153.
- BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; MATSUOKA, S. M.; TEODOROV, E.; HABR, S. F.; PENTEADO, S. H.; PALERMO-NETO, J. Prenatal lipopolysaccharide exposure affects maternal behavior and male offspring sexual behavior in adulthood. **Neuroimmunomodulation**, v.17, p. 47-55, 2009.
- BIGNAMI, A.; DAHL, D. Glial cells in the central nervous system and their reaction to injury. **Austin: R. G. Landis**, p. 5-10, 1994.
- BRIDGES, R. S.; RONSHEIM, P. M. Prolactin (PRL) regulation of maternal behavior in rats: bromocriptine treatment delays and PRL promotes the rapid onset of behavior. **Endocrinology**, v. 126, p. 837-848, 1990.
- BRIDGES, R.; ZARROW ,M. X.; GANDELMAN, R.; DENENBERG, V. H. Differences in maternal responsiveness between lactating and sensitized rats. **Developmental Psychobiology**, v. 5, p. 123-7, 1972.
- BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Estrutura celular. In: _____. JAWETZ, MELNICK & ADELBERG: **Microbiologia médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 6-30.
- BROADHURST, P. L. Experiments in psychogenetics: Applications of biometrical genetics to the inheritance of behaviour. In: EYSENCK, H. J. **Experiments in Personality**. London: Routledge & Kegan Paul, 1960. v. 1, p. 1-256.
- BYRNES, E. M.; RIGERO, B. A.; BRIDGES, R. S. Dopamine antagonists during parturition disrupt maternal care and the retention of maternal behavior in rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.73, p. 869-75, 2002.

- CHAMPAGNE, F. A.; WEAVER, I. C.; DIORIO, J.; DYMOV, S.; SZYF, M.; MEANEY, M. J. Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor alpha1b receptor alpha1b promoter and estrogen receptor-alpha expression in the medial preoptic area of female offspring. **Endocrinology**, v. 147, p. 2909 –2915, 2008.
- CHEZ, M. G.; DOWLING, T.; PATEL, P. B.; KHANNA, P.; KOMINSKY, M. Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. **Pediatric Neurology**, v. 36, p. 361-365, 2007.
- CHUNG, L. Y.; BENVENISTE, E. N. Tumor necrosis-alpha production by astrocytes: induction by lipopolysaccharide, INF-gamma, and IL-1beta. **Journal of Immunology**, v.144, p. 2999-3007, 1990.
- COLLINS, J. G.; SMITH, M. A.; ARNOLD, R. R.; OFFENBACHER, S. Effects of Escherichia coli and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide on pregnancy outcome in the golden hamster. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 10, p. 4652-4655, 1994.
- DÖHLER, K. D. The pre- and postnatal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus. **International Review of Cytology**, v. 131, p. 1-57, 1991.
- ENGELAND, C. G.; KAVALIERS, M.; OSSENKOPP, K. P. Influence of the estrous cycle on tolerance development to LPS-induced sickness behaviors in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 31, p. 510-525, 2006. Epub 2006.
- .FAHRBACH, S. E.; MORRELL, J. I.; PFAFF, D. W. Effect of varying the duration of pre-test cage habituation on oxytocin induction of short-latency maternal behavior. **Physiology Behavior**, v. 37, p. 135-139, 1986.
- FAN, L. W. ; PANG, Y. ; LIN, S. ; TIEN, L. T. ; MA, T. ; RHODES, P. G. ; CAI, Z. Minocycline reduces lipopolysaccharide-induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. **Journal of Neuroscience Research**, v. 82, p. 71-82, 2005.
- FEARNS, C.; LOSKUTOFF, D. J. Role of tumour necrosis factor alpha in induction of murine CD14 gene expression by lipopolysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 4822-4831, 1997.
- FORTIER, M. E.; JOOBER, R.; LUHESHI, G. N.; BOKSA, P. Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine-induced locomotion and startle responses in adult rat offspring. **Journal of Psychiatry Research.**, v. 38, p. 335-345, 2004.
- FORTIER, M. E.; LUHESHI, G. N.; BOKSA, P. Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. **Behavior Brain Research.**, v. 181, p. 270-277, 2007.
- GARG, V. Insights into the genetic basis of congenital heart disease. **Cellular Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 1141–1148, 2006.

GIOVENARDI, M.; PADOIN, M. J.; CADORE L. P.; LUCION, A. B. Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: effects of ibotenic acid lesion and oxytocin antisense. **Physiology Behavior**, v. 63, p. 351-359, 1998. PubMed PMID: 9469726.

GUBERNICK, D. J.; ALBERTS, J. R. Maternal licking by virgin and lactating rats: water transfer from pups. **Physiology Behavior**, v. 34, p. 501-506, 1983.

HABR, S. F. Efeitos da administração de interleucina-2 na liberação in vivo de dopamina no nucleus accumbens e no comportamento maternal em ratas Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/ Usp) 2008.

HAVA, G.; VERED, L.; YAEL, M.; MORDECHAI, H.; MAHOUD, H. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. **Developmental Psychobiology**, v. 48, n. 2, p. 162-168, 2006.

HANSEN, S.; HARTHON, C.; WALLIN, E.; LÖFBERG, L.; SVENSSON, K. Mesotelencephalic dopamine system and reproductive behavior in the female rat: effects of ventral tegmental 6-hydroxydopamine lesions on maternal and sexual responsiveness, **Behavior Neuroscience**, v. 105, p. 588–598, 1991.

HANSEN, G. Maternal behavior of female ratas with 6-OHDA lesion in the ventral striatum: characterization of the pup retrieval deficit. **Physiology Behavior**, v. 55, p. 515-620, 1994.

HARJU, K.; OJANIEMI, M.; ROUNIOJA, S.; GLUMOFF, V.; PAANANEN, R.; VUOLTEENAHO, R.; HALLMAN, M. Expression of toll-like receptor 4 and endotoxin responsiveness in mice during perinatal period. **Pediatric Research**, v. 57, n. 5, p. 644-648, 2005.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 99-106, 1998.

KEER, S. E.; STERN, J. M. Dopamine receptor blockade in the nucleus accumbens inhibits maternal retrieval and licking, but enhances nursing behavior in lactating rats, **Physiology Behavior**, v. 67, p. 659–669, 1999.

KENDRICK K. M.; KEVERNE E.B.; CHAPMAN C.; BALDWIN B. A. Microdialysis measurement of oxytocin, aspartate, gamma-aminobutyric acid and glutamate release from the olfactory bulb of the sheep during vaginocervical stimulation. **Brain Research**, v. 442, p. 171-174, 1988.

KIRSCHBAUM, C.; KUDIELKA, B. M.; GAAB, J.; SCHOMMER, N. C.; HELLHAMMER, D. H. Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **Psychosomatic Medicine**, v. 61, p. 154-162, 1999.

- KOFMAN, O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, p. 457-470, 2002.
- KROLL, T. G. Molecular events in follicular thyroid tumors. **Cancer Treatment and Research**, v. 122, p. 85–105, 2004.
- LI, X. Z.; BAI, L. M.; YANG, Y. P.; LUO, W. F.; HU, W. D.; CHEN, J. P.; MAO, C. J.; LIU, C. F. Effects of IL-6 secreted from astrocytes on the survival of dopaminergic neurons in lipopolysaccharide-induced inflammation. **Neuroscience Research** (on line), 2009. DOI 10.1016/j.neures.2009.07.007.
- LIEBERMAN, A.P.; PITHA, P. M.; SHIN, H. S.; SHIN, M. L. Production of tumour necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 86, p. 6348-6352, 1989.
- LIU, Y. and FREEDMAN, B. I. Genetics of progressive renal failure in diabetic kidney disease. **Kidney International Supplement**, p. 94–97, 2005.
- LUCASSEN, P. J.; BOSCH, O.J.; JOUSMA, E.; KRÖMER, S. A.; ANDREW, R.; SECKL, J. R.; NEUMANN, I. D. Prenatal stress reduces postnatal neurogenesis in rats selectively bred for high, but not low, anxiety: possible key role of placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. **European Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 97-103, 2009.
- MAGID, J.; BOBBIN, M.D.; ZALCMAN, S. Interleukin-2 enhances the expression of stereotypic behavior associated with dopamine D1 receptor stimulation. ([Abstract]). **Society Neuroscience**, v. 31, p. 907.908, 2005.
- MERRILL, J. E. Effects of interleukin-1 and tumou necrosis factor- α on astrocytes, microglia, oligodendrocytes, and glial precursors in vitro. **Developmental Neuroscience**, v. 13, p. 130-137, 1991.
- MERRILL, J. E.; IGNARRO, L. J.; SHERMAN, M. P.; MELNIEK, J.; LANE, T. E. Microglial cell cytotoxicity og oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. **Journal of Immunology**, v. 151, p. 2132-2141, 1993.
- MEYER, U.; FELDON, J.; SCHELDOWSKI, M.; YEE, B. K. Towards an immuno-precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 6, p. 913-947, 2005.
- MIMS, CEDRIC, A. **Microbiologia médica**. 2. ed. São Paulo: Manole, p. 501-534, 1999.
- MOORE, M. A. Converging pathways in leukemogenesis and stem cell self-renewal. **Experimental Hematology**, v. 33, p. 719–737, 2005.
- MURPHY, S. Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. **Glia**, v. 29, p. 1-14, 2000.

- NADEAU, S.; RIVEST, S. Role of microglial-derived tumour necrosis factor is mediating CD14 transcription and nuclear kappa B activity in the brain during endotoxemia. **Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 3456-3468, 2000.
- NAKANO, K.; SUZUKI, S.; and OH, C. Significance of increased secretion of glucocorticoids in mice and rats injected with bacterial endotoxin. **Brain Behavior and Immunity**, v. 1, p. 159-172, 1987.
- NEUMANN, I. D.; WIGGER, A.; LIEBSCH, G.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. Increased basal activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during pregnancy in rats bred for high anxiety-related behaviour. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, p. 449-463, 1998.
- NEUMANN, I. D. Stress, gender and motherhood (II). **Stress**, v. 5, p. 233-234, 2002.
- NOLDUS INFORMATION TECHNOLOGY. EthoVision: Video Tracking, Motion Analysis & Behavior Recognition System. **Reference Manual**. Wageningen, 1997.
- NUMAN, M.; ROACH, J. K.; DEL CERRO, M. C.; GUILLAMÓN, A.; SEGOVIA, S.; SHEEHAN, T. P.; NUMAN, M. J. Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior. **Brain Research**, v. 830, p. 358-371, 1999.
- NUMAN, M.; STOLZENBERG, D. S. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, p. 46-64, 2009. Epub 2008 Nov 5. Review.
- NUMAN, M. Maternal behaviors: central integration or independent parallel circuits? Theoretical comment on Popeski and Woodside (2004). **Behavior Neuroscience**, v. 118, p. 1469-1472, 1994.
- NUMAN, M. Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. **Developmental Psychobiology**, v. 49, p. 12-21, 2007.
- O'HARA, M. W.; and SWAIN, A. M. Rates and risk of postpartum depression a meta-analysis. **International Review of Psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 37-54, 1996.
- OLAZÁBAL D. E.; ABERCROMBIE E.; ROSENBLATT J. S.; MORREL J. I. The content of dopamine, serotonin, and their metabolites in the neural circuit that mediates maternal behavior in juvenile and adult rats. **Brain Research Bulletin**, v. 63, p. 259-68, 2004.
- OLIVIER, B.; MOS, J. Rodent models of aggressive behavior and serotonergic drugs. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 16, p. 847-870, 1992.
- PANG, Y. ; CAI, Z. ; RHODES, P. G. Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after

- intracerebral injection of lipopolysaccharide. **Brain Research Developmental Brain Research**, v. 140, p. 205-214, 2003.
- RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, n., p. 635-700, 2002.
- RAKYAN, V. K.; BLEWITT, M. E.; DRUKER, R.; PREIS, J. I.; WHITELAW, E. Metastable epialleles in mammals. **Trends in Genetics**, v. 18, p. 348-51, 2002.
- ROMERO, R.; ESPINOZA, J.; GONÇALVES, L. F.; KUSANOVIC, J. P.; FRIEL, L.; HASSAN, S. The role of inflammation and infection in preterm birth. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 25, n. 1, p. 21-39, 2007.
- SERAFIM A. P.; FELICIO L. F. Dopaminergic modulation of grooming behavior in virgin and pregnant rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 1465-1470, 2001.
- SERAFIM A. P.; FELICIO L. F. Reproductive experience influences grooming behavior during pregnancy in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 391-394, 2002.
- SHANKS, N.; MEANEY, M. J. Hypothalamic-pituitary-adrenal activation following endotoxin administration in the developing rat: a CRH-mediated effect. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 6, p. 375-383, 1994.
- SHANKS, N.; LAROCQUE, S.; MEANEY, M. J. Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: early illness and later responsiveness to stress. **Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 376-384, 1994.
- SHI, L.; FATEMI, S. H.; SIDWELL, R. W.; PATTERSON, P. H. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 297-302, 2003.
- SCHULKIN, J. Neuroendocrine regulation of behavior. **London**: Cambridge University Press, 1999.
- SILVA, M. R.; BERNARDI, M.M.; FELICIO, L.F. Effects of dopamine receptor antagonists on ongoing maternal behavior in rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 68, p. 461-468, 2001. PubMed PMID: 11325400.
- SILVA, M. R.; BERNARDI, M. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; FELICIO, L. F. Pimozide injections into the Nucleus accumbens disrupt maternal behaviour in lactating rats. **Pharmacology & Toxicology**. v. 93, p. 42-47, 2003. PubMed PMID: 12828573.
- SLOTNICK, B. M. Disturbances of maternal behavior in the rat following lesions of the cingulate cortex. **Behaviour**, v. 29, p. 204-236, 1967.

- SOUSSI, T.; ISHIOKA, C.; CLAUSTRES, M. and BEROUD, C. Locus-specific mutation databases: pitfalls and good practice based on the p53 experience. **Nature Reviews. Cancer**, v. 6, p. 83–90, 2006.
- STERN, J. M.; LONSTEIN, J. S. Neural mediation of nursing and related maternal behaviors. **Progress in Brain Research**, v. 133, p. 263-283, 2001.
- STOLZENBERG, D. S.; MCKENNA, J. B.; KEOUGH, S.; HANCOCK, R.; NUMAN, M. J.; NUMAN, M. Dopamine D1 receptor stimulation of the nucleus accumbens or the medial preoptic area promotes the onset of maternal behavior in pregnancy-terminated rats. **Behavior Neuroscience**, v. 121, p. 907-919, 2007.
- STOLZENBERG, D.; YOU ZHANG, Z.; LUSKIN, K.; RANKER, L.; BRESS, J.; NUMAN, M. Dopamine D₁ receptor activation of adenylyl cyclase, not phospholipase C, in the nucleus accumbens promotes maternal behavior onset in rats. **Hormones and Behavior**, in press 2009, doi:10.1016/j.yhbeh.2009.09.014
- STURMAN-HULBE M. Maternal behavior in the albino rat. **Journal Comparative Psychology**, v. 9, p. 203-237, 1929.
- SUMI, N.; NISHIOKU, T.; TAKATA, F.; MATSUMOTO, J.; WATANABE, T.; SHUTO, H.; YAMAUCHI, A.; DOHGU, S.; KATAOKA, Y. Lipopolysaccharide-activated microglia induce dysfunction on the blood-brain barrier in rat microvascular endothelial cells co-cultured with microglia. **Cellular and Molecular Neurobiology** (on line), 2009. DOI 10.1007/s10571-009-9446-7.
- TANG, W. Y.; HO, S. M. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 8, p. 173-182, 2007. Review. PubMed PMID: 17638084.
- TERKEL, J.; BRIDGES, R. S.; SAWYER, C. H. Effects of transecting the lateral neural connections of the medial preoptic area on maternal behavior in the rat: nest building, pup retrieval, and prolactin secretion, **Brain Research**, v. 169, p. 369–380, 1979.
- TERLECKI, L. J.; SAINSBURY, R. S. Effects of fimbria lesions on maternal behavior in the rat. **Physiology Behavior**, v. 21, p. 89-97, 1978.
- TEODOROV, E; FELÍCIO, L. F.; BERNARDI, M. M. Maternal Behavior. In: **CLR Balieiro, São Paulo, SP**. Animal models as ethical tools in biomedical research, ed. Andersen, M & Tufick, S. CLR Balieiro, São Paulo, SP, cap.11 p.149-165, 2010.
- TEODOROV, E.; TOMITA, A.T.; BANON G. P.; GIL, I. G.; BERNARDI, M. M.; FELÍCIO, L. F. Behavioral effects of acute stimulation of kappa-opioid receptors during lactation. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 90, p. 534-539, 2008.
- TUSIÉ-LUNA, M. T. Genes and type 2 diabetes mellitus. **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 210–222, 2005.

WANG, X.; ROUSSET, C. I.; HAGBERG, H.; MALLARD, C. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 11, n. 5, p. 343-353, 2006.

WEISNER, B. P.; SHEARD N. M. Maternal behavior in the rat. **Edinburg**: Oliver and Boyd; 1933.

WELBERG, L. A. M.; SECKL, J. R. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. **Journal Neuroendocrinology**, v. 13, p. 113-128, 2001.

XU, D. X.; CHEN, Y. H.; WANG, H.; ZHAO, L.; WANG, J. P.; WEI, W. Tumor necrosis factor alpha partially contributes to lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal growth restriction and skeletal development retardation in mice. **Toxicology Letters**, v. 163, n. 1, p. 20-29, 2006.

XU, J.; LING, E. A. Upregulation and induction of surface antigens with special reference to MHC class II expression in microglia in postnatal rat brain following intravenous or intraperitoneal injections of lipopolysaccharide. **Journal of Anatomy**, v. 184, p. 285-296, 1994a.

XU, J.; LING, E. A. Expression of major histocompatibility complex class II antigen on amoeboid microglial cells in early postnatal rat brain following intraperitoneal injections of lipopolysaccharide. **Experimental Brain Research**, v. 100, p. 287-292, 1994b.

YOUNG, L.J.; WINSLOW, J.T.; NILSEN, R.; INSEL, T.R. Species differences in V(1)a receptor gene expression in monogamous and nonmonogamous voles: behavioral consequences. **Behavior Neuroscience**, v.111, p. 599–605, 1997.

ZALCMAN, S.; SAVINA, I.; WISE, RA. Interleukin-6 increases sensitivity to the locomotor stimulating effects of amphetamine in rats. **Brain Research**, v. 847, p. 276-283, 1999.

ZUCKERMAN, L.; REHAVI, M.; NACHMAN, R.; WEINER, I. Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: a novel neurodevelopmental model of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, p. 1778–1789, 2003.