

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

OCTACÍLIO PRATA CALIXTO

**EFEITO DA ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA EM PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DE RATAS *WISTAR* E A
RELAÇÃO COM OS TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS NA PROLE
JOVEM-ADULTA, MACHOS E FÊMEAS**

CRICIÚMA, 2019

OCTACÍLIO PRATA CALIXTO

**EFEITO DA ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA EM PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DE RATAS *WISTAR* E A
RELAÇÃO COM OS TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS NA PROLE
JOVEM-ADULTA, MACHOS E FÊMEAS**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Ioppi Zugno.

CRICIÚMA, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C154e Calixto, Octacílio Prata.

Efeito da ativação imune materna em parâmetros comportamentais e neuroquímicos de ratas wistar e a relação com os transtornos psiquiátricos na prole jovem-adulta, machos e fêmeas / Octacílio Prata Calixto. – 2019.
74 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.
Orientação: Alexandra Ioppi Zugno.

1. Ativação imune materna. 2. Influenza A (H1N1) – Vacinação. 3.
Transtorno neurodesenvolvimental. 4. Grávidas – Aspectos
imunológicos. I. Título.

CDD 23. ed. 616.079

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato **Octacilio Prata Calixto** sob o título “**EFEITO DA ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA EM PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DE RATAS WISTAR E A RELAÇÃO COM OS TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS NA PROLE JOVEM-ADULTA, MACHOS E FÊMEAS**”, para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

Criciúma, SC, 22 de fevereiro de 2019.

Profa. Dra. JOSIANE BUDNI
Membro Relator – UNESC

Profa. Dra. JADE DE OLIVEIRA
Membro Interno – UNESC

Profa. Dra. TALITA TUON
Membro Externo – UFSC

Profa. Dra. MARIA DE LOURDES BORBA MAGALHÃES
Membro Externo – UDESC

Profa. Dra. Alexandra Ioppi Zugno
Orientadora

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador Adjunto PPGCS
Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador Adjunto do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo *Vancouver* modificado e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Psiquiatria Translacional vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

RESUMO

A ativação imune materna (AIM) durante a gravidez, em especial via PolyI:C, pode aumentar consideravelmente a incidência de transtornos neurodesenvolvimentais na prole, tais como a esquizofrenia, autismo, ansiedade e depressão. É sabido que as mulheres grávidas são consideradas o grupo de risco mais importante para a vacinação contra a gripe ou influenza (H1N1). No entanto, o uso da vacina contra a gripe neste grupo continua limitado, visto que os reais efeitos da imunização durante a gestação na saúde materno-fetal permanecem incompreendidos. Desse modo, este estudo investigou parâmetros comportamentais de discriminação olfatória, atividade locomotora, comportamento tipo-depressivo e perfil cognitivo, além dos níveis de citocinas na prole jovem-adulta de ratas *Wistar* submetidas à vacinação contra influenza A e comparou esses parâmetros na prole de ratas induzidas a infecção com PolyI:C durante a gestação. Ratas *Wistar* gestantes foram divididas em três grupos: 1) Grupo controle tratado com salina; 2) Grupo Vacina tratado com a Vacina contra influenza A (H1N1); 3) Grupo PolyI:C submetido a uma única injeção de PolyI:C. Todos os tratamentos foram administrados no 9º dia de gestação. Após o desmame, os filhotes machos e fêmeas de 30 e 60 dias foram agrupados conforme o tratamento materno e, ao atingir a respectiva idade, as proles foram submetidas aos testes comportamentais: discriminação olfatória, habituação ao campo aberto, *splash* teste e inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto (IPP). Após a realização destes, os animais foram decapitados e suas estruturas cerebrais, bulbo olfatório (BO), córtex frontal, hipocampo e estriado retiradas para análise dos níveis de citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-4 e IL-10). Os resultados apontam que a AIM por PolyI:C foi capaz de induzir hiperlocomção e um comportamento tipo-depressivo na vida adulta (60 dias) da prole de machos, indicando que a infecção pré-natal está implicada nos transtornos neurodesenvolvimentais. A PolyI:C administrada nas mães foi capaz de reduzir os níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) em diversas estruturas cerebrais da prole de machos, particularmente, no BO e córtex frontal de ratos de 30 dias; córtex frontal e estriado de machos de 60 dias. Ainda, aumentou os níveis de IL-1 β no BO e estriado das fêmeas de 30 e 60 dias, além de aumentar as concentrações de TNF- α no estriado de fêmeas de 60 dias e no córtex frontal de machos de 30 dias. Em resumo, a prole exibiu redução nas citocinas anti-inflamatórias, o que confirma a influencia da AIM (PolyI:C) na vida pós-natal da prole, tanto em parâmetros neuroquímicos como comportamentais. Os ratos machos de 60 dias do grupo vacina demonstraram um aumento no percentual de IPP (65, 70 e 75dB), sugerindo que a vacinação materna com H1N1 pode ter melhorado a função cognitiva destes animais. Para os resultados das citocinas pró e anti-inflamatórias da prole de fêmeas e machos de 30 e 60 dias cujas mães receberam vacina não se encontrou um padrão óbvio para tais marcadores, os quais mostraram diferentes respostas entre machos e fêmeas na idade jovem ou adulta. Entretanto, torna-se evidente que as citocinas sofrem importantes alterações na vida pós-natal e, possivelmente, a vacinação materna regula os níveis desses marcadores, os quais parecem ser influenciados pela idade, gênero e estrutura cerebral avaliada na prole.

Palavras-chaves: PolyI:C, vacina contra influenza A (H1N1), gestação, prole jovem-adulta, parâmetros comportamentais e neuroquímicos.

ABSTRACT

Maternal immune activation (MIA) during pregnancy, especially via *polyriboinosinic-polyribocytidilic acid* (PolyI:C), can greatly increase the incidence of neurodevelopmental disorders in the offspring such as schizophrenia, autism, anxiety and depression. It is known that pregnant women are considered the most important risk group for vaccination against influenza (H1N1). However, the use of these vaccine in this group remains limited, since the actual effects of immunization during pregnancy on maternal-fetal health remain unknown. Thus, this study investigated behavioral parameters of locomotor activity, depressive behavior, olfactory discrimination and cognitive profile, as well as levels of cytokines in young adult offspring, male and female, subjected to influenza A vaccination and to compare these parameters in the offspring of rats induced with PolyI:C infection during gestation. Pregnant *Wistar* rats were used, and were divided into three groups: 1) control group that received saline; 2) group administered with influenza A (H1N1) vaccine; 3) PolyI: C group, subjected to a single PolyI: C injection. The injections were administered on the 9th day of gestation. After weaning, the male and female offspring were grouped according to maternal treatment, and at 30 or 60 days, both offspring were subjected to behavioral tests: open field, splash test, olfactory discrimination and prepulse inhibition (PPI). After these tests, animals were decapitated and their brain structures, olfactory bulb (OB), frontal cortex, hippocampus and striatum were removed for biochemical analyzes of cytokines levels (IL-1 β , TNF- α , IL-4 e IL-10). Overall, results indicate that PolyI:C was able to induce hyperlocomotion and depressive behavior in adult male offspring, confirming that the prenatal infection implicated in neurodevelopmental disorders. PolyI:C administered to mothers reduced the levels of anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) in various brain structures of male offspring, particularly in OB and frontal cortex of young mice; frontal cortex and striatal of adult male and in the striatum of adult rats. Furthermore, it increased levels of IL-1 β in the striatum of 30 and 60-day-old females, in addition to increasing TNF- α concentrations in the striatum of 60-day-old females and in the frontal cortex of 30-day males. In summary, the offspring exhibited a reduction in anti-inflammatory cytokines, indicating the influence of AIM on the postnatal life of offspring, both in neurochemical and behavioral parameters. The 60-day male rats of the vaccine group demonstrated an increase in the percentage of PPI (65, 70 and 75 dB), suggesting that maternal vaccination (H1N1) may have improved the cognitive function of these animals. For pro-and anti-inflammatory cytokines from the offspring of 30 and 60-day-old female and male offspring whose mothers received vaccine, no obvious pattern was found for such markers, which showed different responses between males and females at young or adult age. However, it is clear that cytokines suffer changes in postnatal life, and maternal vaccination, possibly regulates the levels of these markers, which appear to be influenced by the age, gender and brain structure assessed in the offspring.

Keywords: PolyI:C, Influenza A (H1N1) vaccine, gestation, young adult offspring, behavioral and neurochemical parameters.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIM - Ativação Imune Materna.

AMPA – Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

ANOVA - Análise de Variância.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BO - Bulbo Olfatório.

CEUA - Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais.

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

EPM - Erro Padrão da Média.

GD - Giro Denteado.

H1N1 - Influenza A.

HPA - Hipotálamo-Hipófise-Adrenal.

IFN - Interferons.

IFN α - Interferon Alfa.

IFN γ - Interferon Gama.

IL - Interleucinas.

IL-1 β - Interleucina 1 β .

IL-4 - Interleucina 4.

IL-6 - Interleucina 6.

IL-10 - Interleucina 10.

IPP- Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto.

LAIV - Vacinas vivas atenuadas.

LIF - Fator Inibidor de Leucemia, do inglês *Leukemia Inhibitory Factor*.

LPS - Lipopolissacarídeo.

NF κ B - Fator de Transcrição Nuclear- κ B.

OMS - Organização Mundial de Saúde.

Polyl:C - Ácido Poliriboinosínico-Poliribocítídílico, do inglês *polyriboinosinic-polyribocytidilic*.

QIV - Vacinas inativadas quadrivalentes.

SPSS - *Statistical Package for the Social Science*

SNC - Sistema Nervoso Central.

SNP - Sistema Nervoso Periférico.

SZV - Zona Zubventricular.

TBS - Tampão Fosfato Salino.

TGF-B - Fator de transformação de crescimento-beta

Th1- *T-helper-1*.

Th2 - *T-helper-2*.

TIV - Vacinas inativadas trivalentes.

TNF- α - Necrose Tumoral- α , do inglês *Tumoral Necrosis- α* .

TrkB - Receptor Tirosina Quinase, do inglês *Receptor Tyrosine Kinase*.

TLR - Receptor *Toll-like*

UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desenho experimental do estudo	28
Figura 2: Atividade locomotora realizada pela prole de fêmeas aos 30 e 60 dias de vida cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação.....	34
Figura 3: Atividade locomotora realizada pela prole de machos aos 30 e 60 dias de vida cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação.....	35
Figura 4: <i>Splash</i> teste realizado pela prole de ratas fêmeas aos 30 e 60 dias de vida, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 ou PolyI:C durante a gestação.....	36
Figura 5: <i>Splash</i> teste realizado pela prole de ratos machos aos 30 e 60 dias de vida, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 ou PolyI:C durante a gestação.....	37
Figura 6: Teste de discriminação olfatória da prole jovem e adulta, de fêmeas cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 ou PolyI: C durante a gestação.....	38
Figura 7: Teste de discriminação olfatória da prole jovem e adulta, de machos cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 ou PolyI:C durante a gestação.....	40
Figura 8: Função sensório-motora na prole fêmea e machos aos 30 e 60 dias de vida, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 ou PolyI:C durante a gestação.....	41
Figura 9: Níveis de IL-1 β e TNF- α nas estruturas cerebrais da prole de fêmeas aos 30 e 60 dias, cujas mães receberam os tratamentos: salina, Vacina H1N1 ou PolyI:C durante a gestação.	42
Figura 10: Níveis de IL-1 β e TNF- α nas estruturas cerebrais da prole de machos aos 30 e 60 dias, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 ou PolyI:C durante a gestação.....	43
Figura 11: Níveis de IL-4 e IL-10 nas estruturas cerebrais da prole de fêmeas aos 30 e 60 dias, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 ou PolyI:C durante a gestação.....	44
Figura 12: Níveis de IL-4 e IL-10 nas estruturas cerebrais da prole de machos aos 30 e 60 dias, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 ou PolyI:C durante a gestação.....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Ativação imune materna, saúde mental e citocinas na prole jovem-adulta.....	13
1.2 Vacinação contra influenza A durante a gestação e seus efeitos na saúde materna e da prole jovem-adulta	17
1.3 Processos Neuronaís.....	21
2 JUSTIFICATIVA.....	23
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Objetivos Específicos	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Aspectos éticos e locais de realização da pesquisa	25
4.2 Animais e delineamento experimental das ratas mães	25
4.2.1 Administração de salina, vacina contra influenza A (H1N1) e PolyI: C nas ratas gestantes	26
4.2.2 Divisão dos experimentos em etapas.....	26
4.3 Animais e delineamento experimental da prole adulta: machos e fêmeas	27
4.4 Testes Comportamentais	28
4.4.1 Atividade locomotora	28
4.4.2 <i>Splash</i> teste.....	29
4.4.3 Discriminação olfatória	29
4.4.4 Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto (IPP)	30
4.5 Análises Bioquímicas.....	31
4.5.1 Preparo das amostras cerebrais.....	31
4.5.2 Níveis cerebrais de citocinas	31
4.5.3 Dosagem de proteínas	32
4.6 Análise Estatística	32
5 RESULTADOS	33
5.1 Análises Comportamentais.....	33
5.1.1 Atividade Locomotora.....	33
5.1.2 <i>Splash</i> Teste.....	35
5.1.3 Discriminação Olfatória	37
5.1.4 Inibição por Pré-Pulso do Reflexo de Sobressalto (IPP).....	40
5.2 Análises Bioquímicas.....	41
5.2.1 Níveis Cerebrais de Citocinas	41
5.3 Resumo dos resultados comportamentais e neuroquímicos dos animais	45
6 DISCUSSÃO.....	48

7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO.....	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ativação imune materna, saúde mental e citocinas na prole jovem-adulta

O adequado desenvolvimento fetal durante a gestação é de suma importância, visto que a presença de algum fator estressor na fase pré-natal pode levar a sérias consequências ao longo da vida na prole (Nunes e Madhi, 2015; Bergdolt e Dunaevsky, 2018). De fato, evidências apontam que a infecção viral ou bacteriana durante o 1º ou 2º trimestre de gravidez está fortemente associada à predisposição de transtornos afetivos e psiquiátricos na prole (Boksa, 2010; Jurgens et al., 2012).

A etiologia dos transtornos neurodesenvolvimentais como esquizofrenia, autismo, ansiedade e depressão envolve alterações na formação cerebral (Brandon e Sawa, 2011), assim, eventos adversos no útero podem influenciar os processos críticos do desenvolvimento do cérebro dos filhos e predispor o aparecimento de doenças mentais na idade jovem-adulta (Brown, 2006). Um dos mais significativos fatores de risco ambientais para a esquizofrenia é a infecção no 1º (Brown, 2006; Brown et al., 2007) e 2º trimestre de gestação (Clarke et al., 2006), a qual pode afetar o desenvolvimento cerebral, devido a liberação de hormônios relacionados ao estresse, hipóxia, hipertermia ou desnutrição e desencadear, por conseguinte, o aumento de citocinas pró-inflamatórias na mãe, placenta e no feto (Patterson, 2007).

Deste modo, a infecção pré-natal por vírus ou bactéria e, conseqüentemente, a ativação imune materna (AIM) contribui para alterações na neurogênese materno-fetal, na mielinização fetal e está diretamente envolvida na patogênese de transtornos neurodesenvolvimentais na prole, em especial a esquizofrenia e o autismo (Liu et al., 2013), além de ansiedade e depressão (Babri et al., 2014). Com base nisso, modelos animais de AIM têm sido estabelecidos a fim de demonstrar a relação entre infecção materna e transtornos psiquiátricos. Déficits relacionados a estes transtornos são observados na prole adulta de modelos animais, incluindo alterações comportamentais (atividade locomotora e inibição do reflexo de sobressalto), anormalidades em regiões cerebrais e o desequilíbrio em sistemas de neurotransmissores (Li et al., 2014). Sabe-se que há dois modelos animais de infecção pré-natal induzidos por lipopolissacarídeo (LPS) ou ácido poliriboinosínico-poliribocítidílico (*polyriboinosinic-polyribocytidilic* = PolyI:C), os quais desencadeiam efeitos bacterianos e virais, respectivamente, na gravidez (Anderson e Maes, 2013).

A PolyI:C se caracteriza como um análogo sintético de cadeia dupla de RNA que leva à produção pronunciada, mas por tempo limitado de citocinas pró-inflamatórias e estimula reações fisiológicas induzidas por infecção viral sendo, por este motivo, amplamente usada para mimetizar a AIM em modelos animais (Majde, 2000; Alexopoulou, 2011). Baseado no fato de que a exposição pré-natal à infecção constitui um fator de risco para a esquizofrenia, a PolyI:C tem sido empregada no 9º dia de gestação em roedores, o qual equivale ao 1º trimestre de gravidez em humanos, como um modelo neurodesenvolvimental de AIM capaz de induzir anormalidades comportamentais, neuroquímicas e cerebrais características da esquizofrenia na prole adulta, podendo ainda impactar na saúde materna (Meyer et al., 2008a,b; Meyer et al., 2009a,b; Meyer e Feldon, 2012; Hadar et al., 2015; Reisinger et al., 2015).

De modo geral, a administração de PolyI:C em ratas *Wistar* durante a gravidez tem levado ao comprometimento da prole, indicando um efeito transplacentário da AIM no feto em desenvolvimento (Boksa, 2010; Meyer e Feldon, 2012). De qualquer forma, ambas as infecções por LPS e PolyI:C, aumentam a liberação de citocinas pró-inflamatórias na mãe (placenta e líquido amniótico) e no cérebro do feto, sendo que a PolyI:C ainda induz uma resposta aguda a infecções virais, aumentando consideravelmente a liberação de interferons (IFN): IFN α e IFN γ (Winter et al., 2009). Desse modo, pelo fato das citocinas direcionarem a resposta imune inata, foi atribuído a estas o papel de candidatas à interrupção do desenvolvimento cérebro-fetal (Smith et al., 2007; Reisinger et al., 2015).

As citocinas são peptídeos produzidos e liberados por inúmeros tipos de células no sítio da lesão, bem como por células do sistema imunológico, através da ativação de proteinoquinases ativadas por mitógenos (De Oliveira et al., 2011), sendo capazes de interferir no metabolismo de neurotransmissores, nas atividades neuroendócrina e neuronal, na regulação do crescimento e da proliferação das células da glia (Hava et al., 2006). Em geral, as citocinas atuam no organismo a fim de combater diversos patógenos, sendo que no sistema imune reconhecem partículas invasoras e ainda participam de respostas adaptativas ou reações homeostáticas (Avitsur e Yirmiya, 1999; Aderem e Ulevitch, 2000). Estes peptídeos estão envolvidos tanto na resposta imune como na mediação de vários eventos do SNC, tendo uma ação imuno-reguladora vital nas funções e sobrevivência neuronal (Vizi e Kiss, 1998).

Deste modo, a ativação das citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α), a interleucina-1 β (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6) pode estar associada à infecção intra-uterina, parto prematuro, infecções neonatais, deficiência nutricional materna e dano cerebral neonatal. No cérebro, essas proteínas são expressas nas células gliais e nos neurônios. Em adição à sua função na resposta imune, estes mediadores modulam a função e o

desenvolvimento neuronal, representando um papel crucial no neurodesenvolvimento (Hava et al., 2006). As citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α são consideradas pró-inflamatórias pelo fato de aumentar a resposta imunitária à infecção e inflamação, por promover o recrutamento de leucócitos até os locais de inflamação e/ou pela ativação inflamatória celular (Potvin et al., 2008). O TNF- α está envolvido na regulação do crescimento dos neuritos (Golan et al., 2004), afeta a sobrevivência neuronal (Barker et al., 2001) e regula a expressão do receptor AMPA (Beattie et al., 2002). A IL-1 β e o TNF- α também estão relacionados à regulação da plasticidade sináptica (Butler et al., 2004). As citocinas anti-inflamatórias, IL-4 e IL-10, se destacam por contribuir para atenuar a resposta imune e inflamatória (Potvin et al., 2008), enquanto o fator de transformação de crescimento-beta (TGF- β) é considerado uma das citocinas mais importantes para o crescimento celular, diferenciação e regulação da função imune (Graciarena et al., 2010).

Em resumo, as citocinas regulam a inflamação e coordenam as respostas inata e adaptativa do sistema imunológico (Miller et al., 2011; Müller et al., 2015), sendo importantes mediadores da comunicação entre o SNC e o sistema imune, o que pode ter implicações para a psiquiatria clínica (Kapczinski et al., 2010, 2011). É sabido que fatores estressores durante a gestação, como a presença de infecções, deficiência de nutrientes e uso de drogas, aumentam o risco de parto prematuro, podem comprometer a saúde materna, o neurodesenvolvimento do feto e predispor o aparecimento de transtornos psiquiátricos (esquizofrenia, depressão, transtorno bipolar e autismo) na vida jovem-tardia da prole (Reddy e Yao, 1996; Dammann et al., 2002; Francesconi et al., 2011). Além disso, ativadores imunológicos e inflamatórios, tais como PolyI:C, IFN- γ e LPS quando administrados em períodos críticos, como na fase gestacional, ativam a microglia no sistema nervoso central (SNC), gerando uma neuroinflamação (Kapczinski et al., 2011; Kunz et al., 2011).

A ativação microglial tem sido associada aos transtornos psiquiátricos (Najjar et al., 2013), visto que a microglia é uma célula imune residente do SNC ativada em resposta à lesão cerebral (Stertz et al., 2013). Assim, a ativação da microglia libera citocinas pró-inflamatórias e radicais livres que podem causar degeneração neuronal, anormalidades na substância branca e diminuição da neurogênese materna e fetal. Esta interação, neurônio-microglia, pode levar a lesão e perda neuronal, sendo inclusive um importante fator envolvido na fisiopatologia dos transtornos neurodesenvolvimentais (Monji et al., 2009; Zhao et al., 2014; Réus et al., 2015).

Está bem descrito que a administração de LPS ou PolyI:C leva à ativação da microglia e ainda induz a inflamação via fator de transcrição nuclear- κ B (NF κ B) no cérebro do feto (Saadani-Makki et al., 2008; Lin et al., 2014). Como consequência da AIM, há um aumento da

inflamação no útero materno e a consequente perda de células precursoras de oligodendrócitos, hipomielinização e neuroinflamação materno-fetal, o que pode acarretar em alterações comportamentais, cognitivas e neuroquímicas na mãe e na vida tardia da prole (Svedin et al., 2005; Monji et al., 2009). A AIM via PolyI:C também pode comprometer o desenvolvimento do sistema límbico e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) por meio da liberação de corticotrofina materna, resultando em comportamento ansiogênico e depressivo, além de déficits de atenção e aprendizagem, particularmente, na vida jovem-adulta da prole (Enayati et al., 2012).

Ademais, a diferença de sexos entre homens e mulheres, machos e fêmeas tem despertado a atenção no mundo científico (Hegarty, 2018), uma vez que gêneros (masculino e feminino) podem diferir quanto à sensibilidade das áreas cerebrais em desenvolvimento e aos hormônios sexuais (estrogênio, testosterona) e do estresse (cortisol), manifestando diferentes respostas mediante a exposição de uma mesma situação estressora materna (Weinstock, 2007; Schwendener et al., 2009).

É sabido que até a última década, animais fêmeas raramente eram utilizadas em pesquisas científicas, exceto para fins de reprodução sexual ou investigações específicas, devido ao ciclo estral, que por sua vez poderia interferir nos parâmetros comportamentais (Simpson et al., 2012). Todavia, evidências têm comprovado diferenças nos gêneros à nível cerebral e comportamental, tanto nos estudos clínicos quanto pré-clínicos (Weinstock, 2007; Schwendener et al., 2009; Hegarty, 2018). Os hormônios sexuais são capazes de influenciar na aprendizagem e memória, podendo afetar a capacidade de respostas aos tratamentos (Souza et al., 2014; Gobinath et al., 2017), sendo relatado que homens apresentam uma maior incidência e predisposição para o desenvolvimento de autismo, transtorno de hiperatividade e atenção e tem maior habilidade na memória espacial (Wooten et al., 2004; Ramtekkar et al., 2010; Rucklidge, 2010), enquanto as mulheres parecem mais predispostas ao desenvolvimento de depressão e doença de Alzheimer e têm maior habilidade na memória verbal (Werling e Geschwind, 2013).

Dados da literatura apontam ainda que diferentes gêneros (masculino e feminino) podem manifestar distintas respostas imunes. Klein (2012) verificou que o gene do receptor *toll-like* (TLR) pode sofrer inativação e ser mais expresso em mulheres do que em homens. Assim, a exposição ao TLR7 aumentou os níveis de IFN- α em mulheres quando comparado aos homens em culturas celulares sanguíneas mononucleares (Pisitkun et al., 2006). Porém, a ativação de TLR9 por resposta viral, aumentou os níveis de IL-10 em homens quando comparado às mulheres (Torcia et al., 2012). Desse modo, mais pesquisas se fazem necessárias

para investigar os mecanismos envolvidos nas diferentes respostas imunes e na fisiopatologia das doenças entre homens e mulheres, machos e fêmeas.

Estudos têm demonstrado também que o comprometimento comportamental e cognitivo materno e na prole jovem-adulta de mães expostas à AIM pode ser resultante da exposição aguda e crônica de citocinas pró-inflamatórias induzidas por agentes estressores (Meyer et al., 2006a,b; Garay et al., 2013; Xia et al., 2014a), as quais levam a alterações neuroquímicas e morfológicas. Adicionalmente, a desregulação dos sistemas dopaminérgico (Meyer et al., 2008a), serotoninérgico (Fatemi et al., 2008), glutamatérgico (Meyer et al., 2008b) e GABAérgico foi observada em descendentes de AIM (Samuelsson et al., 2006). Morfológicamente, a AIM causa lesões corticais cerebrais durante a fase neonatal (Girard et al., 2010), diminuição da atividade cerebelar das células de *Purkinje* (Shi et al., 2003; 2005; 2009) e aumento da apoptose em ambos os neurônios e células da glia em várias regiões cerebrais (Boksa, 2010). Somado a isso, a neurogênese no giro denteado (GD) hipocampal tem se mostrado prejudicada na prole adulta induzida por AIM (Meyer et al., 2006a,b; Cui et al., 2009). No mais, sabe-se que a neurogênese é controlada por fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo estas citocinas que têm um papel crítico nos processos cognitivos, tais como plasticidade sináptica e neuromodulação (Balu e Lucki, 2009). Diante disso, as interleucinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) podem comprometer a neurogênese adulta e, geralmente, encontram-se elevadas pela AIM (Spooren et al., 2011; Gonzalez-Perez et al., 2012).

Com base nestas evidências, pesquisas suportam que a intervenção viral ou bacteriana na gravidez é capaz de diminuir a proliferação celular, sobrevivência dos neurônios e causar mudanças comportamentais acentuadas na vida tardia da prole, por comprometer a saúde da mãe (Cui et al., 2009; Shi et al., 2009). Todavia, de que forma e por quais mecanismos a AIM pode impactar nestes parâmetros comportamentais e neuroquímicos no cérebro da prole pós-natal ainda deve ser pesquisado, a fim de permitir uma maior compreensão destas alterações conjuntas.

1.2 Vacinação contra influenza A durante a gestação e seus efeitos na saúde materna e da prole jovem-adulta

As mulheres grávidas são consideradas o grupo de risco mais importante para a vacinação contra a gripe, também denominada influenza ou H1N1 (McMillan et al., 2015). Mulheres com doença crônica, tal como função pulmonar prejudicada, asma grave, diabetes *mellitus*, deficiência imunológica e obesidade apresentam risco aumentado de complicações para influenza, sendo oferecida a vacinação já no 1º trimestre de gestação (Helmig et al., 2015).

Portanto, sugere-se que este aumento da susceptibilidade à infecção pelo vírus influenza durante a gravidez é causado pela redução da resposta imune, particularmente durante o 3º trimestre de gestação (Chavant et al., 2013). Baseado nisso, ambas as vacinas, pandêmica ou sazonal para a gripe, são recomendadas internacionalmente para mulheres grávidas, independentemente da presença de condições de risco à saúde materna e fetal pré-existentes. Entretanto, embora a vacinação de gestantes tenha sido recomendada desde 2005 pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2005; 2014), a utilização desta permanece limitada, devido às preocupações sobre seu efeito no desenvolvimento do feto e às possíveis ações teratogênicas (Bednarczyk et al., 2012).

McMillan e colaboradores (2015) afirmam que as mulheres grávidas são uma população única devido às mudanças imunológicas e fisiológicas que ocorrem durante essa fase. Em particular, as alterações imunológicas como a ativação de citocinas pró-inflamatórias, podem resultar em reações de reatogenicidade pela vacina contra influenza e, assim, o risco de dano ao feto torna-se uma grande preocupação. Estas alterações imunológicas e fisiológicas que ocorrem durante a gravidez podem alterar a susceptibilidade da mãe e do feto a várias doenças infecciosas (Palumbo et al., 2012).

Do ponto de vista imunológico, a imunidade adaptativa humoral permanece intacta com um aumento na resposta mediada por células *T-helper-2* (Th2). Por outro lado, observa-se uma supressão seletiva da imunidade mediada por células *T-helper-1* (Th1) que compromete a capacidade de resposta da mãe à infecção (Simon et al., 2015). Desta forma, o equilíbrio das células Th1/Th2 parece mediar alterações estruturais e a neurogênese em modelos animais de estresse crônico (McEwen, 2001). Em particular, estudos apontam uma correlação positiva entre a neurogênese hipocampal e o equilíbrio destas células. Observou-se que a diminuição da neurogênese no hipocampo está associada à redução do equilíbrio Th1/Th2 em modelos animais de envelhecimento (Palumbo et al., 2012) e que o aumento da neurogênese correlaciona-se ao aumento do equilíbrio das citocinas Th1/Th2 em estudos de exercício moderado (Zhao et al., 2012; Grohskopf et al., 2014).

Palumbo et al. (2012) e He et al. (2014) confirmam que o equilíbrio das células Th1/Th2 está envolvido na resposta comportamental e neurogênese adulta, sendo influenciadas pelos níveis de citocinas, as quais tem papel crucial em processos cognitivos como plasticidade sináptica, neurogênese e neuromodulação. Mais especificamente, as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) estão associadas aos declínios cognitivos (Dik et al., 2005), enquanto as citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IFN- γ e TGF- β) têm demonstrado efeito neuroprotetor (Butovsky et al., 2006; Baron et al., 2008). Estes peptídeos realizam neuromodulação não apenas através da resposta direta do receptor ao ligante, mas também através da sua interligação

(*cross-talk*) com a microglia residente (Butovsky et al., 2006; Schwartz e Schhete, 2010). Neste sentido, Xia et al. (2014a) observaram que a vacinação contra influenza A (H1N1) durante a gravidez foi capaz de aumentar os níveis de IL-4, IFN- γ e TGF- β e diminuir os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α nas mães, sugerindo que a imunização parece criar um ambiente neurobenéfico tanto na periferia como no cérebro das roedoras gestantes.

Jamieson et al. (2009) sugerem que mulheres grávidas e no período pós-parto são vulneráveis a pandemias de gripe. Por conseguinte, o Comitê sobre Práticas de Imunização recomenda o uso da vacinação inativada contra a gripe em qualquer estágio da gestação, a fim de prevenir o vírus. Para avaliar a segurança da vacina no desenvolvimento fetal, alguns parâmetros como o aborto espontâneo, a morte fetal, o parto prematuro, o peso do feto para a idade gestacional, a informação congênita e o baixo peso ao nascer da criança são avaliados. Associado a isso, a resposta inflamatória que pode estar relacionada aos efeitos adversos para o feto durante a infecção da gripe é uma consideração importante para a segurança da vacina contra influenza, especialmente na fase da embriogênese e no 1º trimestre de gestação quando o feto está mais exposto aos riscos (Ruedy, 1984; McCarthy et al., 2012).

Embora a imunogenicidade e a segurança da vacina tenham sido confirmadas, sabe-se que a vacina contra influenza induz uma forte ativação imune, podendo impactar na neurogênese jovem-adulta e na função cognitiva (Ziv and Schwartz, 2008, Gonzalez-Perez et al., 2010), porém poucas pesquisas investigaram os reais efeitos da imunização, particularmente, na saúde materna. Diante disso, a vacinação de gestantes visa alcançar dois alvos relevantes: proteger a grávida contra doenças infecciosas que podem afetar seriamente sua saúde e evitar a transmissão de uma infecção e/ou uma doença ao feto ou ao recém-nascido.

De modo geral, as concentrações maternas de anticorpos protetores podem passar através da placenta para o feto, especialmente durante o 3º trimestre de gestação. Nos recém-nascidos, estes anticorpos costumam ter um meio vivo igual a 3-4 semanas e progressivamente diminuem durante os primeiros 6-12 meses de vida, quando os programas de imunização para crianças já iniciaram (Grohskopf et al., 2014; Simon et al., 2015; Gabutti et al., 2017). Apesar dos benefícios resultantes da administração de vacinas em mulheres grávidas, ainda é evidente a relutância e/ou a recusa desta abordagem, em especial pelas gestantes, as quais desconfiam dos reais efeitos da imunização ou têm receios infundados de ações adversas das vacinas. Assim, a formulação de recomendações unânimes para imunizações de mulheres grávidas e durante a amamentação torna-se um desafio, uma vez que a base de evidências para orientar tais decisões é extremamente limitada, sendo que a maior parte dos dados relacionados à segurança das vacinas provém de inquéritos passivos (ACIP, 2008; Cassidy et al., 2016).

A OMS (2012; 2015) tem identificado mulheres grávidas e bebês como indivíduos com alto risco de morbidade e mortalidade pela doença gripal ou influenza. Foi demonstrado que a gripe sazonal aumenta o risco de hospitalização das gestantes, especialmente se contraída no 2º ou 3º trimestre de gravidez, aumenta o nascimento de crianças prematuras e com baixo peso ao nascer para a idade gestacional e leva ao risco aumentado de aborto. Estes riscos são ainda mais elevados se a grávida apresentar qualquer comorbidade associada, sendo a vacina contra a gripe uma recomendação fundamental para estas mulheres. A vacinação deve ser realizada antes do início da gripe, sendo a imunização de rotina recomendada para todas as mulheres grávidas ou que pretendem engravidar (Gabutti et al., 2017). Atualmente, a nível internacional, existem duas vacinas principais contra a gripe: vacinas inativadas (trivalentes: TIV e quadrivalentes: QIV), que podem ser utilizadas durante todas as fases da gravidez e, as vacinas vivas atenuadas (LAIV), as quais são contra-indicadas para gestantes. Por muito tempo, a imunização contra a gripe sazonal foi realizada por meio de vacinas TIV contendo 2 subtipos de vírus A e um tipo B. Mais recentemente, uma vacina QIV contendo 2 subtipos de vírus A e B, tornou-se disponível no mercado (FAQ, 2016).

De qualquer forma, os dados de segurança sobre o uso de vacinas contra a gripe na gestação e, em particular, durante o 1º trimestre permanecem limitados. Entretanto, até o momento, não foram relatados resultados adversos sobre a saúde materna ou fetal, nem qualquer malformação congênita atribuível à imunização realizada durante o 1º trimestre. McMillan et al. (2015) concluíram que a vacinação materna contra a gripe não está associada a um risco aumentado de morte fetal, aborto espontâneo ou malformações congênitas. Conclusão semelhante à de McMillan et al. (2015) foi sugerida por Fabiani et al. (2015) e Polyzos et al. (2015) em seus estudos, os quais também não verificaram efeitos adversos em fetos, cujas as mães receberam vacina contra influenza durante o 2º e 3º trimestre de gestação. Por conseguinte, ambas as revisões enfatizam que não é possível excluir totalmente o risco de danos ao feto, devido à imprecisão estatística, o desenho observacional e a heterogeneidade clínica e metodológica destas pesquisas. Portanto, estudos que investiguem, principalmente mulheres vacinadas durante o 1º trimestre de gravidez deve ser uma prioridade, a fim de permitir estimativas mais precisas e conclusivas quanto à segurança fetal.

Poucas evidências pré-clínicas têm observado os possíveis efeitos da vacinação contra influenza A na fase gestacional tanto na saúde materna como na prole jovem-adulta. Xia et al. (2014a) realizou dois estudos e, primeiramente avaliou a influencia da vacinação contra gripe (H1N1) no início da gestação, em especial, na neurogênese hipocampal e na memória espacial de animais gestantes. Neste estudo verificou que a vacinação, no 1º trimestre de gravidez,

contribuiu para a neurogênese hipocampal e melhorou a memória de trabalho nas gestantes (camundongos C57BL/6J fêmeas). Em seu segundo estudo, Xia et al. (2014b), observou uma resposta imune protetora na neurogênese e no comportamento da prole adulta destas fêmeas que foram vacinadas durante a gestação, sugerindo que os possíveis mecanismos de mediação do desenvolvimento do cérebro pós-natal podem ser influenciados por alterações nos níveis de citocinas e fatores de crescimento.

Diante de tudo, assim como os medicamentos são raramente testados para teratogenicidade em ensaios clínicos controlados, para a vacina contra influenza essa realidade também é predominante. Sabe-se que evidências de segurança são muitas vezes derivadas de estudos epidemiológicos (passivos), pequenos estudos descritivos, relato de casos individuais e poucas evidências pré-clínicas, o que pode causar preocupações quanto à qualidade das provas disponíveis sobre as recomendações para a prática clínica (Ruedy, 1984; McMillan et al., 2015). Devido à necessidade de pesquisas que avaliem os efeitos da vacinação contra influenza A durante a fase gestacional na prole jovem-adulta, estudos em animais se tornam essenciais.

Desta forma, sendo a PolyI:C capaz de induzir ativação pré-natal em roedores, a realização deste trabalho tem relevância, uma vez que avaliou tanto os efeitos da AIM como da vacina contra influenza A (H1N1) durante a gestação em parâmetros comportamentais e neuroquímicos na prole jovem-adulta, considerando os gêneros: fêmeas e machos.

1.3 Processos Neurais

O desenvolvimento adequado da placenta é essencial durante a gravidez, uma vez que essa constitui a interface entre as circulações materno-fetal, sendo fundamental para a nutrição e oxigenação do feto. Assim, durante a vida fetal ocorre o chamado período crítico do desenvolvimento, época de fragilidade na qual os tecidos e os órgãos se desenvolvem, em especial o cérebro (Nunes e Madhi, 2015). Neste sentido, a plasticidade neuronal permite que o cérebro se adapte estruturalmente perante mudanças ambientais ou agentes estressores, sendo a resposta imune periférica, um estressor neuroetiológico para este processo (Dantzer et al., 2008).

Um exemplo primordial de plasticidade é a neurogênese adulta, na qual novos neurônios são gerados durante toda a vida perante situações adversas (Cameron and McKay, 1999). No entanto, ainda não está claro como este processo é regulado fisiologicamente (Xia et al., 2014a). A neurogênese se caracteriza como o aspecto mais vital do SNC e ocorre em todas as áreas do cérebro durante o desenvolvimento, no entanto, há duas regiões neurogênicas

principais em mamíferos adultos: giro denteado (GD) do hipocampo, região diretamente envolvida na aprendizagem e memória, e a zona subventricular (SZV) ou bulbo olfatório (BO) (Wang et al., 2011; Wu et al., 2013). Em geral, a neurogênese ou crescimento dos neurônios existe em toda a área cerebral, mais predominantemente no GD hipocampal. Desta forma, a evolução do hipocampo é capaz de influenciar diretamente no aprendizado e memória (van Praag et al., 2002; Ron-Harel et al., 2008) e pode ser regulada por diversos fatores como citocinas, fatores de crescimento e de transcrição (Balu e Lucki, 2009).

Ademais, pesquisa indica que a neurogênese reduzida no BO pode causar déficits na discriminação olfatória (Bath et al., 2008), uma vez que o olfato tem sido identificado como um biomarcador importante para esquizofrenia e autismo (Atanasova et al., 2008). Estudo de neuroimagem demonstrou que o volume do BO em pacientes esquizofrênicos está diminuído (Nguyen et al., 2011), o que torna relevante investigar se as funções olfativas na prole jovem-adulta de mães expostas à AIM ou à vacina contra influenza encontram-se comprometidas (Liu et al., 2013).

Desse modo, investigar o efeito da AIM (PolyI:C), bem como da vacina contra influenza A durante a gestação na resposta comportamental e em parâmetros neuroquímicos na prole jovem-adulta tem uma ação primordial para a ciência, visto que ainda há carência de estudos e, pelo fato de que ambas são capazes de interferir diretamente no neurodesenvolvimento da prole, podendo inclusive, favorecer o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na vida pós-natal dos filhos.

2 JUSTIFICATIVA

Está bem descrito que a exposição pré-natal à infecção constitui um fator de risco para transtornos neurodesenvolvimentais na prole. De modo particular, a PolyI:C tem sido utilizada no 9º dia gestacional como um bom modelo animal de AIM capaz de induzir alterações comportamentais e neuroquímicas características da esquizofrenia na prole adulta (Meyer et al., 2009a,b; Meyer e Feldon, 2012; Hadar et al., 2015; Reisinger et al., 2015). A administração de PolyI:C em ratas *Wistar* durante a gravidez tem levado ao comprometimento da prole por aumentar a liberação de citocinas pró-inflamatórias na mãe (placenta e líquido amniótico) e no cérebro do feto (Boksa, 2010; Meyer e Feldon, 2012). A PolyI:C ainda induz uma resposta aguda a infecções virais, aumentando consideravelmente a liberação de interferons (IFN): IFN α e IFN γ (Winter et al., 2009).

É sabido que as mulheres grávidas são consideradas o grupo de risco mais importante para a vacinação contra a gripe ou influenza (H1N1) (McMillan et al., 2015). Isto pode ser explicado pelo fato das gestantes serem mais susceptíveis às pandemias de gripe, uma vez que durante a gravidez, a presença de uma infecção pode diminuir a proliferação celular, sobrevivência dos neurônios e causar mudanças comportamentais acentuadas na saúde materna e da prole, influenciando na incidência de transtornos psiquiátricos na vida jovem-adulta dos filhos (Cui et al., 2009; Shi et al., 2009; Liu et al., 2013; Babri et al., 2014).

No entanto, apesar da importância da vacinação em gestantes, percebe-se que o uso da vacina contra a gripe neste grupo continua limitado, uma vez que há preocupações sobre o seu efeito no desenvolvimento do feto e devido às suas possíveis ações teratogênicas (Ruedy, 1984; McMillan et al., 2015). De fato, os mecanismos bioquímicos pelos quais a vacina contra influenza A age e pode influenciar na saúde materna e no desenvolvimento do feto, podendo comprometer negativa ou favorecer positivamente na resposta comportamental materna e da prole na vida adulta (Xia et al., 2014a,b), ainda não foi totalmente esclarecido, o que justifica as investigações pré-clínicas, visto que estudos clínicos se mostram restritos.

Diante disso, investigar o efeito da AIM (PolyI:C), bem como da vacina contra influenza A durante a gestação na resposta comportamental e em parâmetros neuroquímicos na prole jovem-adulta apresenta relevância, visto que ainda há carência de estudos e, pelo fato de que ambas são capazes de interferir diretamente no neurodesenvolvimento da prole, podendo inclusive, favorecer o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na vida pós-natal dos filhos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da AIM (PolyI:C) e da vacina contra influenza A (H1N1) durante a gestação em parâmetros comportamentais e neuroquímicos na prole jovem-adulta, machos e fêmeas.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar parâmetros comportamentais de atividade locomotora, comportamento tipo-depressivo, discriminação olfatória e perfil cognitivo na prole jovem-adulta de ratas *Wistar* submetidas à vacinação contra influenza A (H1N1) e comparar esses parâmetros na prole de ratas induzidas à infecção com PolyI:C durante a gestação, considerando o gênero: ratos machos e fêmeas;

Avaliar os níveis de citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-4 e IL-10) nas estruturas cerebrais, BO, córtex frontal, hipocampo e estriado, na prole jovem-adulta de ratas *Wistar* submetidas à vacinação contra influenza A (H1N1) e comparar esses parâmetros na prole de ratas induzidas à infecção com PolyI:C durante a gestação, considerando o gênero: ratos machos e fêmeas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos e locais de realização da pesquisa

Este estudo se caracteriza como experimental, utilizando um modelo animal. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, Santa Catarina (SC), Brasil, sob o protocolo 038/2016-1 (Anexo 1). Os procedimentos foram executados de acordo com o Instituto Nacional de Guia de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) projetado para minimizar o sofrimento e limitar o número de animais utilizados. O desenvolvimento deste trabalho, desde os experimentos com os animais até os testes comportamentais e as análises bioquímicas, foi realizado no Laboratório de Psiquiatria Translacional da UNESC.

4.2 Animais e delineamento experimental das ratas mães

No total foram utilizadas 36 ratas *Wistar* adultas, pesando entre 250g a 300g, as quais passaram por uma única noite de acasalamento. Os animais foram obtidos do Biotério da Universidade e mantidos em gaiolas em ciclos de 12h dia-noite, com alimentação e água disponível e temperatura controlada entre $22 \pm 1^\circ \text{C}$. Cada fêmea foi mantida na mesma caixa com um macho ($n = 36$ machos) durante um ciclo de 48h. Na manhã do dia seguinte foi realizado um esfregaço vaginal para análise de seu conteúdo e diagnóstico de prenhez. A presença de um espermatozóide e as características do ciclo estral das fêmeas confirmou o diagnóstico e este representou o dia zero de gestação. Assim, as ratas gestantes foram divididas em 3 grupos de 12 animais cada ($n=12$) para administração do seu tratamento (Figura 1):

- **1) Grupo de ratas prenhas denominado grupo controle** ($n = 12$);
- **2) Grupo de ratas prenhas denominado grupo vacina (H1N1)** ($n = 12$);
- **3) Grupo de ratas prenhas denominado grupo Poly:IC** ($n = 12$).

4.2.1 Administração de salina, vacina contra influenza A (H1N1) e PolyI: C nas ratas gestantes

As ratas gestantes foram divididas em três grupos: **controle**, **vacina** e **PolyI:C** conforme mencionado acima. Sabe-se que o período de gestação para o rato e o ser humano é aproximadamente de 20 dias e 40 semanas, respectivamente. Portanto, cada dia de gestação de uma rata pode ser equivalente a um período de 2 semanas de gestação de um humano. Dada à importância desta analogia, pode-se concluir que a duração ou a gravidade da exposição ao estresse ou infecção durante a gravidez e o tempo de uma resposta inflamatória ou do estresse são fundamentais para determinar a natureza dos efeitos comportamentais ou neuroquímicos na prole em seus estágios de vida jovem-adulta (Enayati et al., 2012). Considerando o desenho experimental e os objetivos desta pesquisa, salienta-se que no 9º dia de gestação, o qual equivale ao 1º trimestre de gravidez em humanos, as ratas de cada grupo foram submetidas, uma única vez, ao seu tratamento específico.

No **grupo controle** foi aplicada uma solução salina estéril (cloreto de sódio – NaCl, 0,9%) conforme respectivo peso de cada animal no volume de 1ml/kg em dose única, via intraperitoneal (i.p.);

Nas ratas do **grupo vacina (H1N1)** foi administrada uma única dose de 0,1mL por animal da vacina contra influenza A (Instituto Butantan) do tipo trivalente (fragmentada e inativada), via i.p., sendo esta dose calculada com base no estudo realizado por Xia et al. (2014a).

Nas ratas do **grupo PolyI:C** foi realizada a administração de uma única injeção de PolyI:C (sal de potássio; *Sigma-Aldrich*, Brasil; P9582-5mg) na dose de 5 mg/kg, via intravenosa (i.v.). A PolyI:C foi diluída em solução isotônica de NaCl a 0,9% para alcançar uma concentração final de 1 mg/mL, baseando-se em um volume de 5mL/kg, conforme dados da literatura (Meyer et al., 2005; Meyer et al., 2006a, b).

4.2.2 Divisão dos experimentos em etapas

Em seguida à fase gestacional, os filhotes foram mantidos junto à mãe para a amamentação e 21 dias após o nascimento, os mesmos foram submetidos ao desmame e à sexagem, sendo separados em **machos e fêmeas**, conforme o **tratamento materno**. A prole de ambos os gêneros foi dividida em grupos, conforme a idade, para ser utilizada na fase jovem (30 dias) e na fase adulta (60 dias).

4.3 Animais e delineamento experimental da prole adulta: machos e fêmeas

Vinte e um dias após o nascimento, a prole foi submetida ao desmame e à sexagem, sendo separada conforme o gênero em **machos e fêmeas** e em grupos de acordo com o **tratamento materno: controle, vacina (H1N1) ou PolyI:C**.

Uma parte da prole, conforme os grupos maternos acima e gênero, foi utilizada aos 30 dias de vida e a outra parte dos animais foi utilizada ao atingir a idade adulta (60 dias). Para as análises comportamentais foram utilizados 10 animais machos e 10 fêmeas de cada grupo com 30 ou 60 dias de vida, totalizando 120 animais para o experimento, visto que foram três tratamentos maternos (**controle, vacina ou PolyI:C**). Ao completar a idade desejada, os animais foram submetidos aos testes comportamentais, os quais aconteceram em três dias, uma vez que não foi possível realizar todos os comportamentos no mesmo dia, devido ao tempo de duração dos testes e ao desgaste dos animais. Desta forma, o experimento com a prole de machos e fêmeas com 30 dias ou 60 dias, de cada grupo foi realizado da seguinte forma:

Dia 1: Atividade locomotora e *splash* teste;

Dia 2: Discriminação olfatória;

Dia 3: Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto (IPP) e, posteriormente, foi realizada a eutanásia dos animais.

Imediatamente após a realização do último teste comportamental, as proles de machos e fêmeas com 30 ou 60 dias foram decapitadas em guilhotina e, em seguida, as estruturas cerebrais dissecadas em córtex frontal, hipocampo, estriado e BO, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80C° para posteriores análises dos níveis de citocinas. Para estas análises foram necessárias amostras cerebrais de 7 animais machos e 7 fêmeas de cada grupo, a fim de se analisar as citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-4 e IL-10 – n=7). Foram utilizados 84 animais nesta etapa, sendo 42 machos e 42 fêmeas, de cada grupo experimental e com 30 ou 60 dias. O desenho experimental do estudo está representado na Figura 1.

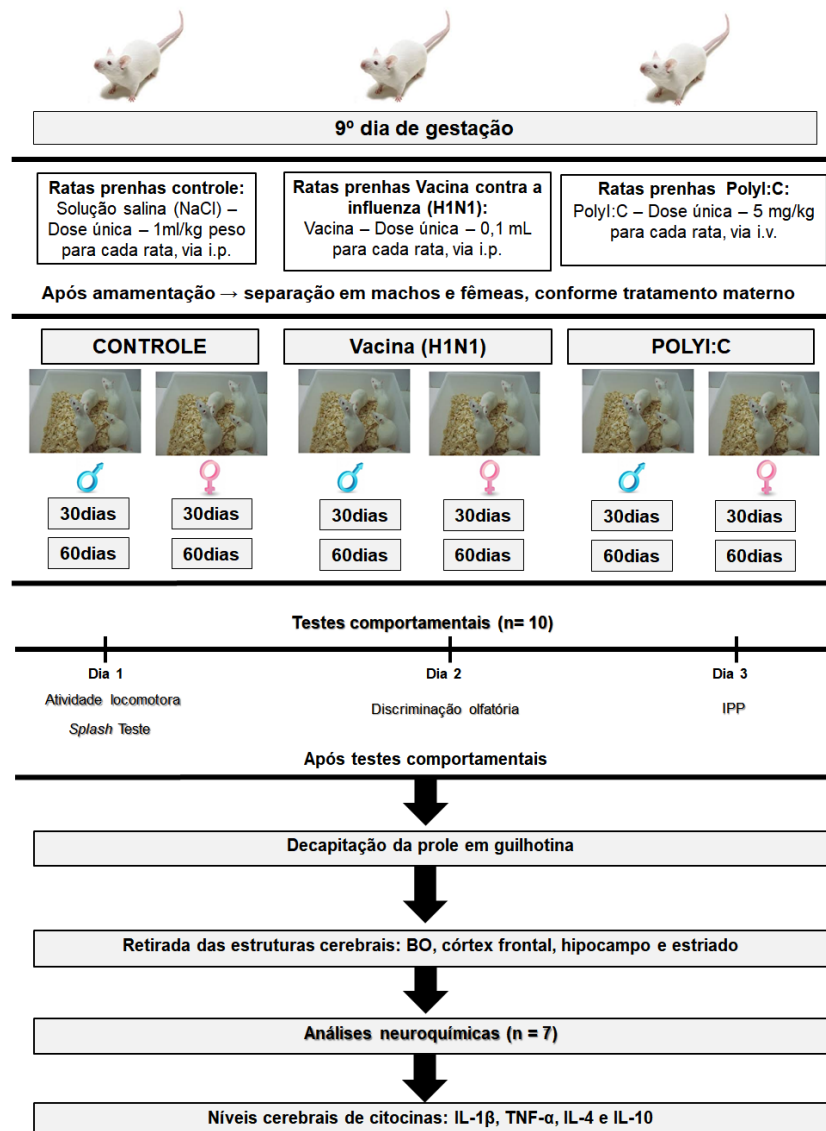


Figura 1: Desenho experimental dos testes comportamentais e análises neuroquímicas realizadas com a prole de 30 ou 60 dias, machos e fêmeas, cujo tratamento materno foi realizado com salina (controle), vacina (H1N1) ou PolyI:C. Fonte: Autor, 2019.

4.4 Testes Comportamentais

4.4.1 Atividade locomotora

Os animais foram submetidos à análise da sua capacidade locomotora e exploratória por meio do teste campo aberto (*open field*), o qual tem sido amplamente utilizado para mensurar parâmetros de emoção, exploração, atividade geral ou locomotora, medo e ansiedade dos animais (Courvoisier et al., 1996; Prut e Belzunc, 2003). Para tanto, o experimento aconteceu em uma sala escura com luz branda apenas na caixa, onde os ratos machos e fêmeas

foram individualmente inseridos em uma caixa de madeira na parte traseira e nas laterais e de vidro na parte da frente com dimensões (80 x 80 x 30 cm) dividida igualmente em 12 quadrantes. A avaliação comportamental considerou os seguintes parâmetros: atividade locomotora (*crossing* – número de cruzamentos) e a atividade exploratória através do número de *rearing* (número de movimentos de elevação da pata dianteira sem tocar as paredes do campo aberto – número de levantamentos – atividade vertical), sendo que os roedores foram avaliados durante 10 minutos (De Oliveira et al., 2009; Canever et al., 2010).

4.4.2 *Splash* teste

O *splash* teste tem por finalidade avaliar o comportamento anedônico dos roedores. Os animais foram colocados individualmente no campo aberto e o tempo gasto pelo animal com seu autocuidado, tempo total de limpeza (*grooming*) e o número de lambidas, foi cronometrado por um período de 5 minutos. Estes parâmetros de auto-limpeza representam um índice de autocuidado e comportamentos motivacionais e, quando reduzidos, podem ser comparáveis a sintomas tipo-depressivos, como o comportamento anedônico (Willner, 2005). Para isso, foi esguichada uma solução de sacarose a 10% sobre o dorso do rato, macho ou fêmea, antes de colocá-lo no campo aberto. A solução de sacarose foi levemente esguichada e espalhada manualmente pelo dorso, para que o animal não respingasse nas paredes ao se sacudir, enquanto estivesse dentro do campo aberto (Willner, 2005; Rosa et al., 2014). Depois de aplicar a solução de sacarose, o tempo total de limpeza, bem como o número de lambidas foi registrado. Foram considerados sinais de autocuidado, lambidas em todas as partes do animal, inclusive nas patas.

4.4.3 Discriminação olfatória

A discriminação olfatória avalia a capacidade dos roedores em diferenciar odores e, assim, o déficit olfatório do animal. O teste foi realizado conforme previamente descrito por Soffié e Lamberty (1988) e, posteriormente, modificado por Prediger et al. (2005a,b). Os animais foram mantidos em grupo por 48 horas na sua caixa habitual (42 x 34 x 17 cm), sem que ocorra a troca da maravalha (serragem da sua própria caixa), a fim de que haja uma padronização da impregnação do odor deste ambiente, considerado este o ambiente familiar (habitual) para os animais. A caixa de discriminação olfatória consiste em dois compartimentos (ambientes) idênticos (30 x 30 x 20 cm) separados por uma porta aberta que permite o acesso

dos animais para os dois compartimentos. O chão de um dos ambientes foi forrado com a maravalha retirada da gaiola, na qual o animal permaneceu por 48 horas (ambiente familiar ou habitual). Já o outro compartimento foi forrado com uma serragem limpa e inodora, sendo considerado o ambiente não familiar (ambiente novo) para o animal. O experimento consistiu em colocar o rato na caixa de discriminação olfatória e registrar durante um período de 5 minutos o tempo que o animal gastou investigando cada um dos compartimentos.

Prediger et al. (2005a,b) afirmam que os animais são capazes de distinguir o odor do compartimento familiar e não familiar, sendo geralmente comum gastarem mais tempo no ambiente familiar, uma vez que preferem seu próprio odor. Entretanto, se sabe que os roedores são animais de caráter exploratório, assim, a exploração do ambiente não familiar também pode ser considerado um comportamento padrão dos animais.

4.4.4 Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto (IPP)

A quantificação da inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto (IPP) foi realizada com base no protocolo descrito por Levin et al. (2011). Utilizou-se uma caixa de medida de sobressalto com vedação sonora (Insight, São Paulo, Brasil). O protocolo foi composto por 74 testes pseudo-randomizados, divididos em sete categorias distintas, apresentados com um intervalo de 20 segundos: 1) 20 apresentações de pulso sozinho (P) com uma intensidade de 120 dB por 50 ms; 2) 8 apresentações de cada intensidade de pré-pulso (PP) sozinho, intensidades de 70, 75 e 80 dB e 3000 Hz de frequência por 20 ms; 3) 10 apresentações de cada intensidade de PP + P, com um intervalo de 50 ms. A média da amplitude de sobressalto após as sessões de P, bem como a média da amplitude da resposta de sobressalto após as sessões de PP+P foram calculadas automaticamente para cada animal. O nível de IPP para cada animal foi determinado pela expressão da amplitude de sobressalto de PP+P, como uma redução percentual a partir da amplitude de sobressalto de P, sendo calculada de acordo com a seguinte equação: porcentagem (%) IPP = $100 - [(PP/P) \times 100]$. Desta forma, 0% correspondeu à ausência de diferença entre a amplitude de sobressalto após as sessões de P e PP+P e, conseqüentemente, à ausência de inibição da resposta de sobressalto. O resultado do % IPP, avalia a função sensório-motora dos animais, sendo que um maior % IPP representa um melhor desempenho cognitivo do animal no teste (Hoffman e Ison, 1980; Weiss e Feldon, 2001).

4.5 Análises Bioquímicas

4.5.1 Preparo das amostras cerebrais

Após a decapitação dos animais em guilhotina, os cérebros foram removidos e dissecados em BO, córtex frontal, hipocampo e estriado. As amostras foram dissecadas em uma superfície gelada, posteriormente mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C para posteriores análises bioquímicas, sendo preparadas de acordo com a técnica bioquímica a ser realizada.

4.5.2 Níveis cerebrais de citocinas

Para analisar os níveis cerebrais de citocinas, as amostras de córtex frontal, hipocampo, estriado e BO foram homogeneizadas em solução tampão fosfato com um coquetel inibidor de protease (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA*), centrifugado a $2300 \times g$ por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado para as determinações. Os níveis das citocinas IL-4 (*R & D Systems, Inc. – USA, Rat IL-4, DY504*); IL-10 (*Invitrogen by Thermo Fisher Scientific – USA, Mouse IL-10*); IL-1 β (*Invitrogen by Thermo Fisher Scientific – USA, Mouse IL-1 β*) e TNF α (*R & D Systems, Inc. – USA, Rat TNF α DY510*) da prole jovem-adulta foram determinados por meio de kits comerciais ELISA específicos para estas análises, conforme as recomendações do fabricante e apresentados a seguir.

As placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram incubadas durante a noite com o anticorpo de captura. Em seguida, foram lavadas três vezes com tampão fosfato de lavagem e, posteriormente, bloqueadas com uma solução tampão fosfato com albumina 1% durante 1 hora. Após, foram incubadas as amostras homogeneizadas e a curva padrão, diluídas em solução tampão, durante 2 horas. Seguidamente, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e incubadas com anticorpo de detecção por mais 2 horas. Depois das lavagens, foi incubada uma peroxidase conjugada com estreptavidina por 20 minutos, e após, o substrato (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina, 1:1) A reação foi finalizada pela adição de ácido sulfúrico 2N. As placas foram lidas à 450nm em espectrofotômetro.

4.5.3 Dosagem de proteínas

As proteínas foram mensuradas de acordo com o método de Lowry et al. (1951) e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

4.6 Análise Estatística

Os testes comportamentais, atividade locomotora, *splash* teste, discriminação olfatória e IPP, assim como as análises neuroquímicas de citocinas da prole jovem-adulta, fêmeas e machos, foram avaliados separadamente através da análise de variância (ANOVA) de uma via, corrigido pelo teste robusto de *Welch*, quando o teste de *Levene* foi $p < 0,05$, seguido pelo *post hoc Tukey* ou *C de Dunnet*, quando F foi significativo. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$. O teste de normalidade *Shapiro–Wilk* foi realizado para confirmar se os dados possuíam uma distribuição normal.

Em geral, os dados foram expressos como média (\pm) e erro padrão da média (média \pm E.P.M). As análises estatísticas foram realizadas através do programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS versão 20.0) e utilizou-se o programa *GraphPad Prism 5* para a elaboração dos gráficos.

5 RESULTADOS

5.1 Análises Comportamentais

5.1.1 Atividade Locomotora

A Figura 2 apresenta os resultados do teste campo aberto utilizado para avaliar a atividade locomotora por meio do número de cruzamentos (*crossing*) e a atividade exploratória através do número de levantamentos (*rearing*) da prole de fêmeas aos 30 dias (Fig. 2A e 2B) e 60 dias (Fig. 2C e 2D), cujas mães receberam os tratamentos salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Os resultados ilustrados nas Figuras 2A e 2B indicam que não houve diferença estatística para o número de cruzamentos [$F_{(2,21)} = 0,786$, $p = 0,478$] e levantamentos [$F_{(2,21)} = 3,038$, $p = 0,082$] entre as ratas fêmeas de 30 dias dos três grupos avaliados: controle, vacina e PolyI:C. As fêmeas de 60 dias do grupo vacina, entretanto, apresentaram menor número de cruzamentos [$F_{(2,23)} = 10,574$ $p < 0,05$] e levantamentos [$F_{(2,23)} = 7,399$ $p < 0,05$] quando comparadas ao grupo controle, conforme demonstrado nas Figuras 2C e 2D, respectivamente.

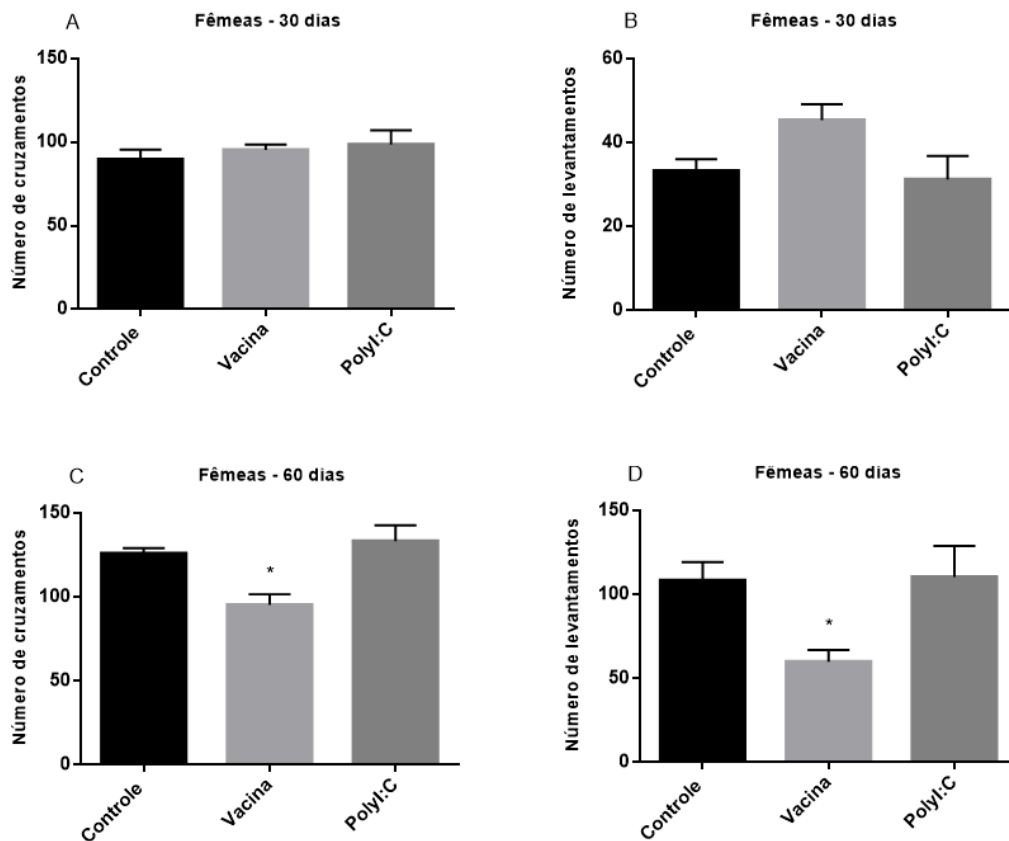


Figura 2: Atividade locomotora representada através do número de cruzamentos (*crossing*) (Fig. 2A e 2C) e número de levantamentos (*rearing*) (Fig. 2B e 2D) realizado pela prole de fêmeas aos 30 e 60 dias de vida, respectivamente, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$ $n = 10$. *diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2019.

A Figura 3 aponta os resultados relacionados ao número de cruzamentos e levantamentos da prole de machos aos 30 dias (Fig. 3A e 3B) e 60 dias (Fig. 3C e 3D), cujas mães receberam os tratamentos salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. As Figuras 3A e 3B indicam que não houve diferença significativa para o número de cruzamentos [$F(2,25) = 2.431$, $p = 0,108$] e levantamentos [$F(2,25) = 0.608$, $p = 0,552$] entre os machos de 30 dias, independentemente do tratamento materno. Para os ratos machos de 60 dias, de acordo com a Figura 3D, também não se observou diferença estatística para o número de levantamentos nos grupos vacina [$F(2,23) = 3.381$, $p < 0,05$] e PolyI:C [$F(2,23) = 1.547$, $p = 0,234$]. Entretanto, os ratos do grupo PolyI:C [$F(2,23) = 1,547$, $p = 0,234$] apresentaram maior número de cruzamentos quando comparados ao grupo controle, confirmando uma hiperlocomoção destes animais, cujas mães receberam PolyI:C durante a gestação (Fig. 3C).

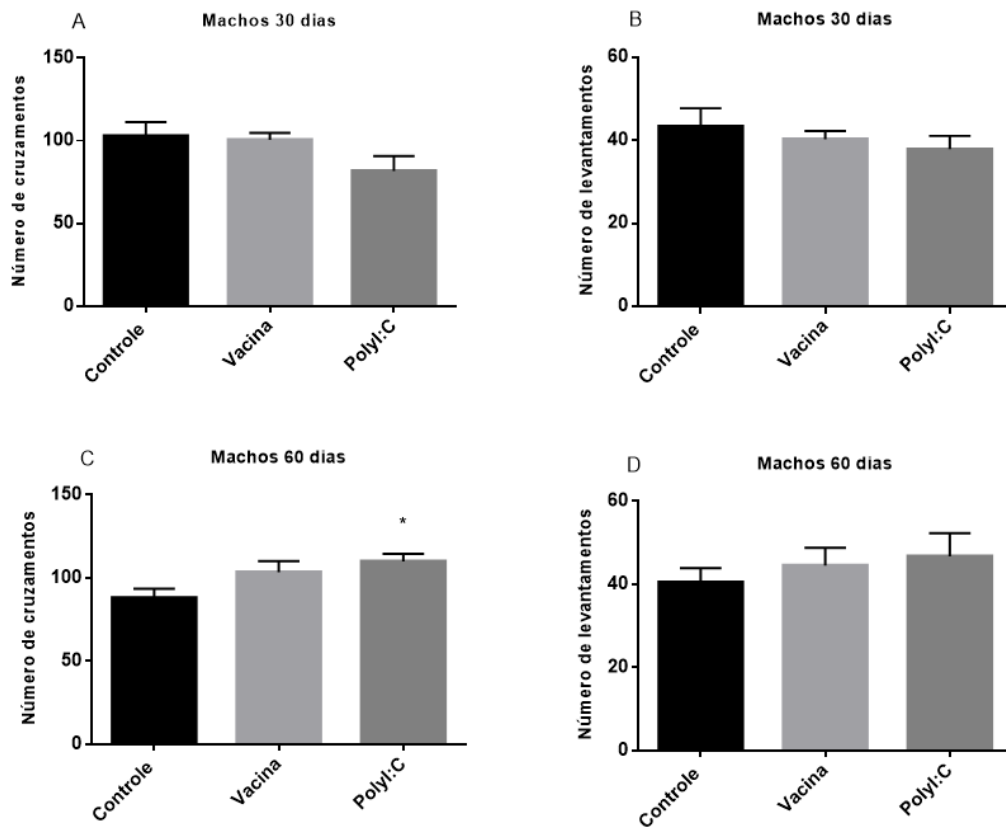


Figura 3: Atividade locomotora representada através do número de cruzamentos (*crossing*) (Fig. 3A e 3C) e levantamentos (*rearing*) (Fig. 3B e 3D) realizado pela prole de machos aos 30 e 60 dias de vida, respectivamente, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 10$. *diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2019.

5.1.2 *Splash* Teste

A Figura 4 apresenta os resultados comportamentais do *splash* teste realizado com ratas fêmeas de 30 dias (Fig. 4A e 4B) e 60 dias (Fig. 4C e 4D), cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Esse teste foi avaliado em dois parâmetros: tempo total de limpeza e o número de lambidas, os quais indicam o índice de autocuidado dos animais e, quando diminuídos, podem ser comparados a sintomas tipo-depressivos, como o comportamento anedônico. De modo geral, as Figuras 4A e 4C, respectivamente, retratam que não houve diferença significativa entre as fêmeas de 30 e 60 dias dos grupos vacina [$F_{(2,18)} = 2.326$, $p = 0,141$] e PolyI:C [$F_{(2,21)} = 1.485$, $p = 0,267$] para o tempo total de limpeza, bem como para o número de lambidas das ratas fêmeas dos grupos vacina [$F_{(2,18)} = 0.364$, $p = 0,702$] e PolyI:C [$F_{(2,21)} = 1.437$, $p = 0,269$], conforme representado nas Figuras 4B e 4D, respectivamente.

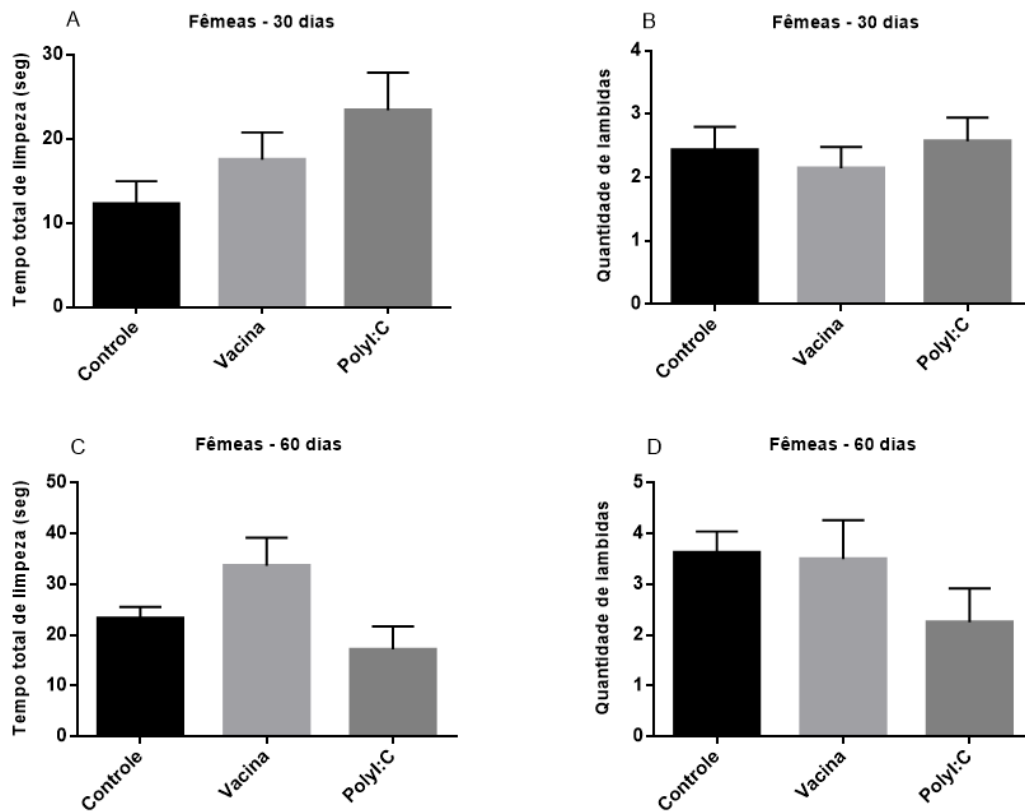


Figura 4: Representação do *splash* teste nas ratas fêmeas em dois parâmetros: tempo total de limpeza (Fig. 4A e 4C) e número ou quantidade de lambidas (Fig. 4B e 4D) realizado pela prole de ratas fêmeas aos 30 e 60 dias de vida, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n=10$. *diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2018.

A Figura 5 demonstra os resultados do *splash* teste em ratos machos de 30 dias (Fig. 5A e 5B) e 60 dias (Fig. 5C e 5D), cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. A Figura 5A aponta uma diferença significativa para os ratos machos de 30 dias do grupo vacina para o tempo total de autocuidado [$F_{(2,21)} = 7.221$, $p < 0,05$], os quais apresentaram maior tempo de limpeza em relação ao grupo controle, sugerindo uma maior preocupação com seu autocuidado. Quanto ao número de lambidas dos animais, representado na Figura 5B, verifica-se que não houve diferença estatística para os machos de 30 dias dos grupos controle, vacina e PolyI:C.

Os ratos machos de 60 dias do grupo PolyI:C apresentaram menor tempo total de limpeza [$F_{(2,22)} = 11.551$, $p < 0,05$] (Fig. 5C) em relação ao grupo controle, indicando menor preocupação com seu autocuidado. A Figura 5D retrata uma diferença significativa para os ratos machos de 60 dias dos grupos vacina [$F_{(2,21)} = 1.624$, $p = 0,221$] e PolyI:C [$F_{(2,22)} = 9.713$, $p < 0,05$], os quais apresentaram menor número de lambidas em relação ao grupo controle. Em

geral, esses achados parecem indicar um comportamento tipo-depressivo, particularmente na prole cujas mães sofreram AIM (PolyI:C), visto que os ratos machos adultos (60 dias) não demonstraram preocupação com seu autocuidado (menor tempo total de limpeza e número de lambidas).

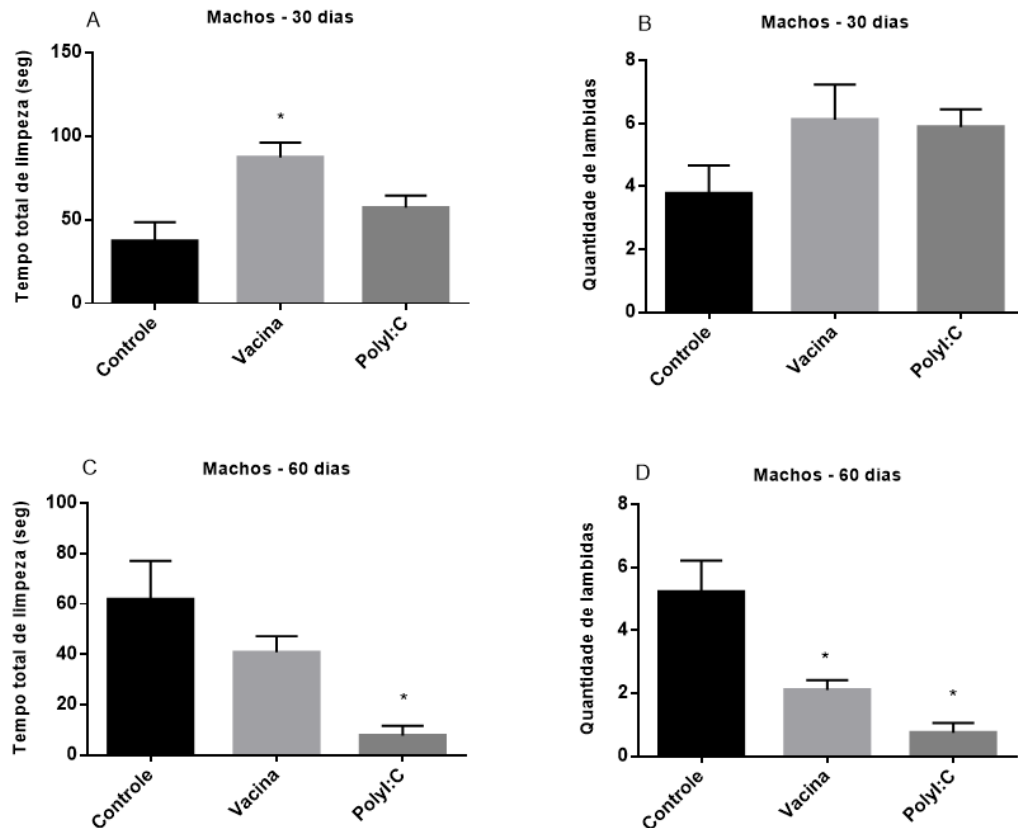


Figura 5: Representação do *splash* teste nos ratos machos em dois parâmetros: tempo total de limpeza (Fig. 5A e 5C) e número ou quantidade de lambidas (Fig. 5B e 5D) realizado pela prole de ratas fêmeas aos 30 e 60 dias de vida, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n=10$. *diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2019.

5.1.3 Discriminação Olfatória

A Figura 6 representa os parâmetros avaliados no teste de discriminação olfatória (tempo gasto no ambiente familiar e não familiar), bem como o número de cruzamentos (trocas de ambiente) da prole de fêmeas aos 30 dias (Fig. 6A e 6C) e 60 dias (Fig. 6B e 6D), respectivamente, cujas mães receberam os tratamentos salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. A Figura 6A mostra que as fêmeas de 30 dias dos grupos controle, vacina e PolyI:C permaneceram mais tempo no ambiente familiar quando comparado ao não familiar, mostrando uma diferença estatística dos animais no tempo de permanência entre os ambientes.

Este achado pode ser considerado um comportamento normal para roedores, os quais podem preferir o ambiente do seu próprio odor [$F_{(1,47)}=45.2$, $p<0,01$]. De acordo com a Figura 6B, se observa uma diferença estatística entre o tempo de permanência no ambiente familiar e não familiar [$F_{(1,40)} = 32.58$, $p<0,01$] para as fêmeas de 60 dias dos grupos vacina e PolyI:C, as quais gastaram mais tempo no ambiente não familiar.

Quanto ao número de cruzamentos, as Figuras 6C e 6D respectivamente, demonstram que as fêmeas de 30 dias do grupo vacina, bem como as fêmeas de 60 dias dos grupos vacina e PolyI:C apresentaram maior número de cruzamentos quando comparadas ao grupo controle: [$F_{(2,25)} = 2.468$, $p<0,01$] e [$F_{(2,20)} = 8.222$, $p<0,05$], respectivamente. Tal dado sugere uma maior locomoção das fêmeas destes grupos entre os ambientes familiar e não familiar, indicando uma maior capacidade exploratória dos animais. As fêmeas de 60 dias do grupo controle não permaneceram mais tempo em um ambiente especificamente, o que pode estar relacionado a um possível prejuízo olfatório das ratas.

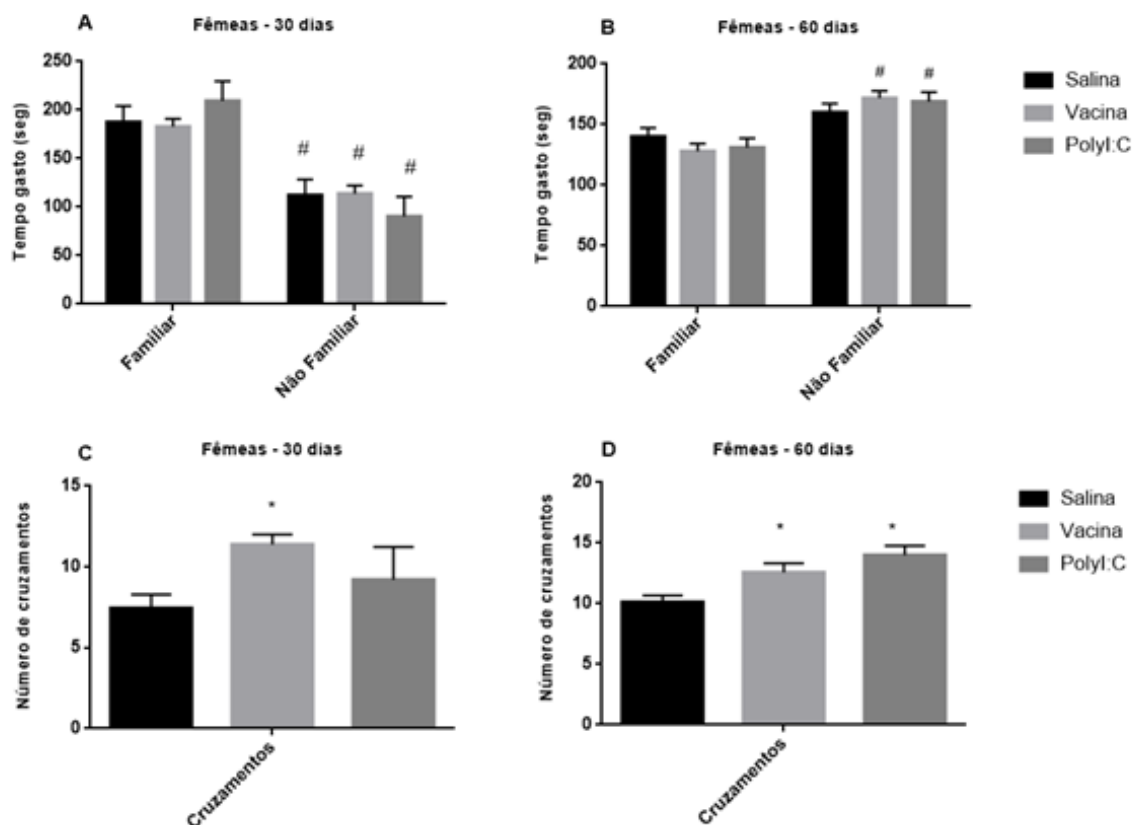


Figura 6: Representação dos parâmetros avaliados no teste de discriminação olfatória da prole jovem e adulta, de fêmeas cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou PolyI: C durante a gestação. Figuras 6A e 6B retratam o tempo gasto no ambiente familiar e não familiar pela prole e as Figuras 6C e 6D representam o número de cruzamentos realizado pelas ratas fêmeas aos 30 e 60 dias de vida, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p<0,05$, $n=10$. *diferente do grupo controle; # diferente do seu respectivo grupo comparando o ambiente familiar e não familiar nos animais do mesmo gênero. Fonte: Autor, 2019.

A Figura 7 aponta os parâmetros avaliados no teste de discriminação olfatória, bem como o número de cruzamentos da prole de machos aos 30 dias (Fig. 7A e 7C) e 60 dias (Fig. 7B e 7D), respectivamente, cujas mães receberam os tratamentos salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação.

A Figura 7A demonstra que houve diferença significativa entre o tempo de permanência no ambiente familiar e não familiar para os ratos machos de 30 dias dos grupos controle, vacina e PolyI:C [$F_{(1,48)} = 125.9$, $p < 0,01$], os quais gastaram mais tempo no ambiente familiar quando comparado ao não familiar. Para os ratos machos de 60 dias, conforme Figura 7B, também houve diferença significativa entre o tempo de permanência no ambiente familiar e não familiar para todos os grupos avaliados [$F_{(1,52)} = 102.6$, $p < 0,01$], indicando uma mudança de comportamento nos animais adultos, os quais permaneceram mais tempo no ambiente não familiar, o que pode ser considerado um parâmetro comportamental padrão (exploratório) de roedores.

As Figuras 7C e 7D apontam uma diferença significativa quanto ao número de cruzamentos para os ratos machos de 30 dias do grupo vacina [$F_{(2,24)} = 2.728$, $p < 0,05$] (Fig. 7C) e os machos de 60 dias do grupo PolyI:C [$F_{(2,24)} = 3.674$, $p < 0,05$] (Fig. 7D), os quais apresentaram maior locomoção quando comparados ao grupo controle, sugerindo maior caráter exploratório destes animais. Convém ressaltar que os machos de 60 dias do grupo PolyI:C apresentaram maior número de cruzamentos e gastaram mais tempo no ambiente não familiar, o que pode estar relacionado a atividade locomotora alterada nos animais adultos do grupo PolyI:C.

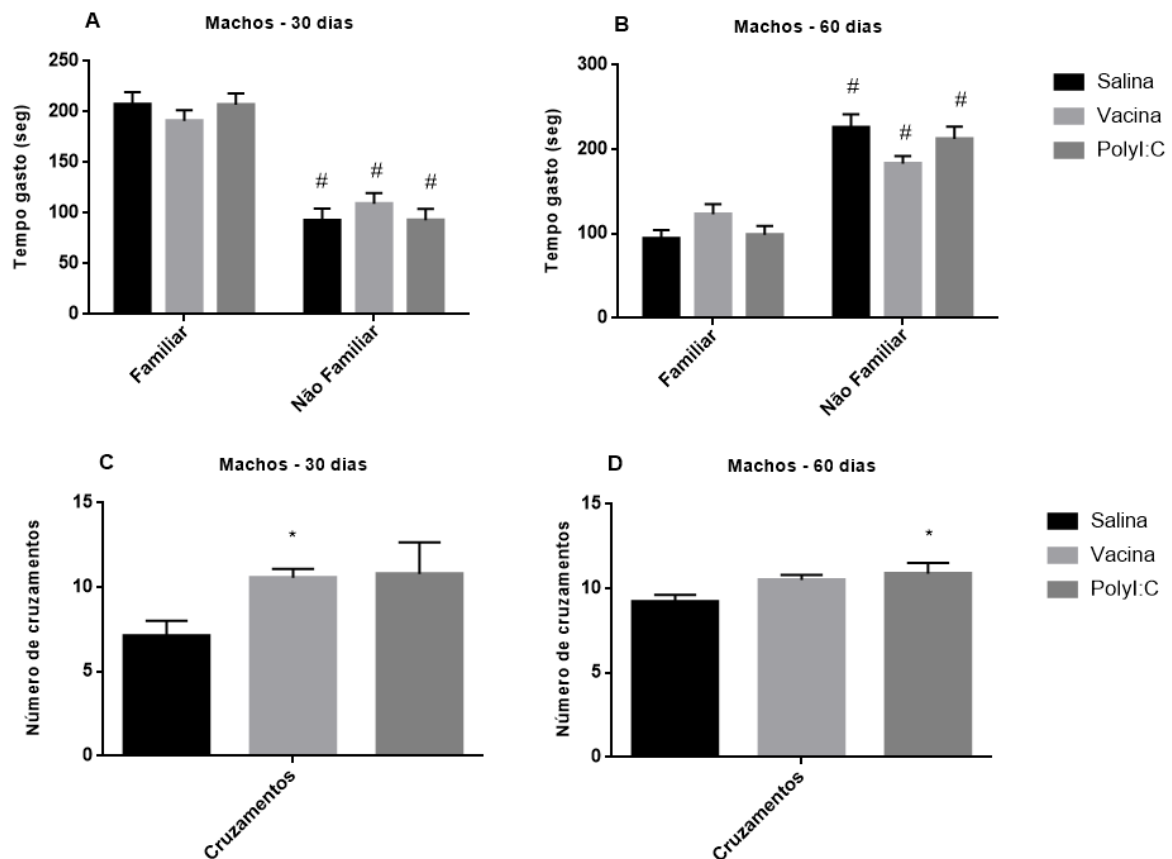


Figura 7: Representação dos parâmetros avaliados no teste de discriminação olfatória da prole jovem e adulta de machos cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou PolyI: C durante a gestação. Figuras 7A e 7B retratam o tempo gasto no ambiente familiar e não familiar pela prole e as Figuras 7C e 7D representam o número de cruzamentos (*crossing*) realizado pelos ratos machos aos 30 e 60 dias de vida, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 10$. *diferente do grupo controle; # diferente do seu respectivo grupo comparando o ambiente familiar e não familiar nos animais do mesmo gênero. Fonte: Autor, 2019.

5.1.4 Inibição por Pré-Pulso do Reflexo de Sobressalto (IPP)

A Figura 8 retrata os resultados da função sensório-motora, a partir do teste IPP, das ratas fêmeas de 30 e 60 dias (Fig. 8A e 8B) e dos ratos machos de 30 e 60 dias (Fig. 8C e 8D), cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. De acordo com a Figura 8A e 8B, respectivamente, não houve diferença significativa para as fêmeas de 30 dias (Fig. 8A): 65 dB [$F_{(2,24)} = 1.233$, $p = 0,309$], 70 dB [$F_{(2,24)} = 15.163$, $p < 0,09$] e 75 dB [$F_{(2,24)} = 1.703$, $p = 0,755$] e para as fêmeas de 60 dias (Fig. 8B): 65dB [$F_{(2,19)} = 1.562$, $p = 0,236$], 70 dB [$F_{(2,18)} = 8.726$, $p = 0,07$] e 75 dB [$F_{(2,20)} = 1.992$, $p = 0,163$] no perfil sensório-motor.

A Figura 8C demonstra que nenhuma diferença estatística foi observada para os ratos machos de 30 dias nas três intensidades testadas: 65dB [$F_{(2,24)} = 0,304$, $p = 0,741$], 70 dB [$F_{(2,24)}$

= 0,365; $p=0,698$] e 75 dB [$F(2,22) = 1,468$ $p=0,252$]. Todavia, para os ratos machos de 60 dias do grupo vacina, conforme a Figura 8D, houve diferença significativa nas três intensidades avaliadas: 65dB [$F(2,22) = 12,974$, $p \leq 0,01$], 70dB [$F(2,20) = 7,740$, $p \leq 0,01$] e 75dB [$F(2,17) = 12,366$, $p \leq 0,01$]. Em geral, os machos de 60 dias do grupo vacina apresentaram um aumento no percentual de IPP quando comparados ao grupo controle, sugerindo um bom desempenho cognitivo destes animais adultos.

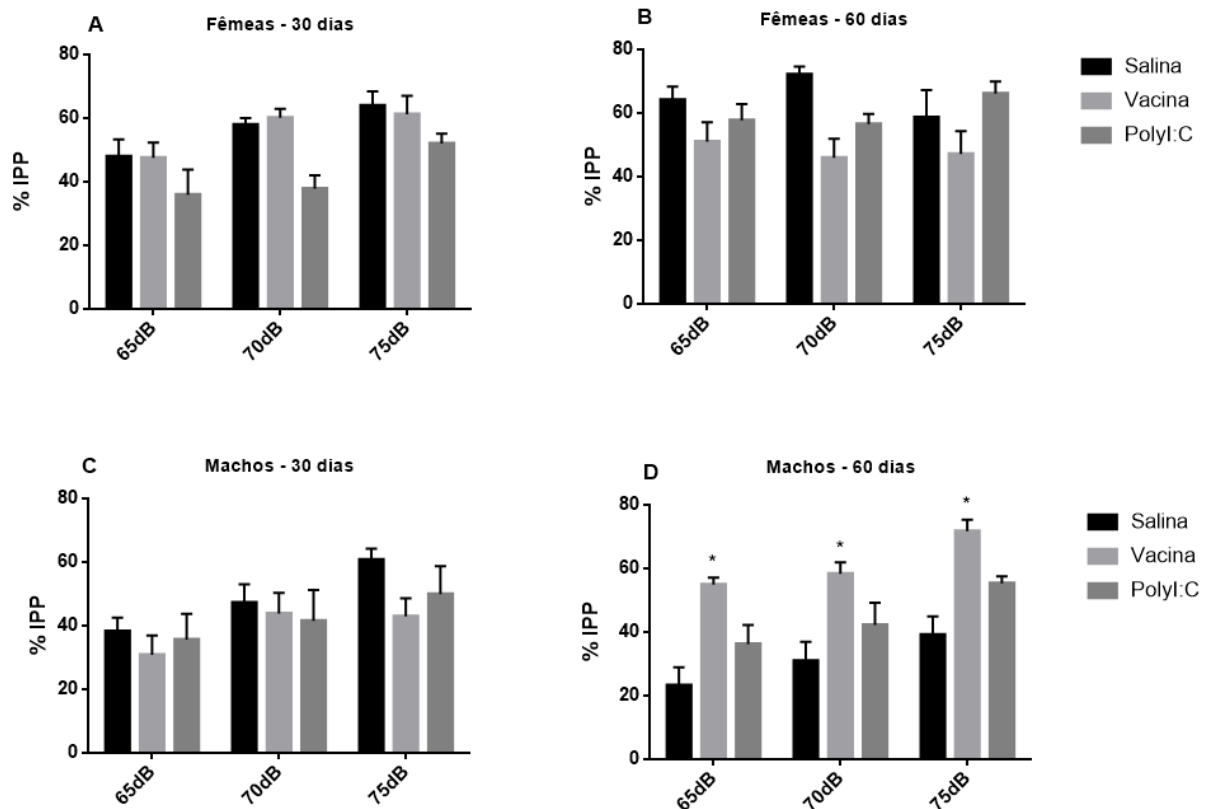


Figura 8: Função sensorio-motora, a partir do teste de IPP, na prole fêmea (Fig. 8A e 8B) e de machos (Fig. 8C e 8D) aos 30 e 60 dias de vida, respectivamente, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n=10$. *diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2019.

5.2 Análises Bioquímicas

5.2.1 Níveis Cerebrais de Citocinas

A Figura 9 apresenta os resultados referentes aos níveis cerebrais de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β (Fig. 9A e 9B) e TNF α (Fig. 9C e 9D), nas ratas fêmeas de 30 e 60 dias, respectivamente, cujas mães foram tratadas com salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Para as fêmeas de 30 dias do grupo PolyI:C, se observou uma diferença significativa

nos níveis de IL-1 β no BO [$F_{(2,9)} = 439.880$, $p < 0,01$] e estriado [$F_{(2,9)} = 5.632$, $p < 0,05$], pois houve um aumento dessa citocina pró-inflamatória nestas estruturas cerebrais (Fig. 9A). Também se verificou maiores concentrações de TNF α no estriado das ratas fêmeas de 60 dias do grupo PolyI:C [$F_{(2,12)} = 0.793$, $p < 0,05$], revelando um aumento da inflamação nessa região cerebral (Fig. 9D).

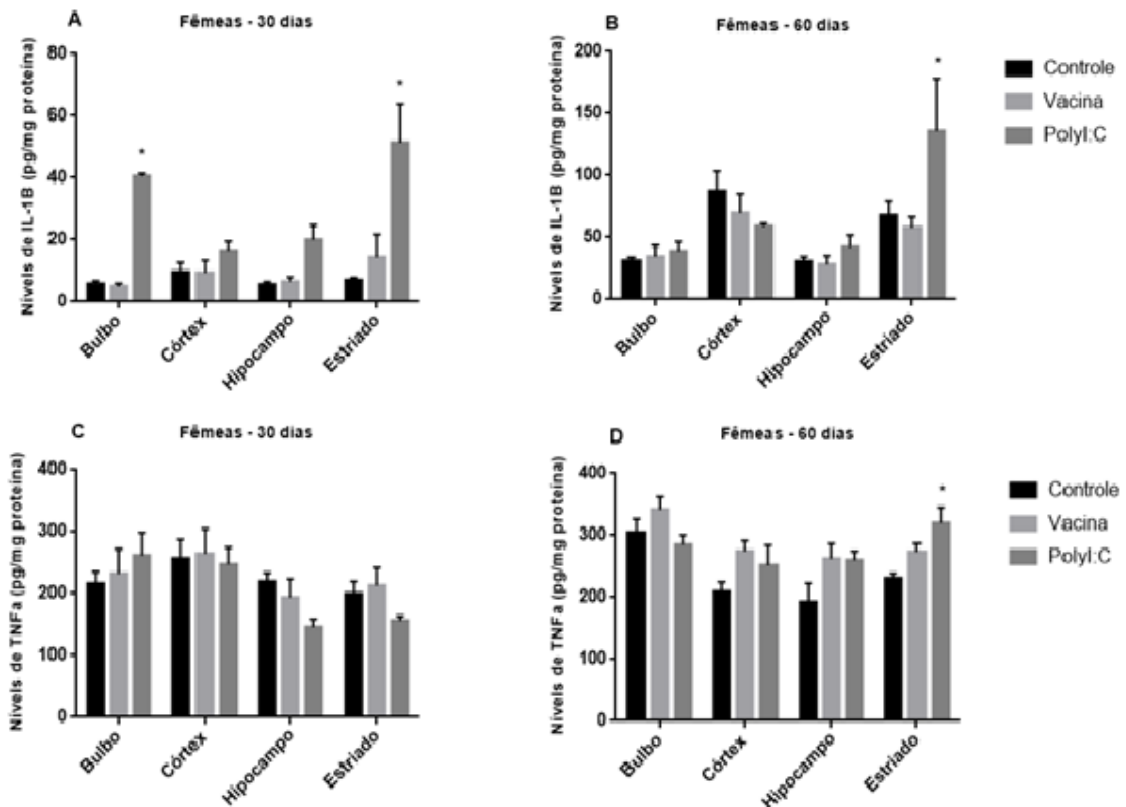


Figura 9: Análise dos níveis de IL-1 β (Fig. 9A e 9B) e de TNF α (Fig. 9C e 9D) nas estruturas cerebrais: BO, córtex frontal, hipocampo e estriado da prole de fêmeas aos 30 e 60 dias, cujas mães receberam os tratamentos: salina, Vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 7$. *diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2019.

Na Figura 10 são apresentados os níveis cerebrais de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β (Fig. 10A e 10B) e TNF α (Fig. 10C e 10D), nos ratos machos de 30 e 60 dias, respectivamente, cujas mães foram tratadas com salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Para os ratos machos de 30 dias do grupo PolyI:C (Fig. 10A) se observou uma diferença estatística para os níveis de IL-1 β no córtex frontal [$F_{(2,11)} = 7.009$, $p < 0,05$], hipocampo [$F_{(2,13)} = 2.291$, $p < 0,05$] e estriado [$F_{(2,10)} = 5.873$, $p < 0,05$], estruturas cerebrais em que houve redução dos níveis desta citocina pró-inflamatória quando comparado ao grupo controle. De modo similar, houve uma diminuição nas concentrações de IL-1 β no córtex

cerebral [$F_{(2,11)} = 7.009$, $p < 0,05$] de ratos machos de 30 dias do grupo vacina (Fig. 10A). Ainda se verificou um aumento nos níveis de TNF α no córtex cerebral [$F_{(2,12)} = 3.588$, $p < 0,05$] de ratos machos de 30 dias do grupo PolyI:C (Fig. 10C), o que indica uma neuroinflamação, ao menos nessa área cerebral, nestes animais jovens.

Para os ratos machos de 60 dias do grupo vacina, a Figura 10B demonstra que houve uma diferença significativa nos níveis de IL-1 β no BO [$F_{(2,12)} = 3.965$, $p < 0,05$], córtex frontal [$F_{(2,9)} = 4.119$, $p < 0,05$] e estriado [$F_{(2,11)} = 3.258$, $p < 0,05$] dos animais adultos, apontando uma diminuição nos níveis desta citocina pró-inflamatória nas três estruturas cerebrais avaliadas quando comparado ao grupo controle.

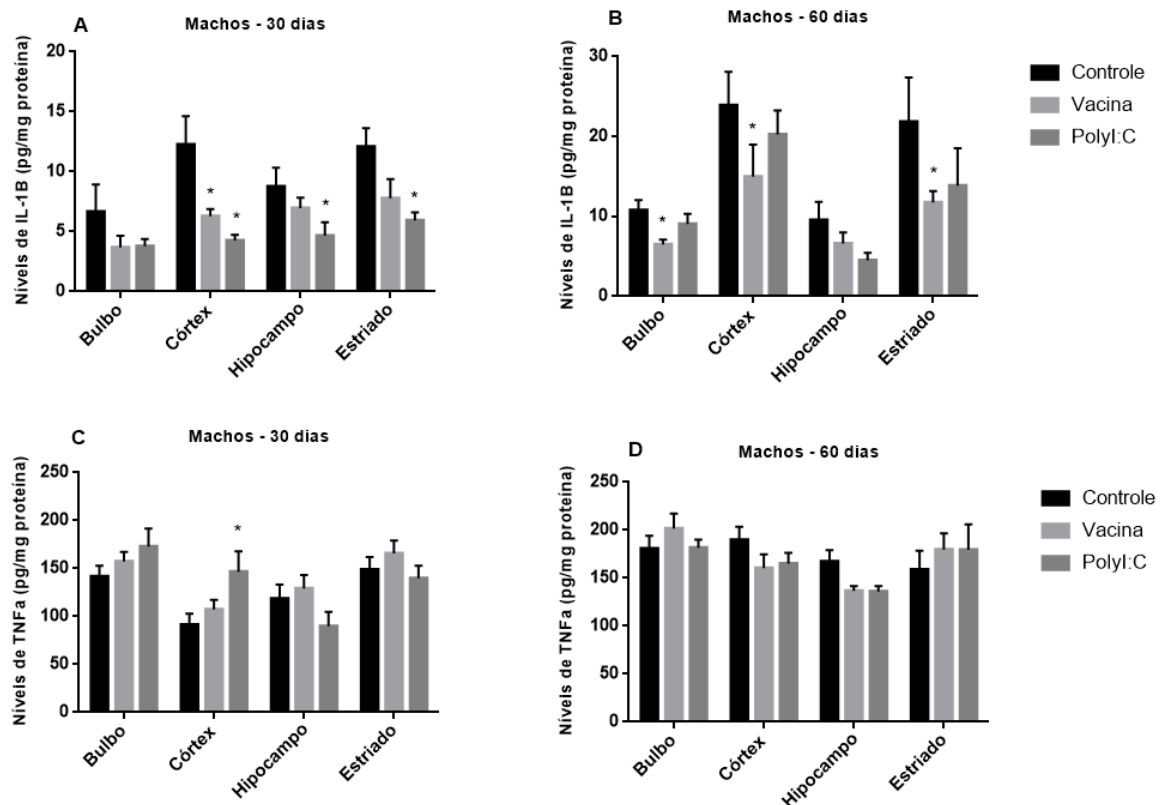


Figura 10: Análise dos níveis de IL-1 β (Fig. 10A e 10B) e de TNF α (Fig. 10C e 10D) nas estruturas cerebrais: BO, córtex frontal, hipocampo e estriado da prole de machos aos 30 e 60 dias, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 7$. *diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2019.

Os dados das citocinas anti-inflamatórias estão representados na Figura 11, a qual aponta os níveis de IL-4 (Fig. 11A e 11B) e de IL-10 (Fig. 11C e 11D) nas ratas fêmeas de 30 e 60 dias, respectivamente, cujas mães receberam salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Em geral, houve uma diferença estatística nos níveis de IL-4 hipocampal [$F_{(2,14)} = 5.488$, $p < 0,05$] apenas para as ratas fêmeas de 60 dias do grupo vacina (Fig. 11B) quando

comparado ao grupo controle, uma vez que houve aumento nos níveis desta citocina anti-inflamatória. As ratas fêmeas de 30 dias do grupo vacina também apresentaram um aumento nas concentrações de IL-10 [$F_{(2,12)} = 5.964$, $p < 0,05$] no córtex frontal, conforme ilustrado na Figura 11C. Nas fêmeas de 60 dias (Fig. 11D), nesta mesma estrutura cerebral, foi observada uma diminuição nos níveis de IL-10 para os animais dos grupos vacina e PolyI:C [$F_{(2,9)} = 7.103$, $p < 0,05$].

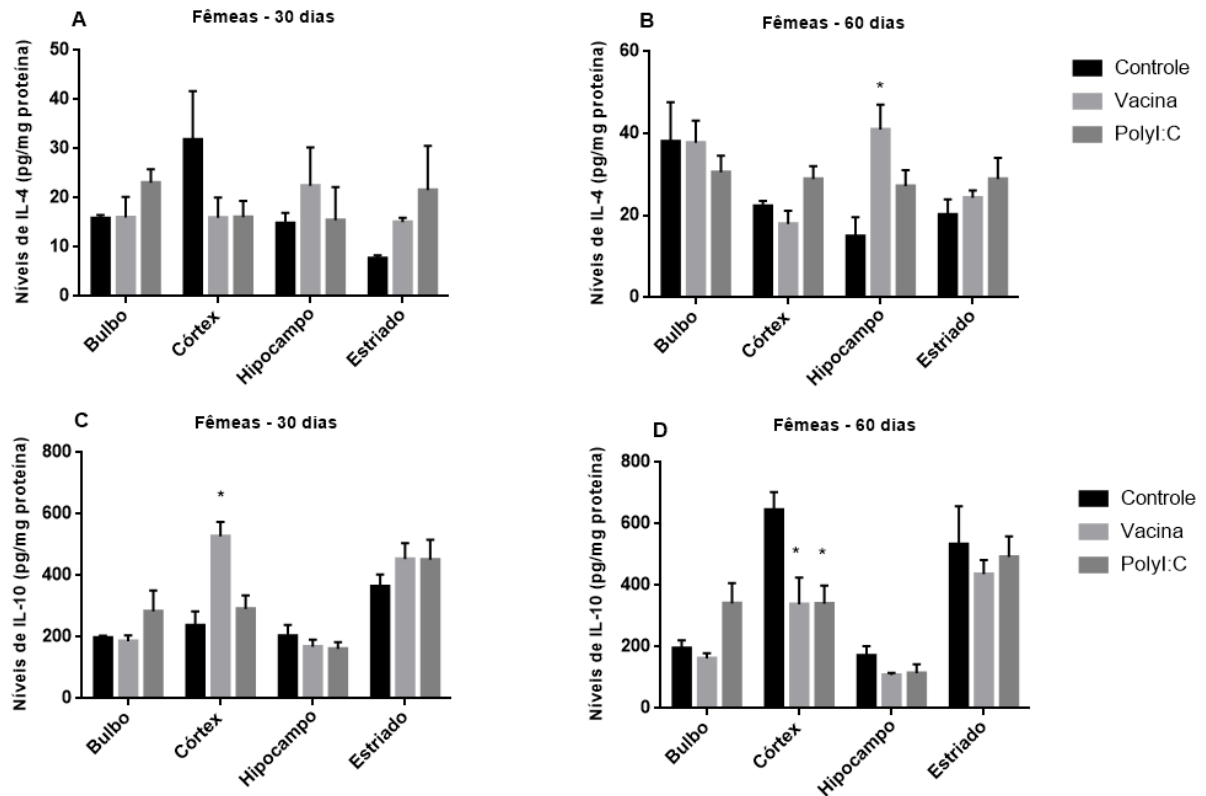


Figura 11: Análise dos níveis de IL-4 (Fig. 11A e 11B) e de IL-10 (Fig. 11C e 11D) nas estruturas cerebrais: BO, córtex frontal, hipocampo e estriado da prole de fêmeas aos 30 e 60 dias, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 ou PolyI:C durante a gestação. Os valores foram expressos como média ± EPM, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 7$. *diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2019.

A Figura 12 retrata as concentrações cerebrais de IL-4 (Fig. 12A e 12B) e IL-10 (Fig. 12C e 12D) nos ratos machos de 30 e 60 dias, respectivamente, cujas mães foram tratadas com salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Conforme apontado na Figura 12C houve diferença estatística para os machos de 30 dias quanto aos níveis de IL-10, os quais diminuíram nos animais dos grupos vacina e PolyI:C, respectivamente, no BO [$F_{(2,14)} = 3.514$, $p < 0,05$] e córtex cerebral [$F_{(2,12)} = 8.350$, $p < 0,05$].

Para os ratos machos de 60 dias, a Figura 12B indica uma redução significativa nos níveis de IL-4 no córtex frontal [$F_{(2,13)} = 6,766$ $p < 0,05$] e estriado [$F_{(2,14)} = 6.714$, $p < 0,05$] dos

animais do grupo PolyI:C. Também se observou uma diminuição nos níveis de IL-4 [$F_{(2,14)} = 6.714, p < 0,05$] e IL-10 [$F_{(2,8)} = 4.678, p < 0,05$], porém apenas no estriado, de ratos machos adultos do grupo vacina em relação ao grupo controle.

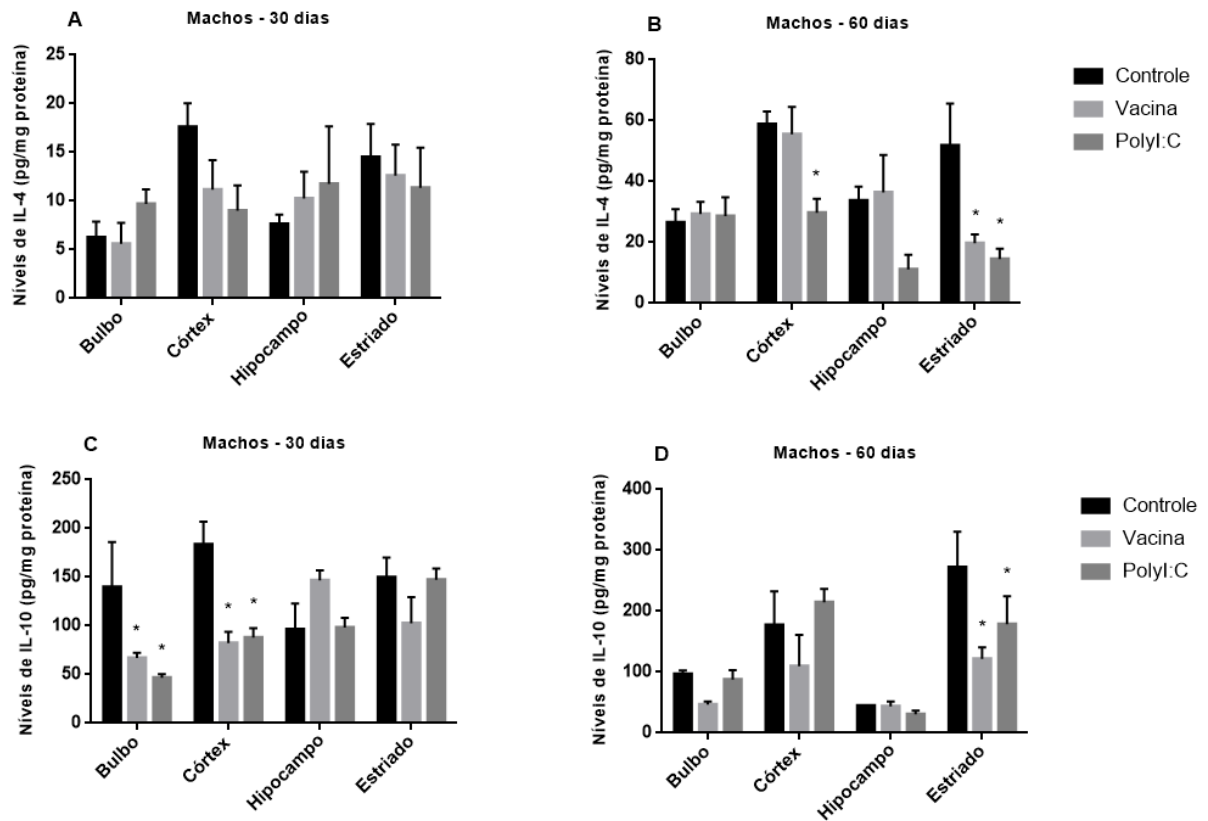


Figura 12: Análise dos níveis de IL-4 (Fig. 12A e 12B) e de IL-10 (Fig. 12C e 12D) nas estruturas cerebrais: BO, córtex frontal, hipocampo e estriado da prole de machos aos 30 e 60 dias, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Os valores foram expressos como média ± EPM, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 7$. *diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2019.

5.3 Resumo dos resultados comportamentais e neuroquímicos dos animais

As Tabelas 1 e 2 apresentam o resumo dos resultados obtidos nos testes comportamentais de atividade locomotora (AL), *Splash test*, discriminação olfatória (DO) e IPP, bem como dos níveis de citocinas nas estruturas cerebrais, bulbo olfatório (B), córtex frontal (C), hipocampo (H) e estriado (E) das ratas fêmeas (Tabela 1) e dos ratos machos (Tabela 2) de 30 e 60 dias.

Tabela 1: Resumo dos resultados dos testes comportamentais (AL, *Splash test*, DO e IPP) e das citocinas nas estruturas cerebrais B, C, H e E de ratas fêmeas de 30 e 60 dias.

FÊMEAS	AL		Splash		DO			IPP			IL-1 β				TNF α				IL-4				IL-10				
	C	L	T	Q	F	NF	C	65	70	75	B	C	H	E	B	C	H	E	B	C	H	E	B	C	H	E	
Controle ♀ 30 dias					↑																						
Controle ♀ 60 dias																											
Vacina ♀ 30 dias					↑		↑																		↑		
Vacina ♀ 60 dias	↓	↓				↑	↑														↑					↓	
PolyI:C ♀ 30 dias					↑							↑		↑													
PolyI:C ♀ 60 dias						↑	↑							↑				↑								↓	

Lista de abreviaturas: atividade locomotora (AL), discriminação olfatória (DO); C= cruzamentos; L= levantamentos; F= familiar; NF= não familiar; 65, 70 e 75dB; bulbo olfatório (B), córtex frontal (C), hipocampo (H) e estriado (E).

De acordo como os resultados comportamentais das ratas de 30 e 60 dias se observou que as fêmeas não foram capazes de reproduzir o modelo de AIM através da PolyI:C, contrariamente aos animais machos. Quanto às citocinas, houve um aumento nos níveis de IL-1 β no BO e estriado das ratas fêmeas de 30 e 60 dias, um aumento nas concentrações de TNF- α no estriado de ratas fêmeas de 60 dias, além de uma redução nos níveis de IL-10 no córtex frontal de ratas de 30 dias do grupo PolyI:C. As ratas fêmeas do grupo vacina de 60 dias apresentaram aumento nas concentrações de IL-4 no hipocampo e redução de IL-10 no córtex frontal, enquanto nas fêmeas de 30 dias houve aumento nos níveis de IL-10.

Tabela 2: Resumo dos resultados dos testes comportamentais (AL, *Splash test*, DO e IPP) e das citocinas nas estruturas cerebrais B, C, H e E de ratos machos de 30 e 60 dias.

MACHOS	AL		Splash		DO			IPP			IL-1 β				TNF α				IL-4				IL-10				
	C	L	T	Q	F	NF	C	65	70	75	B	C	H	E	B	C	H	E	B	C	H	E	B	C	H	E	
Controle ♂ 30 dias					↑																						
Controle ♂ 60 dias						↑																					
Vacina ♂ 30 dias			↑		↑		↑					↓												↓	↓		
Vacina ♂ 60 dias				↓		↑		↑	↑	↑	↓	↓	↓										↓				↓
PolyI:C ♂ 30 dias					↑						↓	↓	↓		↑								↓	↓			
PolyI:C ♂ 60 dias	↑		↓	↓		↑	↑															↓	↓			↓	

Lista de abreviaturas: atividade locomotora (AL), discriminação olfatória (DO); C= cruzamentos; L= levantamentos; F= familiar; NF= não familiar; 65, 70 e 75dB; bulbo olfatório (B), córtex frontal (C), hipocampo (H) e estriado (E).

Os achados ainda sugerem que a prole de machos adulta (60 dias) demonstrou uma melhor resposta em mimetizar o modelo animal de AIM (Tabela 2). A PolyI:C administrada nas mães induziu hiperlocomoção e um comportamento tipo-depressivo na prole de machos adultos e foi capaz de reduzir os níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) em diversas estruturas cerebrais da prole de machos, particularmente, no BO e córtex frontal de

ratos de 30 dias; córtex frontal e estriado de machos de 60 dias. A PolyI:C também aumentou as concentrações de TNF- α no córtex frontal de ratos machos de 60 dias.

Os ratos machos de 60 dias do grupo vacina demonstraram um aumento no percentual de IPP (65, 70 e 75dB), sugerindo que a vacinação materna com H1N1 pode ter melhorado a função cognitiva destes animais. Todavia, de modo geral, o presente estudo não verificou um melhor desempenho comportamental nos testes avaliados para a prole adulta cujas mães receberam a vacina.

Embora as citocinas pró-inflamatórias tenham respondido de modo diferente em machos e fêmeas de 30 e 60 dias, em resumo, a prole exibiu redução nas citocinas anti-inflamatórias, o que confirma a influencia da AIM (PolyI:C) na vida pós-natal, tanto em parâmetros neuroquímicos como comportamentais, particularmente nos machos. Está bem descrito que AIM via PolyI:C é capaz de gerar neuroinflamação, desse modo, pode-se salientar que as estruturas cerebrais córtex frontal e estriado parecem ter sido as mais vulneráveis ao efeito da PolyI:C materna, visto que tais regiões mostraram respostas imunes mais expressivas na prole jovem-adulta.

Para as citocinas pró e anti-inflamatórias na prole de fêmeas e machos jovem-adulta de mães vacinadas com H1N1 também não se encontrou um padrão óbvio para tais marcadores, os quais mostraram diferentes respostas entre machos e fêmeas aos 30 e 60 dias, sendo que as principais alterações inflamatórias foram observadas novamente no córtex frontal e estriado. Diante de tudo, torna-se evidente que as citocinas sofrem importantes alterações na vida pós-natal e, possivelmente, a vacinação materna regula os níveis desses marcadores, os quais parecem ser influenciados pela idade, gênero e estrutura cerebral avaliada na prole.

6 DISCUSSÃO

Estudos sugerem que a injeção pré-natal de PolyI:C induz a hiperfunção dopaminérgica subcortical e o comprometimento cognitivo na prole, representando um modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia em roedores (Macedo et al., 2012; Ozawa et al., 2006). Desse modo, está bem consolidado que a exposição pré-natal à infecção constitui um importante fator de risco para a esquizofrenia (Hadar et al., 2015; Reisinger et al., 2015) e, com base nestas evidências, modelos de AIM como a PolyI:C têm sido utilizados para mimetizar alterações comportamentais e neuroquímicas da esquizofrenia em animais (Piontkewitz et al., 2012). O presente estudo avaliou parâmetros comportamentais de atividade locomotora, comportamento tipo-depressivo (*splash* teste), discriminação olfatória e perfil sensório-motor (IPP), além dos níveis cerebrais de citocinas na prole jovem (30 dias) e adulta (60 dias) de ratas *Wistar* submetidas à AIM com PolyI:C ou à vacinação contra influenza A (H1N1) durante a fase gestacional, considerando ainda os gêneros: fêmeas e machos.

A prole de ratos machos e fêmeas de 30 e 60 dias cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) e PolyI:C durante a gestação foi avaliada quanto aos parâmetros comportamentais de atividade locomotora e exploratória por meio do campo aberto. Por meio deste teste, foi verificado que as fêmeas de 60 dias do grupo vacina exibiram menor número de cruzamentos e levantamentos quando comparadas ao grupo controle, indicando uma menor atividade locomotora e exploratória, respectivamente, das fêmeas adultas. Moreno et al. (2011) verificaram que ratos nascidos de mães infectadas pelo vírus influenza na gestação apresentaram déficits na atividade locomotora e exploratória, o que parece corroborar ao menos em parte, os achados do presente estudo, uma vez que Moreno et al. (2011) relacionam a hipolocomoção como uma habituação anormal a um ambiente novo da prole de mães vacinadas com a influenza. Por outro lado, Xia et al. (2014a,b) constataram um aumento na atividade locomotora e no número de levantamentos na prole jovem (28 dias) de camundongos C57BL/6J cujas mães receberam vacina (H1N1 A) inativada ou vacina influenza sazonal.

Por conseguinte, nenhuma alteração significativa no número de cruzamentos e levantamentos foi observada nos ratos machos de 30 e 60 dias do grupo vacina. Klein e colegas (2012) afirmam que os homens iniciam respostas humorais menos expressivas, manifestando menos reações adversas às vacinas contra a gripe sazonal do que as mulheres, o que confirma que machos e fêmeas respondem diferentemente às vacinas contra a gripe. Modelos animais mostraram que a imunidade elevada após a vacinação em fêmeas conduz a uma maior proteção

cruzada contra novos vírus da gripe em comparação aos machos. Em adição, os hormônios esteróides sexuais, incluindo estradiol e testosterona, bem como as particularidades genéticas entre os gêneros pode desempenhar importante papel na modulação das diferenças sexuais (Schwendener et al., 2009; Weinstock, 2007) quanto às respostas imunes tanto à infecção pelo vírus da gripe como à vacinação contra influenza (Klein et al., 2012).

Moreno et al. (2011) afirmam ser comum pacientes com esquizofrenia exibirem agitação psicomotora como hiperatividade ou aumento dos movimentos estereotípicos (Powell e Miyakawa, 2006). Adicionalmente, está bem descrito que a ativação imune pré-natal via PolyI:C pode desencadear transtornos neurodesenvolvimentais na prole jovem-adulta, inclusive sintomas característicos da esquizofrenia em modelos animais (Meyer e Feldon, 2012). No presente estudo, os ratos machos de 60 dias do grupo PolyI:C apresentaram um aumento no número de cruzamentos, o que corresponde a uma hiperlocomoção dos animais adultos, achado consistente às evidências acima relatadas. Resultado similar foi encontrado por Howland et al. (2012), o qual observou que o tratamento materno com PolyI:C aumentou significativamente a atividade locomotora na prole adulta. Para confirmar tais achados, Koshibu et al. (2004) salientam que a PolyI:C pré-natal induz alterações comportamentais na prole (sintomas positivos, negativos e cognitivos) semelhantes às observadas na esquizofrenia, todavia, reforçam que tais características parecem ser totalmente manifestadas apenas na prole adulta, o que condiz ao resultado obtido nesta pesquisa, em que o tratamento materno com PolyI:C induziu hiperlocomoção apenas nos ratos machos de 60 dias.

Além disso, em roedores, a fase pré-puberal também conhecida como periadolescência pode ser avaliada no período pós-natal entre os dias 28 e 35 de vida, ao passo que o dia 56 de vida marca o início da fase pós-puberal (Koshibu et al., 2004). Baseado no fato de que os sintomas da esquizofrenia geralmente iniciam no final da adolescência ou início da vida adulta, investigar a prole jovem-adulta se torna relevante, pois fornece um meio valioso para avaliar os efeitos da AIM durante o período pré-puberal (isto é, fase prodrômica), bem como na vida adulta dos animais (Macedo et al., 2012).

Pode-se afirmar ainda que a inflamação no cérebro fetal ou neonatal é capaz de alterar o desenvolvimento subsequentemente às funções cerebrais, o que pode estar implicado em transtornos neurodesenvolvimentais (Hagberg et al., 2012). De modo geral, a exposição materna à PolyI:C pode induzir alterações cerebrais que afetam os processos neuronais (Li et al., 2012) e, conforme observado neste estudo, podem ter contribuído para a hiperlocomoção na prole adulta. Alterações nos sistemas de neurotransmissores, incluindo glutamato, GABA,

serotonina e dopamina nos circuitos neuronais foram propostas para sustentar as mudanças comportamentais após a AIM (Meyer e Feldon, 2009). De fato, mudanças dinâmicas no sistema dopaminérgico nas áreas estriatal e mesencéfalo, após a AIM no início da gestação, estão relacionadas às alterações na atividade locomotora em camundongos jovem-adultos (Vuillermot et al., 2010). No entanto, ainda não está claro se estas mudanças na atividade locomotora também são causadas pelo processamento interrompido em circuitos do córtex pré-frontal medial (Meyer e Feldon, 2009). É sabido que essa região cerebral está envolvida nas respostas comportamentais, porém a AIM também se estende às áreas estriais e límbicas (Meyer e Feldon, 2009; Piontkewitz et al., 2012), o que demanda mais pesquisas que especifiquem as semelhanças e distinções entre os mecanismos neurobiológicos subjacentes às consequências cognitivas e comportamentais da AIM (Howland et al., 2012).

Yee et al. (2011) descrevem que o modelo de AIM, inicialmente desenvolvido como um modelo neurodesenvolvimental para a esquizofrenia, parece ser relevante para o humor e / ou transtornos afetivos como a depressão. De fato, estudos realizados em camundongos demonstram que a AIM via PolyI:C causou anormalidades comportamentais como a diminuição da exploração ao campo aberto (Smith et al., 2007), menor interação social (Smith et al., 2007; Bitanhirwe et al., 2010) e redução do consumo de sacarose pelos animais (Bitanhirwe et al., 2010). Tais alterações são consistentes ao comportamento tipo-ansioso-depressivo e, diante disso, Yee et al. (2011) confirmam que a AIM pode ser estendida para além do modelo de esquizofrenia.

Desta forma, neste estudo também foi avaliado um parâmetro comportamental tipo-depressivo por meio do *splash* teste, o qual retrata o índice de autocuidado (*grooming*) dos animais e, conseqüentemente, sintomas característicos de depressão em roedores. Os ratos machos de 60 dias do grupo PolyI:C não demonstraram preocupação com seu autocuidado, pois exibiram diminuição no tempo total de limpeza e menor número de lambidas quando comparados ao grupo controle. Tais achados indicam um comportamento tipo-depressivo na prole de machos adultos cujas mães sofreram AIM (PolyI:C) e corroboram, em parte, ao estudo conduzido por Babri et al. (2014), o qual avaliou o efeito da ativação pré-natal por LPS no comportamento tipo-depressivo em duas linhagens de camundongos (NMRI *swiss-type mice* e C57BL/6). A pesquisa verificou que a AIM foi capaz de mimetizar o comportamento de depressão na prole de camundongos NMRI *swiss* no teste nado forçado, porém não alterou o comportamento em camundongos C57BL/6 (Babri et al., 2014).

Em adição, Enayati et al. (2012) demonstraram que a exposição materna ao LPS em estágios tardios da gestação (15, 16 e 17 semanas) foi capaz de aumentar os níveis de depressão (nado forçado) nos ratos machos na fase jovem (40 dias) e adulta (80 dias), diferindo, mas também se assemelhando ao presente estudo, em que apenas os ratos adultos (60 dias) do grupo PolyI:C apresentaram comportamento tipo-depressivo. Este achado converge às evidências apontadas por Weinstock (2007), o qual confirma que a presença de um agente estressor na fase gestacional, como a infecção materna, é capaz de comprometer o desenvolvimento do sistema límbico e do eixo HPA fetal, resultando em comportamento tipo-depressivo, além de desencadear déficits de aprendizagem e atenção na vida jovem-tardia da prole.

Convém ressaltar que não foi observado alteração no índice de autocuidado e, portanto, qualquer sintoma tipo-depressivo nas ratas fêmeas de 30 e 60 dias dos grupos vacina e PolyI:C. Todavia, os dados do presente estudo quanto ao comportamento tipo-depressivo e gênero divergem da literatura, uma vez que as fêmeas quando comparadas aos machos, mostram maior gravidade no comportamento tipo-depressivo com o aumento da idade (Salari et al., 2010; Enayati et al., 2012). Weinstock (2007) salienta que estas características podem variar conforme gênero, intensidade e momento em que as mães sofrem o estresse pré-natal e ainda dependem dos testes comportamentais avaliados na prole. Ademais, os machos parecem ser mais vulneráveis ao estresse pré-natal, o que implica em déficits cognitivos na vida tardia, enquanto as fêmeas são mais propensas ao desenvolvimento de transtornos afetivos quando expostas ao estresse pós-natal ou ao estresse no decorrer da vida (Weinstock, 2007). Ademais, evidências sugerem que o aumento da idade se correlaciona a um maior nível de ansiedade e depressão em humanos e roedores (Genn et al., 2003; Schulz et al., 2007), o que condiz aos resultados observados no *splash* teste, em que ratos machos adultos do grupo PolyI:C manifestaram comportamento tipo-depressivo.

A presente pesquisa também verificou que os animais machos de 30 dias do grupo vacina apresentaram um maior tempo total de limpeza em relação ao grupo controle, sugerindo uma preocupação com seu autocuidado. Em contrapartida, os animais machos de 60 dias do grupo vacina exibiram uma diminuição no número de lambidas e, portanto, um possível comportamento tipo-depressivo. É sabido que o estresse materno, particularmente, aumenta os níveis de corticosterona e diminui a testosterona no cérebro-fetal de machos e altera a atividade das catecolaminas no cérebro das fêmeas. Neste sentido, os gêneros podem diferir quanto à sensibilidade das áreas cerebrais em desenvolvimento e aos hormônios sexuais e do estresse

(Weinstock, 2007; Schwendener et al., 2009), manifestando diferentes respostas mediante à exposição de uma mesma situação estressora.

De fato, Schwendener et al. (2009) apontam um aumento do comportamento relacionado ao medo na prole adulta de fêmeas, mas não nos animais machos (camundongos C57BL/6). Ainda, a PolyI:C é capaz de alterar o comportamento pós-natal materno, em especial o cuidado das mães para com a prole após o nascimento. Schwendener et al. (2009) sugerem que o comportamento de medo nas fêmeas está relacionado ao fato destas serem mais sensíveis às influências negativas no cuidado materno, o qual desencadeou um estresse pós-natal nestes animais em comparação aos machos. Consistente a estes achados, Weinstock (2007) observou que o comportamento de ansiedade, medo e depressão se apresenta mais intenso na vida tardia de ratas fêmeas estressadas logo após o nascimento que nos machos. Os animais machos cujas mães foram expostas a agentes estressores na fase gestacional apresentam mais déficits no desempenho cognitivo quando comparado às fêmeas. Estes achados indicam que os machos são mais vulneráveis ao estresse pré-natal, enquanto as fêmeas são mais propensas ao desenvolvimento de transtornos afetivos quando expostas ao estresse pós-natal ou no decorrer da vida (Weinstock, 2007). No presente estudo, não foi realizada comparação estatística entre machos e fêmeas, porém foi perceptível que os machos tiveram uma melhor resposta em mimetizar o modelo animal de AIM, uma vez que os resultados obtidos nos testes campo aberto e *splash* mostraram, respectivamente, uma hiperlocomoção e um comportamento tipo-depressivo nos ratos machos adultos (60 dias) do grupo PolyI:C.

No teste de discriminação olfatória foi observado que os animais fêmeas e machos de 30 dias dos grupos controle, vacina e PolyI:C permaneceram mais tempo no ambiente familiar. Na vida adulta (60 dias), as fêmeas, com exceção do grupo controle, bem como os ratos machos de todos os grupos apresentaram mudança comportamental, visto que gastaram mais tempo no ambiente não familiar. Este tipo de comportamento pode ser considerado normal para os animais do grupo controle e, possivelmente, para os animais do grupo vacina, devido ao padrão exploratório de roedores. Segundo Prediger et al. (2005a,b) os animais são capazes de distinguir o odor do compartimento familiar e não familiar, sendo geralmente comum gastarem mais tempo no ambiente familiar, uma vez que preferem seu próprio odor. Todavia, sabe-se que os roedores têm caráter exploratório, assim, a exploração do ambiente não familiar também pode ser considerada um comportamento padrão dos animais. Em contrapartida, o tempo de permanência semelhante em ambos os ambientes familiar e não familiar, como ocorreu com as fêmeas de 60 dias do grupo controle, está associado ao prejuízo no déficit olfatório, visto que

neste caso, os animais não optam por permanecer mais tempo em um dos dois compartimentos (Prediger et al., 2005a,b).

Diante do achado obtido para as ratas fêmeas adultas do grupo controle cujas mães receberam o tratamento (solução salina) durante a gestação, algumas hipóteses poderiam explicar tal dado: fatores como a manipulação e a própria injeção das mães, o local de realização do teste comportamental com a prole, além do gênero dos animais devem ser considerados, uma vez que machos e fêmeas podem responder de forma diferente ao mesmo estímulo materno, apesar de ser no grupo controle. Tudo isso pode ter desencadeado uma resposta adversa na vida pós-natal da prole controle e, assim, interferir no desempenho comportamental (funções olfativas) em particular nas fêmeas, o que pode ao menos em parte, justificar o provável déficit olfatório encontrado nestas ratas, incluindo os possíveis erros experimentais.

As fêmeas e machos de 30 e 60 dias do grupo PolyI:C permaneceram mais tempo em um dos ambientes, não demonstrando prejuízo olfatório, o que contraria dados da literatura, a qual aponta que ratos neonatos cujas mães foram expostas à AIM por LPS apresentaram deficiência no comportamento olfatório na busca de um novo ambiente e na aprendizagem associativa ao odor (Baharnoori et al., 2012). Ademais, Liu et al. (2013) confirmam uma discriminação olfatória comprometida na prole adulta de mães expostas à AIM por PolyI:C e reforçam que esse déficit pode ser considerado um biomarcador para a esquizofrenia. Quando avaliado o parâmetro “cruzamentos”, tanto as fêmeas como os machos de 60 dias do grupo PolyI:C, demonstraram um aumento no número de cruzamentos, indicando uma hiperlocomoção destes animais.

As fêmeas e machos de 60 dias do grupo vacina gastaram mais tempo no ambiente não familiar que no familiar, comprovando uma alteração neste parâmetro comportamental e uma maior atividade exploratória dos animais na vida adulta. As fêmeas de 30 e 60 dias, bem como os machos de 30 dias do grupo vacina demonstraram um aumento no número de cruzamentos quando comparados ao grupo controle, o que sugere uma maior locomoção destes animais, em especial jovens, entre os ambientes familiar e não familiar.

Muitos estudos têm demonstrado que a IPP, uma medida da ativação sensório-motora, está prejudicada na prole de ratos e camundongos tratados com PolyI:C durante a gravidez (Li et al., 2009; Dickerson et al., 2010; Howland et al., 2012; Klein et al., 2013, Mattei et al., 2014). Desse modo, este estudo investigou a IPP na prole de fêmeas e machos aos 30 e 60 dias de vida cujas mães foram tratadas com salina, vacina ou PolyI:C durante a gestação. De modo geral, nenhuma alteração no perfil sensório-motor dos animais fêmeas e machos de 30 e 60 dias do

grupo PolyI:C foi observada, o que contraria em partes, evidências preliminares (Giovanoli et al., 2016; Garay et al., 2013; Mattei et al., 2017; Meehan et al., 2017), as quais retratam uma diminuição no percentual de IPP e, portanto, deficit no perfil sensório-motor da prole de mães tratadas com PolyI:C.

No entanto, estudo conduzido por Hadar et al. (2015) verificou que a AIM foi capaz de prejudicar o perfil sensório-motor apenas na idade adulta tardia (100 dias), mas não durante a idade jovem-adulta (35 e 60 dias) dos animais machos, o que se assemelha ao menos em parte, aos resultados desta pesquisa cuja prole de machos aos 30 e 60 dias do grupo PolyI:C também não apresentou alteração no percentual de IPP e, portanto, déficit cognitivo.

O tratamento pré-natal com LPS também levou à indução de um déficit comportamental via IPP, o qual surgiu primeiro na puberdade e persistiu ao longo da vida adulta (Romero et al., 2010). De fato, está consolidado que a AIM, em particular a PolyI:C, pode desencadear transtornos neurodesenvolvimentais na prole jovem-adulta, inclusive sintomas característicos da esquizofrenia em modelos animais (Meyer e Feldon, 2012). Assim, mudanças na atividade locomotora, comportamentos relacionados às emoções (ansiedade, depressão) e às funções cognitivas (IPP) são observadas no modelo animal de esquizofrenia, sendo fenótipos comportamentais considerados critérios úteis para modelos animais de transtornos psiquiátricos (Jaaro-Peled et al., 2010).

É sabido que os déficits de bloqueio sensorial, conforme refletidos na IPP prejudicada, constituem uma das principais características da esquizofrenia (Braff et al., 2001). Sendo um fenômeno de espécies cruzadas (Swerdlow et al., 2008), a IPP se mostrou anteriormente interrompida em descendentes de PolyI:C na idade adulta em diversos estudos (Ozawa et al., 2006; Meyer e Feldon, 2010; Mattei et al., 2014, 2017; Hadar et al., 2015), o que está em desacordo com a presente pesquisa cuja prole jovem-adulta do grupo PolyI:C não apresentou dano cognitivo, segundo o teste de IPP. Uma hipótese para explicar tal resultado poderia se basear na idade dos animais (30 e 60 dias), apesar de estar bem descrito o dano cognitivo na IPP em roedores adultos. Todavia, considerando que Hadar et al. (2015) observou que a AIM foi capaz de prejudicar o perfil sensório-motor somente na idade adulta tardia (100 dias) dos machos, o “fator idade” talvez possa ter impactado na resposta dos animais no presente estudo.

Por fim, um resultado interessante verificado nesta pesquisa foi que os ratos machos de 60 dias do grupo vacina, para as três intensidades avaliadas (65, 70 e 75dB), exibiram um aumento significativo no percentual de IPP, sugerindo que a vacina pode ter melhorado a função cognitiva destes animais. De fato, evidências têm demonstrado que a vacinação contra a gripe

na fase pré-natal pode ser considerada uma estratégia eficaz, melhorando ou evitando os efeitos deletérios causados pela AIM na vida pós-natal, em especial, na cognição (Kim et al., 2012; Xia et al., 2014b). De modo geral, o presente estudo não verificou um melhor desempenho comportamental da prole, machos ou fêmeas, cujas mães receberam a vacina (H1N1) nos testes atividade locomotora, *splash* e discriminação olfatória. Por outro lado, este achado obtido para os ratos machos de 60 dias na função sensório-motora se mostra relevante, uma vez que está em concordância com a literatura.

Estudos referem que o comprometimento comportamental e cognitivo na vida jovem-adulta da prole de mães expostas a AIM por meio da PolyI:C ou LPS está relacionado à ativação de citocinas (Meyer et al., 2006a,b; Garay et al., 2013), as quais influenciam processos neuroquímicos e causam alterações morfológicas. Por tais motivos, este estudo avaliou os níveis de citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-4 e IL-10) nas estruturas cerebrais (BO, córtex frontal, hipocampo e estriado) na prole jovem-adulta de ratas *Wistar* submetidas à vacinação contra influenza A (H1N1) e comparou esses parâmetros na prole de ratas induzidas à infecção com PolyI:C durante a gestação, considerando o gênero: ratos machos e fêmeas.

Os resultados apontam um aumento nos níveis de IL-1 β no BO e estriado das ratas+7 fêmeas de 30 dias, bem como maiores concentrações de IL-1 β e TNF- α no estriado das fêmeas de 60 dias, alterações estas observadas no grupo PolyI:C. De modo contrário, para os animais machos de 30 dias do grupo PolyI:C houve redução nos níveis de IL-1 β no córtex frontal, hipocampo e estriado, enquanto os níveis de TNF- α aumentaram no córtex frontal de machos de 30 dias do grupo PolyI:C. Para as citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), de modo geral, não foram verificadas alterações em seus níveis nas ratas fêmeas de 30 e 60 dias do grupo PolyI:C, exceto para as ratas fêmeas de 60 dias, as quais apresentaram redução nos níveis de IL-10 no córtex frontal. Nos animais machos, em resumo, houve redução nos níveis destas citocinas, tais como: diminuição nas concentrações de IL-10 no BO e córtex frontal de ratos de 30 dias; níveis diminuídos de IL-4 no córtex frontal e estriado de machos de 60 dias e redução de IL-10 no estriado de ratos de 60 dias, todos animais do grupo PolyI:C.

Garay et al. (2013) avaliaram os níveis de citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, IFN γ , TNF α) em soro e em regiões cerebrais (córtex frontal e cingulado e hipocampo) da prole de machos e fêmeas em diferentes idades de vida (0, 7, 14, 30 e 60 dias de vida), cujas as mães foram expostas à AIM por meio da PolyI:C. O estudo verificou que a maioria das citocinas inflamatórias estão presentes em soro e cérebro da prole ao longo do desenvolvimento, sendo que a AIM induz mudanças nos níveis destas citocinas em cérebro e

soro, as quais variam conforme a região e a idade dos animais e seguem padrões inesperados e distintos na prole. Dentre os resultados, foi observado no córtex frontal e cingulado que diversas citocinas, principalmente pró-inflamatórias, se mostraram elevadas ao nascimento da prole (Dia 0), seguidas por níveis diminuídos durante os períodos de sinaptogênese e plasticidade (Dias 14 e 30) e novamente aumentaram na vida adulta (Dia 60). As citocinas também estavam alteradas no hipocampo pós-natal, mas em um padrão distinto das outras áreas cerebrais (Garay et al., 2013). Os achados acima, particularmente quanto à estrutura cerebral se mostraram similares aos encontrados nesta pesquisa, uma vez que o córtex frontal seguido pelo estriado, foi a região cerebral que apresentou alterações nos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Doravante, não se sabe exatamente por quais motivos o córtex frontal e estriado foram as estruturas mais susceptíveis às alterações inflamatórias neste estudo. Pesquisa conduzida por Anjos et al. (2013) refere que fatores estressores maternos (infecção, deficiência nutricional) podem afetar o desenvolvimento e a função estrutural do cérebro na vida pós-natal, inclusive o córtex cerebral. Esta região em humanos é pré-formada no útero materno e continua seu amadurecimento durante a vida pós-natal através da rápida proliferação de células progenitoras. Em torno de 2 anos de idade, há sinaptogênese e plasticidade em larga escala e a reorganização de redes neuronais no córtex permanece até a adolescência (Huttenlocher e Dabholkar, 1997). Em roedores, tal formação ocorre similarmente, iniciando após o 11º dia gestacional e persistindo na fase pós-natal (McGarel et al., 2015). Em adição, mudanças comportamentais, por exemplo na atividade locomotora, parecem ser causadas pelo processamento interrompido em circuitos do córtex pré-frontal medial (Meyer e Feldon, 2009), no entanto, anormalidades induzidas pela AIM também envolvem áreas estriais (Piontkewitz et al., 2012). Sabendo-se que a AIM via PolyI:C é capaz de gerar neuroinflamação, conforme evidenciado acima, convém salientar que estruturas cerebrais como córtex frontal e estriado parecem ser consideravelmente vulneráveis a alterações imune mediante a presença de um fator estressor na fase gestacional (Meyer e Feldon, 2009; Piontkewitz et al., 2012; Anjos et al., 2013).

Adicionalmente, os achados de Garay et al. (2013) podem ao menos em parte, explicar os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que fatores como idade, gênero e regiões cerebrais dos animais devem ser considerados para justificar as diferenças observadas nos níveis das citocinas estudadas. Dados desta pesquisa indicam que as citocinas IL-4 e IL-10, particularmente no córtex frontal e estriado, reduziram na prole de machos cujas mães sofreram AIM (PolyI:C), independentemente da idade dos animais, o que está parcialmente de acordo com os resultados de Garay et al. (2013), os quais demonstraram que a maioria das citocinas

diminuiu de modo significativo no córtex frontal, apesar do estudo acima afirmar que essa redução acontece prioritariamente durante os períodos de plasticidade. Por outro lado, para as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), resultados diversos foram encontrados na prole, variando conforme idade, gênero e estruturas cerebrais. No entanto, de certa forma, vale ressaltar que houve um aumento da neuroinflamação na prole de mães tratadas com PolyI:C, particularmente dos níveis de IL-1 β no estriado das fêmeas de 30 e 60 dias, além das concentrações aumentadas de TNF- α no estriado de fêmeas de 60 dias e no córtex frontal de machos de 30 dias. De fato, estudos têm elucidado que as concentrações destes marcadores no cérebro em desenvolvimento se alteram com a idade e algumas mudanças são específicas de determinada área cerebral, porém o mecanismo pelo qual isso ocorre permanece incompreendido (Garay et al., 2013; Estes e McAllister, 2014; 2015).

Está bem descrito que as concentrações plasmáticas de citocinas maternas (TNF- α , IL-10, IL-1 β , IL-4 e IFN- β) se mostram aumentadas após infecção durante a gravidez, o que pode impactar o neurodesenvolvimento e contribuir para transtornos na prole, mas não são necessariamente suficientes para induzir mudanças comportamentais nestes descendentes (Giovanoli et al., 2013; Ballendine et al., 2015; Choi et al., 2016; Money et al., 2017). Em contrapartida, Gonzalez-Perez et al. (2012) mencionam que a maioria das citocinas pró-inflamatórias compromete a neurogênese e, considerando que a AIM aumenta a liberação destas, em especial IL-1 β , IL-6 e TNF- α , é possível que a elevação destes marcadores na vida jovem-adulta da prole desencadeie prejuízos neurogênicos e, conseqüentemente, alterações comportamentais.

Neste estudo não foram avaliados parâmetros de neurogênese e, embora as citocinas pró-inflamatórias tenham respondido de modo diferente em machos e fêmeas de 30 e 60 dias, de modo geral, a prole cujas mães receberam PolyI:C durante a gestação exibiu redução nas citocinas anti-inflamatórias. Ademais, para os testes comportamentais, os dados apontam em especial, que a prole de machos adulta (60 dias) apresentou hiperlocomoção e um comportamento tipo-depressivo nos testes atividade locomotora e *splash* teste, respectivamente, confirmando a influencia da AIM na vida pós-natal da prole, o que também corrobora achados de Koshibu et al. (2004) sobre o fato da PolyI:C pré-natal induzir alterações comportamentais na prole apenas na vida adulta.

Diante disso, está bem descrito que fatores estressores durante a gestação, como infecções, podem comprometer a saúde materna, o neurodesenvolvimento fetal e ainda predispor o aparecimento de transtornos neurodesenvolvimentais na vida jovem-tardia da prole,

como a esquizofrenia (Dammann et al., 2002). Assim, ativadores imunológicos e inflamatórios, como IFN- γ , LPS e PolyI:C induzidos por eventos estressores, especialmente em períodos críticos (fase gestacional) e por acontecimentos diversos ao longo vida, ativam a microglia no SNC e essa ativação tem sido associada às doenças cerebrais (Najjar et al., 2013). Estas interações neurônio-microglia podem levar a lesão e perda neuronal e, inclusive, ser um dos fatores importantes na fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia (Monji et al., 2009; Zhao et al., 2014; Réus et al., 2015).

Estudos suportam a ideia de que em determinada região do cérebro, o perfil de citocinas que é alterado na prole pela AIM difere conforme a idade. Essa resposta dinâmica não deve ser inesperada, pois as citocinas regulam a expressão de diversos *feedback* positivos e negativos para manter respostas imunes e o equilíbrio homeostático, desse modo, não funcionam isoladamente, mas sim em redes complexas (Careaga et al., 2010; Giovanoli et al., 2013; Arsenault et al., 2014). Garay et al. (2013), inclusive, não encontraram um padrão óbvio nas mudanças específicas por idade em termos de alternância para as citocinas pró ou anti-inflamatórias e, portanto, salientam que essa classificação é apenas parcialmente útil, uma vez que a maioria das citocinas pode ter ação pró ou anti-inflamatória, dependendo do contexto celular onde atuam, dos efeitos biológicos e dos níveis de outras citocinas, o que faz com que possam variar amplamente. Consistente a estes dados, os resultados do presente estudo confirmam que as citocinas são de fato cronicamente alteradas na vida pós-natal da prole de mães tratadas com PolyI:C, porém parecem variar conforme os fatores anteriormente citados.

Embora a ativação imunológica pré-natal semelhante a vírus *per se* possa não causar anormalidades gliais evidentes e a inflamação associada a alterações cerebrais na prole, sinais de superativação microglial e exacerbação das citocinas inflamatórias em áreas do SNC podem ser induzidas na prole quando estão adicionalmente expostas ao estresse da vida pós-natal (Giovanoli et al., 2013). Além disso, a sensibilização imune pré-natal com PolyI:C, por exemplo, é capaz de aumentar significativamente a vulnerabilidade do cérebro da prole a alterações imunes em resposta ao estresse, visto que os efeitos a longo prazo da AIM em parâmetros inflamatórios podem não ser aparentes sob condições basais, mas ser ativados quando a prole for exposta a desafios ambientais, como estresse ou infecção aguda durante a vida pós-natal (Krstic et al., 2012).

Neste estudo, a prole de fêmeas jovem (30 dias) de mães vacinadas durante a gestação não exibiu alterações nos níveis das citocinas IL-1 β e TNF- α . Os ratos machos de 30 dias do grupo vacina apresentaram níveis diminuídos de IL-1 β no córtex frontal, enquanto os machos

de 60 dias demonstraram redução nas concentrações de IL-1 β no BO, córtex frontal e estriado. Para a citocina IL-4, houve aumento em seus níveis no hipocampo de fêmeas de 60 dias e aumento nos níveis de IL-10 no córtex frontal de fêmeas de 30 dias do grupo Vacina, porém se verificou uma redução dos níveis de IL-10 no córtex frontal de fêmeas de 60 dias. Contrariamente, nos animais machos de 60 dias houve redução nas concentrações de IL-4 no estriado, bem como os níveis de IL-10 diminuíram no BO e córtex frontal de machos de 30 dias e no estriado de machos de 60 dias do grupo vacina.

Estudo similar a esta pesquisa foi realizado por Xia et al. (2014b) e revelou um aumento considerável nas concentrações plasmáticas e hipocampais de citocinas anti-inflamatórias (IL-2, IL-4 e IFN- γ) e diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) na prole (7 dias de vida) de mães vacinadas com H1N1 na gravidez. Todavia, nenhuma mudança nas concentrações de IL-1 β foram observadas em soro ou no hipocampo dos animais avaliados. Em adição, Xia et al. (2014b) constataram um aumento da proliferação celular, maior produção de neurônios e melhor memória espacial na prole adulta de mães vacinadas durante a gestação, sugerindo que os possíveis mecanismos de mediação do desenvolvimento do cérebro pós-natal podem ser influenciados por alterações nos níveis de citocinas e fatores de crescimento. Por fim, os autores reforçam que a teoria anteriormente propagada de que a infecção materna ou AIM via vacinação resulta na inibição da neurogênese e anormalidades comportamentais na prole (Zhao et al., 2008; French et al., 2013) foi desmistificada pelos resultados do seu estudo, pois propõem que o estado imunológico materno alterado pela vacinação pode contribuir para a neurogênese e, inclusive, melhorar a resposta comportamental, diferentemente de relatos clínicos anteriores. Associado a isso, estudos sugerem que o perfil específico de cada citocina desempenha um papel crítico na resposta imune neuroprotetora (Butovsky et al., 2006; Xia et al., 2014b).

Contudo, para os resultados das citocinas pró e anti-inflamatórias da prole de fêmeas e machos de 30 e 60 dias cujas mães receberam vacina (H1N1) durante a gestação nesta pesquisa, também não se encontrou um padrão óbvio para tais marcadores. No entanto, diante dos achados deste estudo, torna-se evidente que as citocinas sofrem importantes alterações na vida pós-natal e, possivelmente, a vacinação materna regula os níveis desses marcadores, os quais parecem ser influenciados pela idade, gênero e estrutura cerebral avaliada na prole, conforme reportado anteriormente por Garay et al. (2013).

Embora os gatilhos gerados pela AIM, seja via PolyI:C ou através da vacinação com H1N1 durante a fase gestacional, o perfil limitado das citocinas avaliadas no cérebro da prole

não significa, *per se*, uma resposta inflamatória clássica (Harvey e Boksa, 2012; Glynn, 2011), pois pouco se sabe sobre como estas formas de ativação imunológica alteram o neurodesenvolvimento do cérebro. Uma hipótese é que a AIM leva a mudanças duradouras na expressão de moléculas imunes fundamentais para regular a conectividade e o funcionamento neural na prole (Estes e McAllister, 2015). No entanto, o que parece de fato estar bem consolidado é que os níveis de numerosas citocinas cerebrais são alterados ao longo do desenvolvimento e na idade adulta da prole cujas mães foram expostas à AIM, porém se modificam conforme a idade e ainda são específicos de determinada área cerebral (Estes e McAllister, 2014; 2015; 2016).

7 CONCLUSÃO

O presente estudo constatou que a prole de machos adulta (60 dias) de mães tratadas com PolyI:C durante a gestação apresentou uma hiperlocomoção e um comportamento tipo-depressivo nos testes atividade locomotora e *splash test*, respectivamente, indicando que a infecção pré-natal está implicada nos transtornos neurodesenvolvimentais. Estes resultados também sugerem que a prole de machos adulta demonstrou uma melhor resposta em mimetizar o modelo animal de AIM. A PolyI:C administrada nas mães foi capaz de reduzir os níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), particularmente, no BO e córtex frontal de machos de 30 dias; córtex frontal e estriado de ratos de 60 dias. Houve um aumento nos níveis de IL-1 β no BO e estriado das ratas fêmeas de 30 e 60 dias, além de um aumento nas concentrações de TNF- α no estriado de fêmeas de 60 dias e no córtex frontal de machos de 30 dias do grupo PolyI:C. Embora as citocinas pró-inflamatórias tenham respondido de modo diferente em machos e fêmeas de 30 e 60 dias, a prole exibiu redução nas citocinas anti-inflamatórias, o que confirma a influencia da AIM (PolyI:C) na vida pós-natal, tanto em parâmetros neuroquímicos como comportamentais. Também convém salientar que o córtex frontal e o estriado parecem ter sido as estruturas cerebrais mais vulneráveis ao efeito da PolyI:C materna, visto que mostraram respostas imunes mais expressivas na prole jovem-adulta.

Os ratos machos de 60 dias do grupo vacina demonstraram um aumento no percentual de IPP, sugerindo que a vacinação materna (H1N1) pode ter melhorado a função cognitiva destes animais. Todavia, o presente estudo não verificou um melhor desempenho comportamental para a prole adulta cujas mães receberam a vacina, mas este achado na função sensorio-motora se mostrou relevante. Para as citocinas pró e anti-inflamatórias na prole jovem-adulta de fêmeas e machos de mães vacinadas com H1N1 também não se encontrou um padrão óbvio para tais marcadores, os quais mostraram diferentes respostas entre machos e fêmeas aos 30 e 60 dias, sendo que as principais alterações inflamatórias foram observadas no córtex frontal e estriado. Convém mencionar que as citocinas sofrem importantes alterações na vida pós-natal e, possivelmente, a vacinação materna regula os níveis destas moléculas, as quais parecem ser influenciadas pela idade, gênero e estrutura cerebral avaliada na prole.

O cérebro em desenvolvimento é altamente susceptível a agressões ambientais, seja via PolyI:C ou através da vacinação (H1N1) materna, o que aumenta o risco de transtornos neuropsiquiátricos na prole. Neste sentido, os achados deste estudo confirmam a importante associação entre a imunização pré-natal e o desenvolvimento cerebral alterado, o qual é capaz de contribuir para alterações comportamentais em algum momento da vida da prole.

REFERÊNCIAS

- Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406(6797):782-7.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by toll-like receptor 3. *Nature*. 2011;413(6857):732–8.
- Anderson G, Maes M. Schizophrenia: linking prenatal infection to cytokines, the tryptophan catabolite (TRYCAT) pathway, NMDA receptor hypofunction, neurodevelopment and neuroprogression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013;42:5-19.
- Anjos T, Altmae S, Emmett P, Tiemeier H, Closa-Monasterolo R, Luque V, Wiseman S, Perez-Garcia M, Lattka E, Demmelmair H, Egan B, Straub N, Szajewska H, Evans J, Horton C, Paus T, Isaacs E, van Klinken JW, Koletzko B, Campoy C. Nutrition and neurodevelopment in children: focus on NUTRIMENTHE project. *Eur J Nutr*. 2013;52(8):1825–1842.
- Arsenault D, St-Amour I, Cisbani G, Rousseau LS, Cicchetti F. The different effects of LPS and poly I:C prenatal immune challenges on the behavior, development and inflammatory responses in pregnant mice and their offspring. *Brain Behav Immun*. 2014;38:77–90.
- Atanasova B, Graux J, El Hage W, Hommet C, Camus V, Belzung C. Olfaction: a potential cognitive marker of psychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008;32(7):1315–1325.
- Avitsur R, Yirmiya R. The immunobiology of sexual behavior: gender differences in the suppression of sexual activity during illness. *Pharmacol Biochem Behav*. 1999;64(4):787-96.
- Babri S, Doosti MH, Salari AA. Strain-dependent effects of prenatal maternal immune activation on anxiety- and depression-like behaviors in offspring. *Brain Behav Immun*. 2014; 37:164-76.
- Baharnoori M, Bhardwaj SK, Srivastava LK. Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: a prenatal infection model for developmental neuropsychiatric disorders. *Schizophr Bull*. 2012;38(3):444–456.
- Ballentine SA, Greba Q, Dawicki W, Zhang X, Gordon JR, Howland JG. Behavioral alterations in rat offspring following maternal immune activation and ELR-CXC chemokine receptor antagonism during pregnancy: implications for neurodevelopmental psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015; 57, 155–165.
- Balu DT, Lucki I. Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;33(3):232–52.
- Barker V, Middleton G, Davey F, Davies A. TNF- contribute to the death of NGF-dependent neurons during development. *Nat Neurosci*. 2001;4(12):1194–1198.
- Baron R, Nemirovsky A, Harpaz I, Cohen H, Owens T, Monsonogo A. IFN-gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2008;22(8):2843–2852.

- Bath KG, Mandairon N, Jing D, Rajagopal R, Kapoor R, Chen ZY, Khan T, Proenca CC, Kraemer R, Cleland TA, Hempstead BL, Chao MV, Lee FS. Variant brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) alters adult olfactory bulb neurogenesis and spontaneous olfactory discrimination. *J Neurosci*. 2008;28(10):2383–2393.
- Beattie E, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan J, Ha B, Von Zastrrow M, Beattie M, Malenka R. Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science*. 2002;295(5563):2282–5.
- Bednarczyk RA, Adjaye-Gbewonyo D, Omer SB. Safety of influenza immunization during pregnancy for the fetus and the neonate. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;207(Suppl. 3): S38–46.
- Bergdolt L, Dunaevsky A. Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders. *Prog Neurobiol*. 2018; 175:1-19.
- Bitanhirwe BK, Peleg-Raibstein D, Mouttet F, Feldon J, Meyer U. Late prenatal immune activation in mice leads to behavioral and neurochemical abnormalities relevant to the negative symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(12):2462–78.
- Boksa P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun*. 2010;24(6):881–97.
- Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR. Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology*. 2001;156(2-3):234–258.
- Brandon NJ, Sawa A. Linking neurodevelopmental and synaptic theories of mental illness through DISC1. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(12):707–22.
- Brown AS, Blottiglieri T, Schaefer C, Quesenberry CP Jr, Liu L, Bresnahan M, Susser ES. Elevated Prenatal Homocysteine Levels as a Risk Factor for Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64(1):31-9.
- Brown AS: Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2006;32(2):200–2.
- Butler MP, O'Connor JJ, Moynagh PN. Dissection of tumor-necrosis factor- α inhibition of long-term potentiation (LTP) reveals a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism which maps to early-but not late-phase LTP. *Neuroscience*. 2004;124(2):319–26.
- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M. Microglia activated by IL-4 or IFN- γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*. 2006; 31(1):149–60.
- Cameron HA, McKay RD. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci*. 1999;2(10):894–7.
- Canevar L, Oliveira L, D'Altoe De Luca R, Correa PT, De BFD, Matos MP, Scaini G, Quevedo J, Streck EL, Zugno AI. A rodent model of schizophrenia reveals increase in creatine kinase activity with associated behavior changes. *Oxid Med Cell Longev*. 2010;3(6):421-7.

Careaga M, Van de Water J, Ashwood P. Immune dysfunction in autism: a pathway to treatment. *Neurotherapeutics*. 2010;7(3):283–292.

Cassidy C, MacDonald NE, Steenbeek A, Ortiz JR, Zuber PL, Top KA. A global survey of adverse event following immunization surveillance systems for pregnant women and their infants. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(8):1-7.

Centers for Disease Control and Prevention. Guiding principles for development of ACIP recommendations for vaccination during pregnancy and breastfeeding. (ACIP) *MMWR* 2008;57(21):580.

Chavant F, Ingrand I, Jonville-Bera AP, Plazenet C, Gras-Champel V, Lagarce L, Zenut M, Disson-Dautriche A, Logerot S, Auffret M, Coubret-Dumas A, Bruel ML, Boyer M, Bos-Thompson MA, Veyrac G, Carlier P, Bey MN, Lates S, Damase-Michel C, Castot A, Kreft-Jaïs C, Pérault-Pochat MC. The PREGVAXGRIP study: a cohort study to assess foetal and neonatal consequences of in utero exposure to vaccination against A (H1N1) 2009 influenza. *Drug Saf*. 2013;36(6):455–65.

Choi GB, Yim YS, Wong H, Kim S, Kim H, Kim SV, Hoeffler CA, Littman DR, Huh JR. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*. 2016; 351, 933–939.

Clarke MC, Harley M, Cannon M. The role of obstetric events in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2006;32(1):3–8.

Courvoisier H, Moisan MP, Sarrieau A, Hendley ED, Morméde P. Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/WKY inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis. *Brain Res*. 1996;743(1-2):77-85.

Cui K, Ashdown H, Luheshi GN, Boksa P. Effects of prenatal immune activation on hippocampal neurogenesis in the rat. *Schizophr Res*. 2009;113(2–3),288–97.

Dammann O, Kuban KCK, Leviton A. Perinatal infection, fetal inflammatory response, white matter damage and cognitive limitation in children born preterm. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002;8(1):46–50.

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(1),46–56.

De Oliveira L, Spiazzi CM, Bortolin T, Canever L, Petronilho F, Mina FG, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Zugno AI. Different sub-anesthetic doses of ketamine increase oxidative stress in the brain of rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33(6):1003-8.

De Oliveira L, Fraga DB, De Luca RD, Canever L, Ghedim FV, Matos MP, Streck EL, Quevedo J, Zugno AI. Behavioral changes and mitochondrial dysfunction in a rat model of schizophrenia induced by ketamine. *Metab Brain Dis*. 2011;26(1):69-77.

Dickerson DD, Wolff AR, Bilkey DK. Abnormal long-range neural synchrony in a maternal immune activation animal model of schizophrenia. *J Neurosci*. 2010;30(37):12424–31.

Dik M, Jonker C, Hack C, Smit J, Comijs H, Eikelenboom P. Serum inflammatory proteins and cognitive decline in older persons. *Neurology*. 2005;64(8):1371–1377.

Enayati M, Solati J, Hosseini MH, Shahi HR, Saki G, Salari AA. Maternal infection during late pregnancy increases anxiety and depression like behaviors with increasing age in male offspring. *Brain Res Bull*. 2012;87(2-3):295-302.

Estes ML, McAllister AK. Alterations in immune cells and mediators in the brain: it's not always neuroinflammation! *Brain Pathol*. 2014;24(6):623–630.

Estes ML, McAllister AK. Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(8):469-86.

Estes ML, McAllister AK. Maternal immune activation: implications for neuropsychiatric disorders. *Science*. 2016;353(6301):772-7.

Fabiani M, Bella A, Rota MC, Clagnan E, Gallo T, D'Amato M, Pezzotti P, Ferrara L, Demicheli V, Martinelli D, Prato R, Rizzo C. A/H1N1 pandemic influenza vaccination: A retrospective evaluation of adverse maternal, fetal and neonatal outcomes in cohort of pregnant women in Italy. *Vaccine*. 2015;33(19):2240-7.

Francesconi LP, Ceresér KM, Mascarenhas R, Stertz L, Gama CS, Belmonte-de- Abreu P. Increased annexin-V and decreased TNF-alpha serum levels in chronicmedicated patients with schizophrenia. *Neuroscience Lett*. 2011;502(3):143-6.

French SS, Chester EM, Demas GE. Maternal immune activation affects litter success, size and neuroendocrine responses related to behavior in adult offspring. *Physiol Behav*. 2013;119:175–184.

Gabutti G, Conforti G, Tomasi A, Kuhdari P, Castiglia P, Prato R, Memmini S, Azzari C, Rosati GV, Bonanni P. Why, when and for what diseases pregnant and new mothers "should" be vaccinated. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(2):283-290.

Garay PA, Hsiao EY, Patterson PH, McAllister AK. Maternal immune activation causes age- and region-specific changes in brain cytokines in offspring throughout development. *Brain Behav Immun*. 2013; 31:54–68.

Genn RF, Tucci SA, Thomas A, Edwards JE, File SE. Age-associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests of anxiety. *Neurosci Biobehav Ver*. 2003;27(1-2):155–61.

Giovanoli S, Engler H, Engler A, Richetto J, Voget M, Willi R, Winter C, Riva MA, Mortensen PB, Feldon J, Schedlowski M, Meyer U. Stress in puberty unmasks latent neuropathological consequences of prenatal immune activation in mice. *Science*. 2013;339(6123):1095–1099.

Giovanoli S, Weber-Stadlbauer U, Schedlowski M, Meyer U, Engler H. Prenatal immune activation causes hippocampal synaptic deficits in the absence of overt microglia anomalies. *Brain Behav. Immun*. 2016; 55, 25–38.

Girard S, Tremblay L, Lepage M, Sebire G. IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation. *J Immunol*. 2010;184(7):3997–4005.

Glynn MW, Elmer BM, Garay PA, Liu XB, Needleman LA, El Sabeawy F, McAllister AK. O MHCI regula negativamente a densidade das sinapses durante o estabelecimento de conexões corticais. *Nat Neurosci*. 2011;14(4):442-51.

Gobinath AR, Choleris E, Galea LA. Sex, hormones, and genotype interact to influence psychiatric disease, treatment, and behavioral research. *J Neurosci Res*. 2017;95(1-2):50-64.

Golan H, Levav T, Mendelsohn A, Huleihel M. TNF alpha involvement in hippocampus development and function. *Cereb Cortex*. 2004;14(1):97-105.

Gonzalez-Perez O, Gutierrez-Fernandez F, Lopez-Virgen V, Collas-Aguilar J, Quinones-Hinojosa A, Garcia-Verdugo JM. Immunological regulation of neurogenic niches in the adult brain. *Neuroscience*. 2012;226:270-81.

Gonzalez-Perez O, Jauregui-Huerta F, Galvez-Contreras AY. Immune system modulates the function of adult neural stem cells. *Curr Immunol Rev*. 2010;6(3):167-73.

Graciarena M, Depino AM, Pitossi FJ. Prenatal inflammation impairs adult neurogenesis and memory related behavior through persistente hippocampal TGF β 1 downregulation. *Brain Behav Immun*. 2010;24(8):1301-9.

Grohskopf LA, Olsen SJ, Sokolow LZ, Bresee JS, Cox NJ, Broder KR, Karron RA, Walter EB. Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices — United States, 2013–2014. (ACIP) *MMWR* 2014; 62(RR-07): 1-43.

Hadar R, Soto-Montenegro ML, Götz T, Wieske F, Sohr R, Desco M, Hamani C, Weiner I, Pascau J, Winter C. Using a maternal immune stimulation model of schizophrenia to study behavioral and neurobiological alterations over the developmental course. *Schizophr Res*. 2015;166(1-3):238-47.

Hagberg H, Gressens P, Mallard C. Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann Neurol*. 2012;71(4):444-457.

Harvey L, Boksa P. A stereological comparison of GAD67 and reelin expression in the hippocampal stratum oriens of offspring from two mouse models of maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology*. 2012;62(4):1767-1776.

Hava G, Vered L, Yael M, Mordechai H, Mahoud H. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. *Dev Psychobiol*. 2006;48(2):162-8.

He F, Zou JT, Zhou QF, Niu DL, Jia WH. Glatiramer acetate reverses cognitive deficits from cranial-irradiated rat by inducing hippocampal neurogenesis. *J Neuroimmunol*. 2014;271(1-2):1-7.

Hegarty, M. Ability and sex differences in spatial thinking: What does the mental rotation test really measure? *Psychon Bull Rev*. 2018;25(3):1212-1219.

Helmig RB, Maimburg RD, Erikstrup C, Nielsen HS, Petersen OB, Nielsen LP, Hvidman L, Veirum JE, Henriksen TB, Storgaard M. Antibody response to influenza A(H1N1)pdm09 in

vaccinated, serologically infected and unaffected pregnant women and their newborns. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2015;94(8):833-9.

Hoffman HS, Ison JR. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychol Ver.* 1980;87(2):175-89.

Howland JG, Cazakoff BN, Zhang Y. Altered object-in-place recognition memory, prepulse inhibition, and locomotor activity in the offspring of rats exposed to a viral mimetic during pregnancy. *Neuroscience.* 2012;201:184-98.

Huttenlocher PR, Dabholkar AS. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 1997;387(2):167-178.

Jaaro-Peled H, Ayhan Y, Pletnikov MV, Sawa A. Review of pathological hallmarks of schizophrenia: comparison of genetic models with patients and nongenetic models. *Schizophr Bull.* 2010;36(2):301-313.

Jamieson DJ, Honein MA, Rasmussen SA, Williams JL, Swerdlow DL, Biggerstaff MS, Lindstrom S, Louie JK, Christ CM, Bohm SR, Fonseca VP, Ritger KA, DJ Kuhles, Eggers P, Bruce H, Davidson HA, Lutterloh E, Harris ML, Burke C, N Cocoros, Finelli L, MacFarlane KF, Shu B, Olsen SJ. H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. *Lancet.* 2009;374(9688):451-8.

Jurgens HA, Amancherla K, Johnson RW. Influenza infection induces neuroinflammation, alters hippocampal neuron morphology, and impairs cognition in adult mice. *J. Neurosci* 2012;32(12)3958-68.

Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, Pasquali MA, Quevedo J, Gama CS, Post R. A systemic toxicity index developed to assess peripheral changes in mood episodes. *Mol Psychiatry.* 2010;15(8):784-6.

Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, Moreira JC, de Bittencourt Pasquali MA, Fries GR, Quevedo J, Gama CS, Post R. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *J Psychiatr Res.* 2011;45(2):156-61.

Kim HM, Kang YM, Song BM, Kim HS, Seo SH. The 2009 pandemic H1N1 influenza virus is more pathogenic in pregnant mice than seasonal H1N1 influenza virus. *Viral Immunol.* 2012;25(5):402-10.

Klein J, Hadar R, Gotz T, Manner A, Eberhardt C, Baldassarri J, Schmidt TT, Kupsch UM, Heinz UM, Morgenstern R, Schneider M, Weiner I, Inverno C. Mapping brain regions in which deep brain stimulation affects schizophrenia-like behavior in two rat models of schizophrenia. *Brain Stimul.* 2013;6(4):490-9.

Klein SL. Immune cells have sex and so should journal articles. *Endocrinology.* 2012;153(6):2544-50.

Koshibu K, Levitt P, Ahrens ET. Sex-specific, postpuberty changes in mouse brain structures revealed by three-dimensional magnetic resonance microscopy. *Neuroimage.* 2004;22(4):1636-1645.

- Krstic D, Madhusudan A, Doehner J, Vogel P, Notter T, Imhof C, Manalastas A, Hilfiker M, Pfister S, Schwerdel C, Riether C, Meyer U, Knuesel I. Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer like neuropathology in mice. *J Neuroinflammation*. 2012;9:151.
- Kunz M, Ceresér KM, Goi PD, Fries GR, Teixeira AL, Fernandes BS, Belmonte-de-Abreu PS, Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Gama CS. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- α in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. *Braz J Psychiatr*. 2011;33(3):268-74.
- Levin R, Calzavara MB, Santos CM, Medrano WA, Niigaki ST, Abílio VC. Spontaneously hypertensive rats (SHR) present deficits in prepulse inhibition of startle specifically reverted by clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(7):1748–52.
- Li M, Dai R, Du X, Yang QD, Zhang X, Y Chen. Infusion of BDNF into the nucleus accumbens of aged rats improves cognition and structural synaptic plasticity through PI3K-ILK-Akt signaling. *Behav Brain Res*. 2012;231(1):146–53.
- Li Q, Cheung C, Wei R, Hui ES, Feldon J, Meyer U, Chung S, Chua SE, PC Sham, Wu EX, McAlonan GM. Prenatal immune challenge is an environmental risk factor for brain and behavior change relevant to schizophrenia: evidence from MRI in a mouse model. *PLoS One*. 2009;4(7):e6354.
- Li WY, Chang YC, Lee LJ, Lee LJ. Prenatal infection affects the neuronal architecture and cognitive function in adult mice. *Dev Neurosci*. 2014;36(5):359-70.
- Lin YL, Wang S. Prenatal lipopolysaccharide exposure increases depression-like behaviors and reduces hippocampal neurogenesis in adult rats. *Behav Brain Res*. 2014;259:24-34.
- Liu YH, Lai WS, Tsay HJ, Wang TW, Yu JY. Effects of maternal immune activation on adult neurogenesis in the subventricular zone-olfactory bulb pathway and olfactory discrimination. *Schizophr Res*. 2013;151(1-3):1-11.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-7.
- Macêdo DS, Araújo DP, Sampaio LR, Vasconcelos SM, PM de vendas, Sousa FC, Jak Hallak, Crippa JA, Carvalho AF. Animal models of prenatal immune challenge and their contribution to the study of schizophrenia: a systematic review. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45(3):179-86.
- Majde JA. Viral double-stranded RNA, cytokines and the flu. *J Interferon Cytokine Res*. 2000;20(3):259–72.
- Mattei D, Djodari-Irani A, Hadar R, Pelz A, de Cossio LF, Goetz T, Matyash M, Kettenmann H, Inverno C, Wolf SA. Minocycline rescues decrease in neurogenesis, increase in microglia cytokines and deficits in sensorimotor gating in an animal model of schizophrenia. *Brain Behav Immun*. 2014; 38:175–84.
- Mattei D, Ivanov A, Ferrai C, Jordan P, Guneykaya D, Buonfiglioli A, Schaafsma W, Przanowski P, Deuther-Conrad W, Brust P, Hesse S, Patt M, Sabri O, Ross TL, Eggen BJJ, Boddeke E, Kaminska B, Beule D, Pombo A, Kettenmann H, Wolf AS. Maternal immune activation results in complex microglial transcriptome signature in the adult offspring that is reversed by minocycline treatment. *Transl. Psychiatry*. 2017; 7, e1120.

- McCarthy EA, Pollock WE, Nolan T, Hay S, McDonald S. Improving influenza vaccination coverage in pregnancy in Melbourne 2010–2011. *Aust NZ J Obstet Gynaecol.* 2012;52(4):334–41.
- McEwen BS. Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 933:265–77.
- McGarel C, Pentieva K, Strain JJ, McNulty H. Emerging roles for folate and related B-vitamins in brain health across the life cycle. *Proc Nutr Soc.* 2015;74(1):46-55.
- McMillan M, Porritt K, Kralik D, Costi L, Marshall H. Influenza vaccination during pregnancy: A systematic review of fetal death, spontaneous abortion, and congenital malformation safety outcomes. *Vaccine.* 2015;27;33(18):2108-17
- Meehan C, Harms L, Frost JD, Barreto R, Todd J, Schall U, Shannon Weickert C, Zavitsanou K, Michie PT, Hodgson DM. Effects of immune activation during early or late gestation on schizophrenia-related behaviour in adult rat offspring. *Brain Behav. Immun.* 2017; 3, 8–20.
- Meyer U, Feldon J, Schedlowski M, Yee BK. Towards an immuno-precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29(6):913–47.
- Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, Yee BK, Feldon J. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci.* 2006a;26(18):4752–62.
- Meyer U, Schwendener S, Feldon J, Yee BK. Prenatal and postnatal maternal contributions in the infection model of schizophrenia. *Exp Brain Res.* 2006b;173(2):243-57.
- Meyer U, Nyffeler M, Schwendener S, Knuesel I, Yee BK, Feldon J. Relative prenatal and postnatal maternal contributions to schizophrenia-related neurochemical dysfunction after in utero immune challenge. *Neuropsychopharmacology.* 2008a;33(2):441–56.
- Meyer U, Nyffeler M, Yee BK, Knuesel I, Feldon J. Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. *Brain Behav Immun.* 2008b;22(4):469–86.
- Meyer U, Feldon J, Fatemi SH. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009a;33(7):1061-79.
- Meyer U, Feldon J. Prenatal exposure to infection: a primary mechanism for abnormal dopaminergic development in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl).* 2009b;206(4):587-602.
- Meyer U, Feldon J. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog Neurobiol.* 2010;90(3):285-326.
- Meyer U, Feldon J. To poly (I:C) or not to poly (I:C): advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. *Neuropharmacology.* 2012;62(3):1308–1321.

Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry*. 2011;70(7):663-71.

Ministero della salute (ISTO). Influenza e vaccinazione antinfluenzale. Itália, FAQ: 2016. Disponível em: http://www.salute.gov.it/portale/p5_1_1.jsp?lingua=italiano&id=103.

Money KM, Barke TL, Serezani A, Gannon M, Garbett KA, Aronoff DM, Mirnics K. Gestational diabetes exacerbates maternal immune activation effects in the developing brain. *Mol. Psychiatry*. 2017.

Monji A, Kato T, Kanba S. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2009;63(3):257-65.

Moreno JL, Kurita M, Holloway T, López J, Cadagan R, Martínez-Sobrido L, García-Sastre A, González-Maeso J. Maternal influenza viral infection causes schizophrenia-like alterations of 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptors in the adult offspring. *J Neurosci*. 2011;31(5):1863-72.

Müller N, Weidinger E, Leitner B, Schwarz MJ. The role of inflammation in schizophrenia. *Front Neurosci*. 2015;9:372.

Najjar S, Pearlman DM, Devinsky O, Najjar A, Zagzag D. Neurovascular unit dysfunction with blood-brain barrier hyperpermeability contributes to major depressive disorder: a review of clinical and experimental evidence. *J Neuroinflammation*. 2013;10:142.

Nguyen AD, Pelavin PE, Shenton ME, Chilakamarri P, McCarley RW, Nestor PG, Levitt JJ. Olfactory sulcal depth and olfactory bulb volume in patients with schizophrenia: an MRI study. *Brain Imaging Behav*. 2011;5(4):252–261.

Nunes MC, Madhi SA. Review on the effects of influenza vaccination during pregnancy on preterm births. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(11):2538-48.

Ozawa K, Hashimoto K, Kishimoto T, Shimizu E, Ishikura H, Iyo M. Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2006;59(6):546–554.

Palumbo ML, Trincherò MF, Zorrilla-Zubilete MA, Schinder AF, Genaro AM. Glatiramer acetate reverts stress-induced alterations on adult neurogenesis and behavior. Involvement of Th1/Th2 balance. *Brain Behav Immun*. 2012;26(3):429–38.

Patterson, PH. Maternal effects on schizophrenia risk. *Science*. 2007;318(5850):576–7.

Piontkewitz Y, Arad M, Weiner I. Tracing the development of psychosis and its prevention: what can be learned from animal models. *Neuropharmacology*. 2012;62(3):1273–1289.

Pisitkun P, Deane JA, Difilippantonio MJ, Tarasenko T, Satterthwaite AB, Bolland, S. Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science*. 2006;312(5780):1669-72.

Polyzos KA, Konstantelias AA, Pitsa CE, Falagas ME. Maternal Influenza Vaccination and Risk for Congenital Malformations: A Systematic Review and Meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2015;126(5):1075-84.

- Potvin S, Stip E, Sepehry AA, Gendron A, Bah R, Kouassi E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry*. 2008;63(8):801-8.
- Powell CM, Miyakawa T. Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? *Biol Psychiatry*. 2006;59(12):1198-207.
- Prediger RDS, Batista LC, Takahashi RN. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res*. 2005b;159(2):197-205.
- Prediger RDS, Batista LC, Takahashi RN. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiol Aging*. 2005a;26(6):957-64.
- Prut I, Belzunc C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviours: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003;463(1-3):3-33.
- Ramtekkar UP, Reiersen AM, Todorov AA, Todd RD. Sex and age differences in attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms and diagnoses: implications for DSM-V and ICD-11. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010;49(3):217-28.
- Reddy RD, Yao JK. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1996;55(1-2):33-43.
- Reisinger S, Khan D, Kong E, Berger A, Pollak A, Pollak DD. The poly(i:c)induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacol Ther*. 2015;149:213-26.
- Réus GZ, Fries GR, Stertz L, Badawy M, Passos IC, Barichello T, Kapczinski F, Quevedo J. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience*. 2015;300:141-54.
- Romero E, Guaza C, Castellano B, Borrell J. Ontogeny of sensorimotor gating and immune impairment induced by prenatal immune challenge in rats: implications for the etiopathology of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2010;15(4):372-383.
- Ron-Harel N, Segev Y, Lewitus GM, Cardon M, Ziv Y, Netanel D, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Domany E, Schwartz M. Age-dependent spatial memory loss can be partially restored by immune activation. *Rejuvenation Res*. 2008;11(5):903-13.
- Rosa PB, Ribeiro CM, Bettio LE, Colla A, Lieberknecht V, Moretti M, Rodrigues AL. Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;127:1-6.
- Rucklidge JJ. Gender differences in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am*. 2010;33(2):357-73.
- Ruedy J. Teratogenic risk of drugs used in early pregnancy. *Can Fam Physician*. 1984;30:2133-6.

- Saadani-Makki F, Kannan S, Lu X, Janisse J, Dawe E, Edwin S, Romero R, Chugani D. Intrauterine administration of endotoxin leads to motor deficits in a rabbit model: a link between prenatal infection and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 199(6):651.e1-7.
- Samuelsson AM, Jennische E, Hansson HA, Holmang A. Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;290(5):1345–56.
- Schulz D, Huston JP, Buddenberg T, Topic B. “Despair” induced by extinction trials in the water maze: relationship with measures of anxiety in aged and adult rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2007;87(3):309–23.
- Schwartz M, Shechter R. Systemic inflammatory cells fight off neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(7):405–410.
- Schwendener S, Meyer U, Feldon J. Deficient maternal care resulting from immunological stress during pregnancy is associated with a sex-dependent enhancement of conditioned fear in the offspring. *J Neurodev Disord*. 2009;1(1):15–32.
- Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, Patterson PH. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J Neurosci*. 2003;23(1):297–302.
- Shi L, Smith SE, Malkova N, Tse D, Su Y, Patterson PH. Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring. *Brain Behav Immun*. 2009;23(1):116–23.
- Shi L, Tu N, Patterson PH. Maternal influenza infection is likely to alter fetal brain development indirectly: the virus is not detected in the fetus. *Int J Dev Neurosci*. 2005;23(2-3):299–305.
- Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc Biol Sci*. 2015;282(1821):20143085.
- Simpson J, Ryan C, Curley A, Mulcaire J, Kelly JP. Sex differences in baseline and drug-induced behavioural responses in classical behavioural tests. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012;37(2):227-36.
- Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci*. 2007;27(40):10695–702.
- Soffié M, Lamberty Y. Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: possible interaction with olfactory sensitivity. *Behav Process*. 1988;17(3):181-90.
- Souza MF, Couto-Pereira NS, Freese L, Costa PA, Caletti G, Bisognin KM, Nin MS, Gomez R, Barros HM. Behavioral effects of endogenous or exogenous estradiol and progesterone on cocaine sensitization in female rats. 2014;47(6):505-14.
- Spooren A, Kolmus K, Laureys G, Clinckers R, De Keyser J, Haegeman G, Gerlo S. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Res Rev*. 2011;67(1–2):157–183.
- Stertz L, Magalhães PV, Kapczinski F. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. *Curr Opin Psychiatry*. 2013;26(1):19-26.

- Svedin P, Kjellmer I, Welin AK, Blad S, Mallard C. Maturation effects of lipopolysaccharide on white-matter injury in fetal sheep. *J Child Neurol*. 2005;20(12):960–4.
- Swerdlow NR, Weber M, Qu Y, Light GA, Braff DL. Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. *Psychopharmacology*. 2008;199(3):331–388.
- Torcia MG, Nencioni L, Clemente AM, Civitelli L, Celestino I, Limongi D, Fadigati G, Perissi E, Cozzolino F, Garaci E, Palamara AT. Sex differences in the response to viral infections: TLR8 and TLR9 ligand stimulation induce higher IL10 production in males. 2012;7(6):e39853.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*. 2002;415(6875):1030–4.
- Vizi ES, Kiss JP. Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus*. 1998;8(6):566–607.
- Vuillermot S, Weber L, Feldon J, Meyer U. A longitudinal examination of the neurodevelopmental impact of prenatal immune activation in mice reveals primary defects in dopaminergic development relevant to schizophrenia. *J Neurosci*. 2010; 30(4):1270–87.
- Wang TW, Zhang H, Gyetko MR, Parent JM. Hepatocyte growth factor acts as a mitogen and chemoattractant for postnatal subventricular zone–olfactory bulb neurogenesis. *Mol Cell Neurosci*. 2011;48(1):38–50.
- Weinstock M. Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behaviour. *Neurochem Res*. 2007;32(10):1730–40.
- Weiss IC, Feldon J. Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacology*. 2001;156(2-3):305–26.
- Werling DM, Geschwind DH. Understanding sex bias in autism spectrum disorder. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(13):4868–9.
- Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural/neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*. 2005;52(2):90–110.
- Winter C, Djodari-Irani A, Sohr R, Morgenstern R, Feldon J, Juckel G, Meyer U. Prenatal immune activation leads to multiple changes in basal neurotransmitter levels in the adult brain: implications for brain disorders of neurodevelopmental origin such as schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009;12(4):513–24.
- Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, Lee JK, Patrie J. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75(4):637–9.
- World Health Organization. Influenza vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2005;80(33):277–88.
- World Health Organization; 2012. [Acesso em 2012, outubro, 23]. Disponível em <http://www.who.int/influenza/vaccines/SAGEinformation/en/>

World Health Organization. Recommended Routine Immunization. World Health Organization; 2015. [Acesso em 2015, fevereiro, 27]. Disponível em http://www.who.int/immunization/policy/Immunization_routine_table1.pdf?ua=1.

Wu JH, Han YT, Yu JY, Wang TW. Pheromones from males of different familiarity exert divergent effects on adult neurogenesis in the female Accessory Olfactory Bulb. *Dev Neurobiol*. 2013;73(8):632–45.

Xia Y, Qi F, Zou J, Yang J, Yao Z. Influenza vaccination during early pregnancy contributes to neurogenesis and behavioral function in offspring. *Brain Behav Immun*. 2014b;42:212-21.

Xia Y, Qi F, Zou J, Yao Z. Influenza A(H1N1) vaccination during early pregnancy transiently promotes hippocampal neurogenesis and working memory. Involvement of Th1/Th2 balance. *Brain Res*. 2014a;1592:34-43.

Yee N, Ribic A, de Roo CC, Fuchs E. Differential effects of maternal immune activation and juvenile stress on anxiety-like behaviour and physiology in adult rats: no evidence for the "double-hit hypothesis". *Behav Brain Res*. 2011;10;224(1):180-8.

Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*. 2008;132(4):645–660.

Zhao G, Zhou S, Davie A, Su Q. Effects of moderate and high intensity exercise on T1/T2 balance. *Exerc Immunol Rev*. 2012;18: 98–114.

Zhao Q, Peng C, Wu X, Chen Y, Wang C, You Z. Maternal sleep deprivation inhibits hippocampal neurogenesis associated with inflammatory response in young offspring rats. *Neurobiol Dis* 2014;68:57-65.

Ziv Y, Schwartz M. Immune-based regulation of adult neurogenesis: implications for learning and memory. *Brain Behav Immun*. 2008;22(2):167–76.

ANEXO



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeitos neuroquímicos e comportamentais na prole de ratas Wistar vacinadas contra a Influenza A durante o período gestacional**", registrada com o protocolo nº **038/2016-1**, sob a responsabilidade de **Alexandra Ioppi Zugno**, junto à equipe: **Tatiana Barichello, Ana Paula Moreira, Jaqueline da Silva Generoso, Lutiana Roque Simões, Renan Antônio Ceretta, Cássia Pereira Rafael, Cristiano Julio Faller, Jessica de Assis Goulart, Gustavo Sangiogo da Silva, Alexandra Stephanie Almeida Heylmann, Gustavo Mastella, Louyse Sulzbach Damázio** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **19/04/2016**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	05/2016 a 04/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	180
Peso/Idade	250-300g / 2 meses
Sexo	Masculino (144) Feminino (36)
Origem	Biotério da UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "**Neurochemical and behavioral effects in the offspring of female rats vaccinated against Influenza A during pregnancy**".


Protocol number: **038/2016-1**

Principal Investigator: **Alexandra Ioppi Zugno**

Researchers: **Tatiana Barichello, Ana Paula Moreira, Jaqueline da Silva Generoso, Lutiana Roque Simões, Renan Antônio Ceretta, Cássia Pereira Rafael, Cristiano Julio Faller, Jessica de Assis Goulart, Gustavo Sangiogo da Silva, Alexandra Stephanie Almeida Heylmann, Gustavo Mastella, Louyse Sulzbach Damázio.**

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 19 de abril de 2016.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA