



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO
COMPORTAMENTO

ELIFRANCES GALDINO DE OLIVEIRA

**DEXTROCETAMINA PREVINE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
MODULA A EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS À
ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA**

Recife
2022

ELIFRANCES GALDINO DE OLIVEIRA

**DEXTRCETAMINA PREVINE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
MODULA A EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS À
ATIVÇÃO IMUNE MATERNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco, área de concentração em neurociências, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dayane Aparecida Gomes

Coorientador: Prof^o. Dr. Filipe Silveira Duarte

Recife

2022

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

O48d Oliveira, Elifrances Galdino de.
Dextrocetamina previne as alterações comportamentais e modula a expressão de citocinas em camundongos expostos à ativação imune materna / Elifrances Galdino de Oliveira. – 2022.
70 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora : Dayane Aparecida Gomes.
Coorientador : Filipe Silveira Duarte.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento. Recife, 2022.

Inclui referências e anexo.

1. Ketamina. 2. Transtornos do Neurodesenvolvimento. 3. Citocinas. I. Gomes, Dayane Aparecida (Orientadora). II. Duarte, Filipe Silveira (Coorientador). III. Título.

616.84 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2023-084)

ELIFRANCES GALDINO DE OLIVEIRA

**DEXTRCETAMINA PREVINE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
MODULA A EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS À
ATIVÇÃO IMUNE MATERNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco, área de concentração em neurociências, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento.

Aprovada em: 29/07/2022

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Dayane Aparecida Gomes

Prof^a. Dr^a. Sandra Lopes de Souza

Prof^a. Dr^a. Julliet Araújo De Souza

Em homenagem à minha avó paterna, Berenice da Silva Oliveira (*in memoriam*).

Ao meu sobrinho Célio Mathias, alegria de nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda força, paciência e discernimento que tem me dado. As oportunidades que tenho em minha vida são graça tua Pai.

Aos meus pais, nada disso seria possível sem as bases fornecidas por vocês. À minha mãe, Luciana Feliciano de Souza Santos, suas orações, cuidado e toda preocupação são o mais puro exemplo de amor. Ao meu pai, Eli Galdino de Oliveira, por seu exemplo de perseverança e de que nossos objetivos podem ser alcançados sempre por meio de nosso trabalho. Muito obrigado!

Aos meus irmãos Patrícia Feliciano, Guilherme Antônio e Ellen Estevão, pelo carinho, preocupação e palavras de apoio. Em especial a Gui, por nossas discussões científicas, troca de conhecimento e apoio mútuo na carreira acadêmica.

À Sebastiana Feliciano, minha avó, primeira pessoa que me apoiou a iniciar esta caminhada anos atrás. Suas palavras e apoio financeiro foram essenciais para dar os primeiros passos. A todos da minha família, por vezes abdiquei de momentos ao lado de vocês para me dedicar à realização deste trabalho, amo vocês, desculpem-me.

À Dayane Aparecida Gomes, amiga e orientadora, por quem tenho grande apreço e admiração, agradeço por me oferecer um ambiente de crescimento profissional e pessoal. Obrigado pela confiança, momentos de descontração, por toda paciência, disponibilidade para me ensinar, tirar as minhas dúvidas e discutir. Obrigado por me ensinar muito sobre o meio acadêmico e também a repartir, estender a mão e ajudar o próximo. Não há meios de retribuir o que tem me proporcionado.

A Eduardo Carvalho Lira, por ter me proporcionado um ambiente para desenvolver habilidades e conhecimento. Obrigado também pelo apoio, ensinamentos, questionamentos e desafios que tanto me motivam.

A Filipe Silveira Duarte, meu coorientador, pelo direcionamento no início dos experimentos e conhecimento compartilhado durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Sandra Lopes de Souza, por sua disponibilidade para tirar minhas dúvidas e tantos ensinamentos transmitidos ao longo do mestrado.

A Ivson Silva, por ter me levado para um estágio de iniciação científica no Laboratório de Neuroendocrinologia e Metabolismo (LNEM) da Universidade Federal

de Pernambuco em 2018, onde iniciei minha vida científica, pude desenvolver esse trabalho e sigo como membro.

Aos amigos de longa data Jobson Silva, Djalma Ozorio, Clefson Souza, Izael Silva e Thomas Pedro, pelo apoio, incentivo a dar continuidade com os estudos, cumplicidade e conversas sempre muito divertidas.

Aos membros do LNEM e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Raphaele Beltrão, Renata Alves, Eucilene Kélita, Danielle Dutra, Rosa, Cláudia, Carla Tabosa, Alanne Lucena, Hilde, Widarlane Ângela, Amanda, Lidiane, técnicos e colegas e tantos outros por seus ensinamentos, discussões, ajuda e momentos tão divertidos. À Mayara Victória, pelas discussões científicas, perguntas e contribuição na reta final do desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por sua companhia, alegria, apoio e empenho. Agradecimento especial a Diógenes Afonso e José Carlos pela ajuda em todas as etapas dos experimentos, vocês foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Bioquímica Geral, Molecular e do Exercício, Professora Claudia Jacques Lagranha, Cássia, Daniele, Anderson e Osmar. Obrigado pela imensurável contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Desordens Digestivas, Lorena, João, Lucas e Professor Renan, pela troca de conhecimento, amizade e momentos de alegria.

Às Professoras Ana Cristina e Maria das Graças, do Departamento de Anatomia da UFPE, pelo acolhimento no estágio de docência e por todo conhecimento que compartilham comigo. A todos os meus professores, pela inspiração e contribuição fundamental na minha formação.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento e todos que fazem parte desta instituição por me acolher e me formar como profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa e financiamento do projeto de pesquisa.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram com minha formação e/ou com este trabalho e não foram citados.

Uns

Uns, com os olhos postos no passado,
Veem o que não veem: outros, fitos
Os mesmos olhos no futuro, veem
O que não pode ver-se.

Por que tão longe ir pôr o que está perto —
A segurança nossa? Este é o dia,
Esta é a hora, este o momento, isto
É quem somos, e é tudo.

Perene flui a interminável hora
Que nos confessa nulos. No mesmo hausto
Em que vivemos, morreremos. Colhe
O dia, porque és ele.

Ricardo Reis (heterônimo de Fernando Pessoa)
(REIS, 2007, p. 49).

RESUMO

Doenças do neurodesenvolvimento como o autismo e esquizofrenia acometem cerca de 1% da população mundial. Eventos que ocorrem durante o desenvolvimento, como a ativação imune materna, têm sido relacionados com a apresentação destas doenças. Estudos em roedores corroboram que a prole exposta à ativação imune materna apresenta alterações comportamentais que são observadas na vida adulta. Dentro do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar, em camundongos machos, os efeitos da administração de dextrocetamina nas alterações comportamentais e moleculares induzidas pela ativação imune materna. Fêmeas gestantes receberam administração de LPS (100 µg/kg) ou salina (1 ml/kg) no 15º e 16º dia gestacional. A prole destas fêmeas foi alocada nos grupos controle, grupo dextrocetamina (DEX), grupo ativação imune materna (MIA) ou MIA+DEX de acordo com a administração de dextrocetamina (20 mg/kg) ou salina (1 ml/kg) no período do 36º ao 50º dia pós-natal. No 60º dia pós-natal os animais foram testados no labirinto em Y, para a análise de memória espacial de trabalho, e no 62º dia pós-natal foram testados no campo aberto, para análise do comportamento relacionado à ansiedade e interação social. No 63º dia pós-natal foram coletadas amostras do córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo para análise da expressão gênica das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e TGF- β 1. Nos testes comportamentais, os resultados demonstraram que dextrocetamina preveniu o aumento da ansiedade experimental e a redução da interação social induzidas pela ativação imune materna. A análise da expressão gênica no cerebelo demonstrou que a dextrocetamina preveniu o aumento na expressão de TNF- α induzido pela ativação imune materna. No hipocampo, a dextrocetamina induziu aumento da expressão de TGF- β 1 e no córtex pré-frontal preveniu o aumento da expressão de IL-1 β , IL-6, e TGF- β 1. Assim, concluímos que a administração de dextrocetamina previne o aumento da ansiedade experimental e a redução da interação social induzidos pela ativação imune materna, associado à regulação da expressão de citocinas no cerebelo, hipocampo e córtex pré-frontal.

Palavras-chave: cetamina. distúrbios do neurodesenvolvimento. citocinas.

ABSTRACT

Neurodevelopmental disorders such as autism and schizophrenia impact about 1% of the world's population. Events that occur during development, such as maternal immune activation, have been linked to the appearance of these diseases. Rodent studies support that offspring exposed to maternal immune activation exhibit behavioral changes that are observed in adulthood. The present study aimed to evaluate, in male mice, the effects of arketamine administration on behavioral and molecular alterations induced by maternal immune activation. Pregnant females received administration of LPS (100 µg/kg) or saline (1 ml/kg) on gestational days 15 and 16. The offspring were allocated to control, DEX, MIA, or MIA+DEX groups according to arketamine (20 mg/kg) or saline (1 ml/kg) administration in the period from postnatal day 36 to 50. On postnatal day 60, the animals were tested in the Y maze for spatial working memory analysis, and on postnatal day 62, they were tested in the open field for analysis of anxiety-related behavior and social interaction. On a postnatal day 63, samples from the prefrontal cortex, hippocampus, and cerebellum were collected for analysis of gene expression of the cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α , and TGF- β 1. In behavioral tests, the results showed that arketamine prevented the increased experimental anxiety and reduced social interaction induced by maternal immune activation. Gene expression analysis in the cerebellum demonstrated that arketamine prevented the increase in TNF- α expression induced by maternal immune activation. In the hippocampus, arketamine induced increased expression of TGF- β 1 and in the prefrontal cortex, it prevented the increased expression of IL-1 β , IL-6, and TGF- β 1. Therefore, we conclude that arketamine administration prevents the increase in experimental anxiety and reduction in social interaction induced by maternal immune activation, associated with the regulation of cytokine expression in the cerebellum, hippocampus, and prefrontal cortex.

Key words: ketamine. neurodevelopmental disorders. cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Processos do desenvolvimento dos sistemas nervoso e imune que podem ser afetados pela MIA induzida nos DG 15 e 16.	17
Figura 2 –	Desenho experimental em formato de linha do tempo	38
Figura 3 –	Testes comportamentais utilizados	39
Figura 4 –	Efeito da administração de LPS no DG 15 sobre o ganho de massa corpórea (A), duração da gestação (B) e número total de filhotes por ninhada (C)	43
Figura 5 –	Efeitos da administração de dextrocetamina na prole Controle ou submetida à MIA sobre a memória espacial de curto prazo no 60° DPN	44
Figura 6 –	Efeitos da administração de dextrocetamina na prole Controle ou submetida à MIA sobre a ansiedade experimental no 62° DPN	45
Figura 7 –	Efeitos da administração de dextrocetamina na prole Controle ou submetida à MIA sobre a interação social aos no 62° DPN	47
Figura 8 –	Efeitos da administração de dextrocetamina na prole Controle ou submetida à MIA sobre a expressão gênica de citocinas IL-1 β , IL-6, TGF- β e TNF- α no cerebelo	48
Figura 9 –	Efeitos da administração de dextrocetamina na prole Controle ou submetida à MIA sobre a expressão gênica de citocinas IL-1 β , IL-6, TGF- β e TNF- α no hipocampo	49
Figura 10 –	Efeitos da administração de dextrocetamina na prole Controle ou submetida à MIA sobre a expressão gênica de citocinas IL-1 β , IL-6, TGF- β e TNF- α no córtex pré-frontal	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	Receptor do ácido α -amino-3-hidróxi-5-metilsoxazol-4-propiónico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
cm	Centímetros
DAMP	Padrões moleculares associados ao dano
DG	Dia gestacional
DPN	Dia pós-natal
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
PAMPS	Padrões moleculares associados ao dano
PCR	Reação em cadeia da polimerase
poly I:C	Ácido poliinosínico-policitidílico
RNA	Ácido ribonucleico
s	Segundo
TEA	Transtorno do espectro autista
TGF- β	Fator transformante de crescimento β
TLR	Receptores do tipo <i>toll</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Ativação imune materna experimental em roedores	20
2.2	Componentes do sistema imune como moduladores de processos e do funcionamento do sistema nervoso	22
2.3	Ativação imune materna como agente perturbador do neurodesenvolvimento: participação de componentes do sistema imune e repercussões sobre a prole	25
2.4	Cetamina como moduladora do comportamento e processos neuroimunes	29
3	HIPÓTESE	34
4	OBJETIVOS	35
4.1	Objetivo geral	35
4.2	Objetivos específicos	35
5	MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1	Animais	36
5.2	Reprodução e ativação imune materna	36
5.3	Grupos experimentais	37
5.4	Testes comportamentais	38
<i>5.4.1</i>	<i>Obtenção de imagens e análise de comportamento</i>	38
<i>5.4.2</i>	<i>Teste de alternância espontânea</i>	39
<i>5.4.3</i>	<i>Teste de campo aberto</i>	40
<i>5.4.4</i>	<i>Teste de interação social</i>	41
5.5	Análise de expressão gênica	41
5.6	Análise estatística	42
6	RESULTADOS	43
6.1	Duração da gestação, número de filhotes por ninhada e massa corpórea das progenitoras prenhes	43
6.2	Testes comportamentais na prole	43
<i>6.2.1</i>	<i>Memória espacial de trabalho</i>	43
<i>6.2.2</i>	<i>Ansiedade experimental</i>	44

6.2.3	<i>Interação social</i>	46
6.3	Análise de expressão gênica	46
7	DISCUSSÃO	50
8	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO A – Aprovação da comissão de ética no uso de animais	70

1 INTRODUÇÃO

O neurodesenvolvimento começa antes do nascimento e continua na vida pós-natal. O programa genético inerente somado às modificações epigenéticas e eventos ambientais organiza a formação de uma rede neural estrutural e funcional complexa, o conectoma, através de processos minuciosamente orquestrados. Dada a sutileza desses processos, o sistema nervoso é consideravelmente vulnerável durante o seu desenvolvimento. Eventos ocorrendo nesse período crítico são potencialmente indutores de danos que podem ser permanentes (ESTES; MCALLISTER, 2016). Alguns desses eventos são reconhecidos hoje como fatores de risco para o desenvolvimento de doenças como transtorno do espectro autista (TEA), esquizofrenia, paralisia cerebral, epilepsia, depressão e déficits cognitivos (KNUESEL; CHICHA; BRITSCHGI; SCHOBEL *et al.*, 2014).

Estudos epidemiológicos sugerem que uma infecção durante o período gestacional é um fator de risco para a apresentação de doenças do neurodesenvolvimento. Evidências sugerem que a ativação imune materna (MIA, do inglês *maternal immune activation*) pode ser um evento prejudicial ao sistema nervoso, expondo o embrião/feto a condições adversas por modificar as condições de funcionamento da interface materno-fetal e/ou por ação direta no organismo em desenvolvimento (LU-CULLIGAN; IWASAKI, 2020). A MIA pode ser definida como a ativação e resposta do sistema imune inato e/ou adaptativo de uma gestante a um agente infeccioso ou não-infeccioso. Na ausência de um agente infeccioso a MIA pode ser desencadeada por estresse, doença autoimune, asma, alergia e outros ativadores da resposta imune (JIANG; COWAN; MOONAH; PETRI, 2018; ZENGELER; LUKENS, 2021).

Apesar da MIA ser necessária e originalmente protetiva, pode imprimir alterações nos sistemas imune e nervoso do feto por si só, bem como, influenciar a vulnerabilidade a outros fatores de risco posteriormente durante a vida. Diversos trabalhos têm apontado a participação de vias de sinalização originalmente estudadas na resposta imune atuando também no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso (MOR; ALDO; ALVERO, 2017). Citocinas, como IL-1 β , IL-6, TGF- β e TNF- α , podem ser detectadas em tecidos embrionários e extraembrionários, e variações na expressão dessas moléculas, como na MIA, pode influenciar diversos processos do neurodesenvolvimento, promovendo alterações no funcionamento do sistema nervoso, bem como no comportamento (LU-CULLIGAN; IWASAKI, 2020). Estudos

com modelos experimentais de MIA em roedores têm possibilitado elucidar mecanismos envolvidos com as alterações comportamentais apresentadas pela prole que são relacionados com os sintomas de doenças como a esquizofrenia, TEA e depressão (SOLEK; FAROOQI; VERLY; LIM *et al.*, 2018). Levando em consideração a interação entre os sistemas imune e nervoso e o potencial da MIA para induzir um desbalanceamento nessa interação, drogas com potencial para modular ambos os sistemas, como a dextrocetamina, podem ser testadas para verificar sua capacidade de prevenir as alterações observadas na prole exposta à MIA.

A (D/E)-cetamina é composta por uma mistura racêmica dos enantiômeros escetamina e dextrocetamina. A escetamina é utilizada para o tratamento da depressão em pacientes com resistência ao tratamento convencional, demonstrando efeito antidepressivo rápido e duradouro (ANVISA, 2020; RIGGS; GOULD, 2021). Apesar do uso da escetamina como antidepressivo, seus efeitos colaterais indesejados podem limitar sua utilização (YANG; YANG; LUO; HASHIMOTO, 2019). Levando em consideração as limitações no uso da escetamina, é de interesse testar a dextrocetamina em modelos animais de doenças do neurodesenvolvimento, pois esta molécula apresenta menos efeitos colaterais e efeitos antidepressivos mais significativos que a escetamina (CHANG; ZHANG; PU; QU *et al.*, 2019). Dentro do exposto, esse trabalho objetiva analisar a capacidade da dextrocetamina para prevenir as alterações comportamentais e na expressão gênica induzidas pela MIA.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

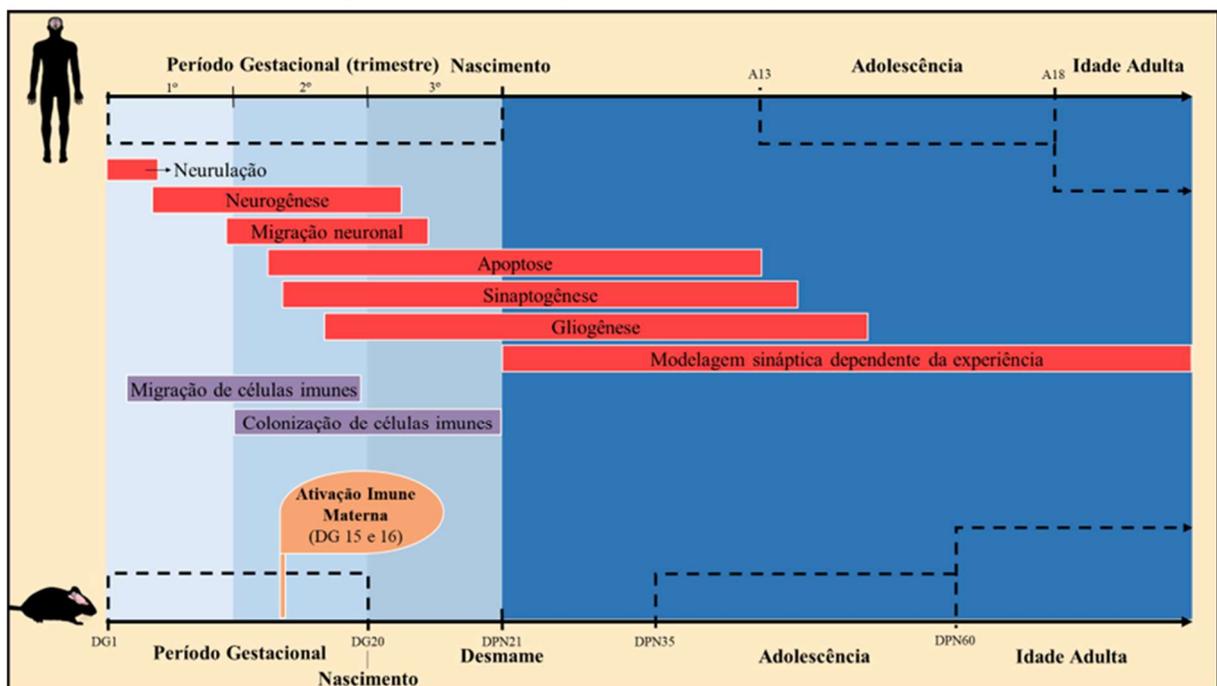
Ao final do período embrionário as estruturas rudimentares do encéfalo são estabelecidas juntamente com os outros componentes do sistema nervoso central e periférico. O período subsequente de neurodesenvolvimento se estende até o final da gestação e continua após o nascimento. O neurodesenvolvimento se dá através de processos que são compartilhados entre seres humanos e camundongos, embora a duração e o período da vida em que esses processos acontecem seja diferente. Durante o período fetal há um rápido crescimento e formação de estruturas corticais e subcorticais, incluindo as bases estruturais das principais vias nervosas, através dos axônios (KOSTOVIĆ; JOVANOVIĆ-MILOSEVIĆ, 2006). À medida que se desenvolvem, os neurônios migram para diferentes áreas do sistema nervoso, onde iniciam suas conexões com outros neurônios. Assim, as mudanças morfológicas macroscópicas são sustentadas pelas mudanças que ocorrem a nível celular e molecular. As mudanças estruturais altamente reguladas que acontecem a nível micro e macroscópico podem ser refletidas no comportamento, posteriormente na vida adulta (STILES; JERNIGAN, 2010).

Eventos ambientais que perturbam a homeostase de um organismo podem influenciar o desenvolvimento e amadurecimento do sistema nervoso e assim, desviar o curso do neurodesenvolvimento normal em um processo de reprogramação gênica. As evidências sugerindo que a MIA é um desses eventos que perturba a homeostase e torna-se um fator de risco para doenças do neurodesenvolvimento está em concordância com a teoria da origem desenvolvimentista da saúde e doença (DOHaD, do inglês *developmental origins of health and disease*) que propõe que as experiências ambientais pré-natais e durante os primeiros anos de vida do indivíduo podem afetar sua saúde e susceptibilidade a doenças ao longo da vida (GILLMAN, 2005). De acordo com a DOHaD as experiências ambientais podem induzir respostas adaptativas que se antecipam às exigências ambientais posteriormente e determinam como o indivíduo interage com o meio. O grau de adaptação entre o ambiente inicial e a real demanda posterior estariam relacionados ao risco de apresentação de doenças (DOI; USUI; SHIMADA, 2022).

Admite-se que doenças complexas como a esquizofrenia, TEA e depressão surgem de interações entre genes e o ambiente ao longo do tempo. Assim, uma das possíveis explicações para a relação entre eventos ambientais e o desfecho na saúde e susceptibilidade à doença, na DOHaD, é a epigenética. A epigenética é um

mecanismo molecular que altera a expressão dos genes por alterações químicas sem modificar a sequência do genoma, refletindo a interação entre fatores ambientais e genéticos. As adaptações epigenéticas podem ocorrer por meio da metilação dos pares de bases, modificação de histonas e ação de microRNAs não codificantes. Basil e colaboradores demonstraram que a indução da MIA em camundongos no dia gestacional (DG) 9 promove alterações de metilação que permanecem até o período da adolescência (BASIL; LI; DEMPSTER; MILL *et al.*, 2014). Entretanto, ao longo do desenvolvimento, mecanismos diversos podem regular a resposta às perturbações ambientais, o que depende do tipo e gravidade da exposição, janela de vulnerabilidade do sistema nervoso e sexo do organismo (BALE, 2015). A **Figura 1** demonstra como a MIA, em roedores e seres humanos, pode perturbar diversos processos essenciais para o neurodesenvolvimento e agir como um evento que promove alterações a longo prazo, seja a nível molecular ou funcional.

Figura 1. O neurodesenvolvimento ocorre através de processos regulados que são compartilhados entre seres humanos (superior) e roedores (inferior), contudo, o período destes processos difere entre as espécies. São mostrados alguns processos importantes para o neurodesenvolvimento (barras horizontais em vermelho) e para o desenvolvimento do sistema imune (barras horizontais em roxo). A figura mostra os processos do neurodesenvolvimento podem ser afetados pela MIA induzida nos DG 15 e 16 (GUMA; PLITMAN; CHAKRAVARTY, 2019). A, ano; DG, dia gestacional; DPN, dia pós-natal.



Fonte: Oliveira (2022).

A ligação entre infecções (um dos mecanismos para desencadear a MIA) durante a gestação e doenças do neurodesenvolvimento é discutida há anos. Por

exemplo, foi observado na pandemia de rubéola em 1964 que a apresentação de TEA foi de 7,5% nos indivíduos nascidos a partir da população exposta à infecção (CHESSE, 1971). Décadas depois, outro estudo observou uma incidência de 20% no diagnóstico de esquizofrenia entre nascidos de mães que foram diagnosticadas com rubéola (BROWN, 2006). Em contraste, o TEA e a esquizofrenia têm uma prevalência de cerca de 1% cada, na população geral (ESTES; MCALLISTER, 2016). No Brasil, a apresentação de diversos casos de microcefalia entre 2015 e 2016 recebeu grande atenção pública em decorrência dos efeitos sobre o neurodesenvolvimento associados à infecção pelo vírus *Zika* em gestantes (SADEGHIEH; SARGEANT; GREER; BERKE *et al.*, 2021). Atladóttir e colaboradores (ATLADÓTTIR; THORSEN; ØSTERGAARD; SCHENDEL *et al.*, 2010), em um estudo realizado a partir do sistema de registros de saúde da Dinamarca (dados de 1,5 milhões de crianças nascidas entre 1980 e 2006), demonstraram associação entre o diagnóstico de TEA e infecções virais durante o primeiro trimestre de gestação e infecções bacterianas no segundo trimestre de gestação.

Outro exemplo é a infecção por *Toxoplasma gondii*, que se adquirida durante a gestação apresenta considerável transmissão vertical e repercussões para a prole que variam desde a morte pré-natal a danos neurológicos, oculares e infecção latente por *T. gondii*. O *T. gondii* é um parasita intracelular que infecta cronicamente, a nível global, cerca de 25% da população humana. A infecção crônica latente pode se tornar ativa na presença de incompetência do sistema imune (MATTA; RINKENBERGER; DUNAY; SIBLEY, 2021). Estudos têm demonstrado que a infecção por *T. gondii*, assim como a infecção por vírus e bactérias, está associada com um maior risco para o desenvolvimento de esquizofrenia pela prole (MORTENSEN; NØRGAARD-PEDERSEN; WALTOFT; SØRENSEN *et al.*, 2007; XIAO; BUKA; CANNON; SUZUKI *et al.*, 2009).

Desde dezembro de 2019, quando a Organização Mundial de Saúde foi comunicada sobre alguns casos de pneumonia de etiologia desconhecida na cidade de Wuhan, China, a doença do coronavírus 2019, causada pelo vírus SARS-CoV-2, se alastrou pelo mundo. Alguns estudos pontuam que gestantes infectadas pelo SARS-CoV-2 têm maior chance de hospitalização, admissão na unidade de terapia intensiva e necessidade de ventilação mecânica (WASTNEDGE; REYNOLDS; VAN BOECKEL; STOCK *et al.*, 2021), embora não seja um consenso. Além da infecção, a resposta imunológica vigorosa e as complicações multissistêmicas da COVID-19,

outros fatores de risco podem ser considerados no período da pandemia do SARS-CoV-2, como o estresse causado pelo medo de adoecer/morrer, isolamento social e insegurança. Nesse contexto, a pandemia do SARS-CoV-2 pode ser um fator de risco considerável para a apresentação de doenças do neurodesenvolvimento (MCDONALD; MEW; HAWLEY; LOWE, 2021). Ademais, a pandemia do SARS-CoV-2 – e a possibilidade de propagação de outros patógenos futuramente – sublinha a necessidade de melhorar o entendimento de como eventos no estágio embrionário/fetal podem promover distúrbios sobre o neurodesenvolvimento e aumentar a sensibilidade a outros fatores de risco para o desenvolvimento de doenças neurológicas e psiquiátricas.

A população humana apresenta uma grande heterogeneidade quanto à genética, comportamento e ambiente onde vive, de modo que eventos como a MIA podem variavelmente influenciar a susceptibilidade a doenças (GILLMAN, 2005). Ademais, as evidências oriundas de estudos epidemiológicos, mostrando correlação entre a MIA e a apresentação de doenças do neurodesenvolvimento na prole, embora forneçam informações importantes para a compreensão da etiologia, não são suficientes para demonstrar causalidade entre o evento pré-natal e o diagnóstico da doença psiquiátrica. Em paralelo, os estudos clínicos têm limitação metodológica para explorar os mecanismos moleculares subjacentes à MIA, pois não é possível realizar procedimentos invasivos para a coleta de amostras biológicas. Outro fator importante nos estudos com humanos é a impossibilidade de diferenciar se as repercussões sobre o feto são causadas pelo patógeno ou pela MIA, bem como, identificar se há sinergismo com eventos pós-natais para aumentar o risco de doenças na prole.

Levando em consideração esses desafios metodológicos para estudar a MIA em seres humanos, a pesquisa com animais de laboratório torna-se essencial para identificar mecanismos fisiopatológicos e compreender como a MIA é capaz de influenciar o neurodesenvolvimento. Em consonância com essa proposta, estudos realizados com roedores e primatas não-humanos, onde fêmeas gestantes foram expostas à MIA em estágios específicos da gestação, mostram a íntima relação entre a MIA e anormalidades comportamentais na prole que têm sido relacionadas com ansiedade, depressão, TEA e esquizofrenia (BROWN; MEYER, 2018; ESTES; MCALLISTER, 2016; GUMUSOGLU; STEVENS, 2019; MEYER, 2019; MINAKOVA; WARNER, 2018). O conhecimento emergente produzido a partir desses trabalhos

permite criar um cenário mais amplo e inclusivo a respeito dos efeitos da MIA sobre o desenvolvimento embrionário/fetal.

2.1 Ativação imune materna experimental em roedores

Os imunógenos mais validados e comumente utilizados para desencadear a MIA na pesquisa com roedores são o lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina que compõe a parede celular externa de bactérias gram-negativas, e o ácido poliinosínico-policitídílico (poly I:C), um RNA de fita dupla sintético, que mimetizam uma infecção bacteriana e viral, respectivamente (GUMA; PLITMAN; CHAKRAVARTY, 2019; GUMUSOGLU; STEVENS, 2019). Esses componentes são reconhecidos como ligantes por receptores semelhantes a *toll* (TLR, do inglês *toll-like receptors*), importantes receptores transmembrana de reconhecimento de padrão (do inglês *pattern recognition receptors*), essenciais para a resposta do sistema imune a vírus, bactérias, fungos e parasitas. Foram identificados onze genes em humanos e treze em roedores relacionados à expressão de TLRs, com diferenças entre os receptores em sua especificidade a diferentes ligantes (KOGA; ALDO; MOR, 2009). TLR4 é fundamental na resposta efetiva do hospedeiro a bactérias gram-negativas por reconhecer a endotoxina LPS (POLTORAK; HE; SMIRNOVA; LIU *et al.*, 1998), enquanto que os TLR3, 7 e 8 têm papel central na resposta a vírus, sendo que TLR3 reconhece principalmente RNA de fita dupla, como o poly I:C (ALEXOPOULOU; HOLT; MEDZHITOV; FLAVELL, 2001), e os outros dois, RNA de fita simples. Em adição, os TLRs podem reconhecer padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMP, do inglês *damage associated molecular patterns*) como espécies reativas de oxigênio e proteínas liberadas em condições de estresse, dano ou morte celular, elucidando a capacidade do sistema imune de produzir uma resposta mesmo na ausência de um patógeno (KOGA; ALDO; MOR, 2009).

O reconhecimento do LPS pelo TLR4, ou do poly I:C pelo TLR3, recruta a proteína adaptadora de sinalização intracelular, o fator de diferenciação mielóide 88, (do inglês *myeloid differentiation protein 88*) causando uma cascata de fosforilações que desencadeia a ativação do fator nuclear *kappa B* (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa B*), um fator de transcrição. O NF- κ B, por sua vez, dirige a expressão de genes dos imunomediadores (citocinas, quimiocinas e substâncias antimicrobianas) que montam a resposta inflamatória. TLR3 e 4 podem ativar outro fator de transcrição, o fator regulador de interferon 3, que causa a produção de interferon I e expressão de outros genes induzidos por interferon. Assim, a resposta imune produzida pela

ativação de TLRs, seja através de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS, do inglês *pathogen associated molecular patterns*), como o LPS e o poly I:C, ou DAMPs, pode provocar alterações significativas no organismo do feto e na interface materno-fetal, já que muitos tecidos são responsivos às moléculas sinalizadoras da resposta imune. As evidências sugerem que diferentes tipos de agentes infecciosos (vírus, bactérias e parasitas) estão associados com doenças do neurodesenvolvimento, como autismo e esquizofrenia, cujo denominador comum é a ativação e resposta do sistema imune materno. Assim, mesmo na ausência de transmissão vertical do patógeno, a ativação imune materna parece ter participação importante nos distúrbios observados sobre o neurodesenvolvimento da prole. Através da síntese e mobilização de seus componentes o sistema imune elabora o combate à infecção e paralelamente esses componentes podem interagir e ter influência sobre o sistema nervoso do feto em desenvolvimento (ESTES; MCALLISTER, 2016; JASH; SHARMA, 2021). Biologicamente essa hipótese é suportada pela via comum para a produção de citocinas, quimiocinas e substâncias antimicrobianas da resposta imune após o reconhecimento de DAMPS ou PAMPS pelos receptores de reconhecimento de padrão, como os TLRs.

Nos últimos anos, trabalhos importantes têm elucidado a participação essencial de vias de sinalização originalmente conhecidas por seu papel na resposta imune em processos fundamentais do neurodesenvolvimento normal e da interface materno-fetal desde a implantação do blastocisto até o parto (MOR; ALDO; ALVERO, 2017). TLRs, citocinas e outras moléculas com funções importantes na imunidade podem ser detectadas em tecidos embrionários e extraembrionários com diferente padrão temporal e espacial de expressão (LU-CULLIGAN; IWASAKI, 2020). Por exemplo, as citocinas podem influenciar processos como a neurogênese, apoptose, diferenciação celular, maturação de células precursoras neurais e migração neuronal; e o sistema complemento, a proliferação celular e a poda sináptica (COULTHARD; HAWKSWORTH; WOODRUFF, 2018). A MIA induz um aumento da expressão de imunomediadores rapidamente, assim, o balanço dessas moléculas é alterado e por conseguinte os processos do neurodesenvolvimento normal que utilizam esses imunomediadores podem ser afetados. A atividade desses mediadores depende de diversos fatores como o tipo celular que expressa seu receptor, o microambiente da região encefálica, além de outras cascatas de sinalização convergentes no momento.

2.2 Componentes do sistema imune como moduladores de processos e do funcionamento do sistema nervoso

Os sistemas imune e nervoso em seu desenvolvimento têm processos minuciosamente coordenados para montar dois dos mais complexos sistemas do organismo de mamíferos, apresentando uma coleção de células altamente especializadas, condizente com suas funções. A participação de células e moléculas previamente descritas estritamente no contexto do sistema imune é agora elucidada no funcionamento do sistema nervoso, em todas as fases da vida, seja em estado patológico ou normal. A micróglia, por exemplo, célula imune primária residente no sistema nervoso, era conhecida como um simples fagócito e hoje sabe-se que esta célula participa de diversos processos, sendo essencial para a própria comunicação neuronal, seja esculpindo a estrutura neural ou participando ativamente da sinalização entre os neurônios (SCHAFER; LEHRMAN; STEVENS, 2013). Como resultado direto da interação neuroimune, o comportamento, produto mais elaborado da atividade e estrutura neural, pode ser influenciado por componentes descritos anteriormente apenas no contexto do sistema imune (ALVES DE LIMA; RUSTENHOVEN; DA MESQUITA; WALL *et al.*, 2020; REED; YIM; WIMMER; KIM *et al.*, 2020). A afirmação de que o encéfalo é um órgão imunologicamente privilegiado – a zona proibida para o sistema imune – tem sofrido mudanças ao longo dos anos, e a neuroimunologia emerge como uma área importante das neurociências para fornecer substratos para uma compreensão mais ampla do sistema nervoso e seus processos patológicos.

As citocinas, mensageiros proteicos solúveis, podem ser produzidas por diversas células no sistema nervoso, fisiologicamente ou envolvidas em processos patológicos, sendo a sua principal fonte produtora a micróglia e células imunes infiltradas (ZENGLER; LUKENS, 2021). A indução de MIA em roedores é caracterizada por aumento na expressão de citocinas na circulação materna (TALUKDAR; ABDUL; MAES; BERK *et al.*, 2021), na placenta (GIRARD; TREMBLAY; LEPAGE; SÉBIRE, 2010), no fluído amniótico (URAKUBO; JARSKOG; LIEBERMAN; GILMORE, 2001) e no encéfalo do feto (SIMÕES; SANGIOGO; TASHIRO; GENEROSO *et al.*, 2018). O papel das citocinas da família interleucina (IL) -1 durante o neurodesenvolvimento têm se mostrado complexo. IL-1 α e IL-1 β , dois dos componentes da família IL-1, são classicamente conhecidos como mediadores pró-inflamatórios que atuam ativando e polarizando muitas células do sistema imune. Ambas as interleucinas têm ação sobre o mesmo receptor, o receptor do tipo 1 de IL-

1, para desencadear uma sinalização dependente de fator de diferenciação mielóide 88, que pode ativar o NF- κ B e modificar a expressão de vários genes da resposta imune (SIMS; SMITH, 2010).

Em células neurais, IL-1 α e IL-1 β têm influência no processo de neurogênese (BORSINI; ZUNSZAIN; THURET; PARIANTE, 2015), sendo em alguns contextos promotoras de proliferação e diferenciação neuronal (GOUGEON; LOURENSSEN; HAN; NAIR *et al.*, 2013; PARK; KANG; HAN, 2018; WANG; FU; WANG; YU *et al.*, 2007), enquanto em outros são inibidoras de tais processos (BORSINI; ZUNSZAIN; THURET; PARIANTE, 2015; ZUNSZAIN; ANACKER; CATTANEO; CHOUDHURY *et al.*, 2012). Semelhantemente à sua ação pleiotrópica em processos do sistema imune, estas citocinas participam de outros processos além da neurogênese, como a gliogênese (AJMONE-CAT; CACCI; RAGAZZONI; MINGHETTI *et al.*, 2010), a inibição do crescimento axonal (NOLAN; NOLAN; O'KEEFFE, 2011), estímulo do crescimento de neuritos em fases iniciais (BOATO; HECHLER; ROSENBERGER; LÜDECKE *et al.*, 2011) e migração neuronal entre as camadas corticais (MA; LI; ZHANG; YANG *et al.*, 2014).

A sinalização mediada pela IL-6, outra citocina classicamente pró-inflamatória, tem ação variável e pode convergir para regular diversos processos no sistema nervoso. A IL-6 pode ser produzida no sistema nervoso por células imunes infiltradas, micróglia e até mesmo por neurônios (JÜTTLER; TARABIN; SCHWANINGER, 2002). No sistema nervoso maduro, a IL-6 participa da homeostase energética (WALLENIOUS; WALLENIOUS; AHRÉN; RUDLING *et al.*, 2002), neurogênese (VALLIÈRES; CAMPBELL; GAGE; SAWCHENKO, 2002) e regeneração axonal (CAFFERTY; GARDINER; DAS; QIU *et al.*, 2004). A IL-6 é considerada um fator neurotrófico dependente do contexto, induzindo diferenciação neuronal e liberação de outras neurotrofinas como o fator de crescimento neuronal (MÄRZ; HERGET; LANG; OTTEN *et al.*, 1997). Além de sua conhecida ação como agente pró-inflamatório, IL-6 parece modular a condução de informações para o sistema nervoso central, potencializando a sensibilidade a estímulos dolorosos através de sua interação com células imunes, células da glia e neurônios (KUMMER; ZEIDLER; KALPACHIDOU; KRESS, 2021). Tal função é fortalecida por estudos que mostraram uma redução da sensibilidade à dor em camundongos que não expressam IL-6 (ZHONG; DIETZEL; WAHLE; KOPF *et al.*, 1999).

A família do fator transformante de crescimento β (TGF- β , do inglês *transforming growth factor β*), à semelhança de sua atividade no sistema imune, participa de muitos processos durante o neurodesenvolvimento e tem ação dependente do contexto. A sinalização canônica de TGF- β inicia-se com seu reconhecimento pelo receptor de TGF- β , seguida pela fosforilação subjacente das Smads 2 e 3 pelo receptor, o que desencadeia a translocação de Smad4 para o núcleo, onde regulará a expressão gênica (HIEW; POON; YOU; LIM, 2021). O estresse (*in vivo*) (YOU; LUO; ZHANG; CHEN *et al.*, 2011) e níveis elevados de cortisol (*in vitro*) (ANACKER; CATTANEO; LUONI; MUSAELYAN *et al.*, 2013) são capazes de reduzir a neurogênese juntamente com a sinalização envolvendo TGF- β /Smad3. O TGF- β também participa do processo de especialização espacial dos neurônios. Há uma clara polarização nos neurônios: os dendritos recebem e integram estímulos ao corpo neuronal – o soma – e o axônio transmite os potenciais de ação distalmente ao corpo neuronal. O estímulo para apresentar um padrão onde há um axônio e vários dendritos acontece muito cedo e o TGF- β participa de forma importante na sinalização responsável por transformar um dos neuritos em axônio, pois a ausência do seu receptor é suficiente para suprimir tal diferenciação (YI; BARNES; HAND; POLLEUX *et al.*, 2010).

A sinalização de TGF- β é um bom exemplo de como moduladores de processos do neurodesenvolvimento são dependentes do contexto. Camundongos nocaute para as proteínas TGF- β 2 e 3 apresentam, interessantemente, redução no número de neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo ventral mas não no *locus ceruleus*, o que demonstra não apenas a importância do TGF- β na diferenciação de neurônios dopaminérgicos mas também que essa ação é dependente do microambiente (ROUSSA; WIEHLE; DÜNKER; BECKER-KATINS *et al.*, 2006). A inativação de Smad4 no encéfalo de camundongos é capaz de reduzir o número de células de Purkinje e interneurônios parvalbumínicos no cerebelo sem alterações morfológicas no hipocampo, sublinhando que a sinalização de TGF- β é importante na arquitetura do córtex cerebelar (ZHOU; ZHAO; LI; SHIMAZU *et al.*, 2003).

O fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*) é uma proteína classicamente pró-inflamatória com participação importante na resposta imune e envolvida no processo patológico de doenças como artrite reumatoide, insulite e psoríase. O TNF também está envolvido na fisiopatologia de doenças do sistema nervoso central, sendo estudada no contexto da esclerose múltipla há anos

(PROBERT, 2015). A complexidade da atividade de TNF no sistema nervoso é exemplificada pelos resultados obtidos em testes clínicos. Foi pensado que o TNF poderia ser um alvo terapêutico na esclerose múltipla, uma vez que classicamente tem ação pró-inflamatória. Entretanto, a inibição seletiva de TNF é capaz de exacerbar as crises na esclerose múltipla e induzir doença desmielinizante e neuropatia até mesmo em pacientes tratados para outras doenças (BOSCH; SAIZ; RAMOS-CASALS, 2011). Esses dados evidenciam que o TNF, a despeito de sua atividade pró-inflamatória, pode exercer ações essenciais para o funcionamento normal do sistema nervoso, ou mesmo regulando a neuroinflamação.

O TNF tem também atividade importante no fortalecimento das conexões realizadas pelo neurônio através do escalonamento sináptico, sendo as células da glia a principal fonte de TNF para esse processo. Sem o escalonamento sináptico as conexões entre os neurônios podem ser instáveis e ter funcionamento sub-ótimo (STELLWAGEN; MALENKA, 2006). Na transmissão sináptica excitatória o TNF tem ação potencializadora, modulando os níveis de glutamato na fenda sináptica. Com a presença de TNF a ativação dos astrócitos é seguida por influxo de cálcio (íon Ca^{2+}) e liberação de glutamato para potenciação sináptica. Quando a sinalização de TNF é inibida, a ativação dos astrócitos é seguida por influxo de Ca^{2+} mas a neuromodulação através do glutamato não é observada (SANTELLO; BEZZI; VOLTERRA, 2011). Aparentemente as ações e efeitos deletérios do TNF no sistema nervoso dependem do estado normal ou patológico apresentado.

Em conjunto, esses estudos demonstram como IL-1 β , IL-6, TGF- β e TNF estão envolvidos em processos essenciais para o neurodesenvolvimento saudável. Ademais, uma vez que a MIA pode alterar a expressão desses imunomediadores, esse desbalanceamento pode promover distúrbios nos processos do neurodesenvolvimento nos quais eles participam.

2.3 Ativação imune materna como agente perturbador do neurodesenvolvimento: participação de componentes do sistema imune e repercussões sobre a prole

As evidências acumuladas a partir de estudos com humanos sugerindo que a MIA está relacionada com a etiologia de doenças neurológicas e psiquiátricas têm fornecido um bloco de informações importante para a pesquisa básica. Esses estudos proporcionaram uma abordagem translacional – dos estudos epidemiológicos aos estudos de neurociência básica – para que fosse desenvolvido um entendimento mais

amplo dos mecanismos biológicos subjacentes à MIA e suas repercussões sobre o sistema nervoso e o comportamento. Tem sido demonstrado que diversos imunomediadores clássicos estão envolvidos nas repercussões da MIA sobre a prole (KNUESEL; CHICHA; BRITSCHGI; SCHOBEL *et al.*, 2014). Vários domínios da neurobiologia (perfil celular, estrutura encefálica, sinapses e sistemas de neurotransmissores) têm sido estudados com o objetivo de entender as interações neuroimunes na MIA. Esses estudos têm elucidado os mecanismos pelos quais a MIA causa uma ampla variedade de fenótipos comportamentais na prole, com relevância ao estudo da depressão, ansiedade, TEA e esquizofrenia (SOLEK; FAROOQI; VERLY; LIM *et al.*, 2018) e permitido explorar possíveis alvos terapêuticos.

A micróglia, célula imune mais abundante no sistema nervoso central, ao contrário do que foi anteriormente proposto, não é uma célula em estado quiescente na ausência de dano ou infecção, ou seja, serve como agente da função imunológica e nervosa de acordo com os estímulos (FRICK; WILLIAMS; PITTENGER, 2013). Atividade aberrante da micróglia tem sido identificada na esquizofrenia (FILLMAN; CLOONAN; CATTS; MILLER *et al.*, 2013), TEA (SUZUKI; SUGIHARA; OUCHI; NAKAMURA *et al.*, 2013) e depressão (STEINER; BIELAU; BRISCH; DANOS *et al.*, 2008). Em roedores, a administração de LPS no DG 10 (LING; ZHU; TONG; SNYDER *et al.*, 2006) ou final da gestação (GIRARD; TREMBLAY; LEPAGE; SÉBIRE, 2010) causa aumento da proliferação e ativação alterada da micróglia no encéfalo da prole após o nascimento. Semelhantemente, a administração de poly I:C no DG 9 (JUCKEL; MANITZ; BRÜNE; FRIEBE *et al.*, 2011) ou 15 (VAN DEN EYNDE; MISSAULT; FRANSEN; RAEYMAEKERS *et al.*, 2014) promove aumento da ativação da micróglia no encéfalo da prole após o nascimento.

Embora muitos estudos apontem “ativação aberrante” da micróglia em diversas doenças, como citado acima, é difícil identificar o perfil funcional destas células. Por exemplo, a micróglia pode desenvolver uma dinâmica funcional diferente em resposta à presença de célula necrótica, infecção viral ou dano por compressão (NAYAK; ROTH; MCGAVERN, 2014). Como demonstrado por Le Belle e colaboradores (LE BELLE; SPERRY; NGO; GHOSHANI *et al.*, 2014), em camundongos, a indução da MIA com LPS no DG 9 promove aumento ativação da micróglia da prole ainda no período fetal e posteriormente após o nascimento. Andoh e colaboradores (ANDOH; SHIBATA; OKAMOTO; ONODERA *et al.*, 2019), evidenciaram em camundongos que a MIA causa alterações comportamentais (redução da interação social e aumento do

comportamento repetitivo e da ansiedade experimental) e, no entanto, significativa redução da atividade fagocítica da micróglia, juntamente com redução da poda sináptica no hipocampo. Os autores demonstraram ainda que o exercício físico foi capaz de melhorar as alterações comportamentais e que um dos mecanismos responsáveis foi o aumento da atividade fagocítica de componentes sinápticos pela micróglia e, conseqüentemente, aumento da poda sináptica.

Esses estudos sublinham a capacidade da MIA em promover alterações na micróglia e também a atividade dinâmica dessas células, como discutido por Nayak e colaboradores (NAYAK; ROTH; MCGAVERN, 2014). Na esquizofrenia os sintomas negativos e cognitivos são comumente associados com ativação aberrante da micróglia (FILLMAN; CLOONAN; CATTS; MILLER *et al.*, 2013; INTA; LANG; BORGWARDT; MEYER-LINDENBERG *et al.*, 2017). Em camundongos, Mattei e colaboradores (MATTEI; IVANOV; FERRAI; JORDAN *et al.*, 2017) demonstraram que a administração de minociclina, um inibidor da ativação microglial, foi capaz de reverter o perfil transcricional e funcional da micróglia, bem como as alterações comportamentais (comportamento relacionado aos sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia) na prole induzidas pela MIA, sugerindo que a minociclina poderia ser utilizada para tratar os sintomas negativos e cognitivos em pacientes. Entretanto, dados oriundos de um estudo clínico (DEAKIN; SUCKLING; BARNES; BYRNE *et al.*, 2018) demonstraram a falta de eficácia da minociclina em melhorar os sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia. Assim, embora seja conhecida a ativação aberrante da micróglia em diversas doenças, a real contribuição desse estado de ativação (geralmente atribui-se um efeito maléfico) carece de mais esclarecimentos.

A IL-6 pode ter função importante nos mecanismos moleculares relacionados à MIA e suas repercussões. Em humanos, o aumento nos níveis de IL-6 circulante durante a gestação, um indicativo de MIA, apresenta associação com alterações na conectividade encefálica e piora no desempenho da memória de trabalho da prole dois anos após o nascimento (RUDOLPH; GRAHAM; FECZKO; MIRANDA-DOMINGUEZ *et al.*, 2018). Estudos têm observado aumento nos níveis de IL-6 em pacientes com esquizofrenia e TEA (MASI; GLOZIER; DALE; GUASTELLA, 2017; MURPHY; WALKER; WEICKERT, 2021). Wei e colaboradores (WEI; CHADMAN; MCCLOSKEY; SHEIKH *et al.*, 2012) demonstraram em camundongos que um aumento na expressão de IL-6 no encéfalo é capaz de causar alterações eletrofisiológicas e comportamentais relacionadas aos sintomas de esquizofrenia e TEA. Em roedores, a administração de

IL-6 durante a gestação é suficiente para promover alterações comportamentais semelhantes às induzidas pela MIA (SMITH; LI; GARBETT; MIRNICS *et al.*, 2007). A indução de MIA com poly I:C promove aumento da expressão de IL-6 e maior infiltração de macrófagos, granulócitos e células *natural killer* no tecido placentário (HSIAO; PATTERSON, 2011). Ademais, a deleção do receptor de IL-6 especificamente na placenta previne a resposta imune no encéfalo fetal observada após a MIA e as alterações comportamentais na prole de camundongos (WU; HSIAO; YAN; MAZMANIAN *et al.*, 2017). Em concordância, a eliminação da expressão IL-6 seja por meios genéticos ou pela inativação utilizando anticorpos é capaz de suprimir as alterações comportamentais e epigenéticas observadas na prole após a MIA (SMITH; LI; GARBETT; MIRNICS *et al.*, 2007). Esses estudos sobre IL-6 pontuam, mecanisticamente, como esta interleucina, através de suas ações na interface materno-fetal e no próprio encéfalo da prole pode estar envolvida na fisiopatologia de doenças do neurodesenvolvimento onde a MIA é um fator de risco.

Para verificar os efeitos de uma MIA que mimetiza uma infecção natural – com uma resposta imune adaptativa – XU e colaboradores (XU; ZHANG; CHANG; KONG *et al.*, 2021) utilizaram antígenos solúveis de taquizoítos, um dos estágios de desenvolvimento do *T. gondii* para desencadear uma resposta imune em camundongos no DG 14. A administração dos antígenos de taquizoítos foi capaz de desencadear um perfil pró-inflamatório e alterações comportamentais na prole que podem ser relacionadas com sintomas da esquizofrenia ou TEA. A partir do perfil pró-inflamatório observado os autores propuseram como uma forma de tratamento a transferência de linfócitos T reguladores das fêmeas que receberam a administração do antígeno de taquizoíto para a prole oriunda dessas fêmeas. Eles demonstraram que os linfócitos T reguladores não apenas reverteram o perfil pró-inflamatório, como também as alterações comportamentais causadas pela MIA induzida pelo antígeno de taquizoítos. Estes achados elucidam como a MIA pode provocar distúrbios sobre o neurodesenvolvimento através de componentes do sistema imune e como as células e moléculas deste podem servir de alvo terapêutico.

A IL-17 é uma citocina com papel emergente em doenças neuropsiquiátricas, principalmente no TEA (WONG; HOEFFER, 2018). Em camundongos, a administração de um anticorpo neutralizante de IL-17a antes da administração de poly I:C em fêmeas gestantes foi capaz de prevenir as alterações comportamentais observadas na prole causadas pela MIA (CHOI; YIM; WONG; KIM *et al.*, 2016). Em

outro estudo, Reed e colaboradores (REED; YIM; WIMMER; KIM *et al.*, 2020) demonstraram que a ativação imune é capaz de reverter os déficits de interação apresentados pela prole de fêmeas que sofreram MIA (LPS administrado na prole, horas antes da realização dos testes de interação social). Ao investigar quais componentes da ativação imune da prole poderiam estar relacionados à melhora do comportamento, os pesquisadores observaram que quando a prole recebeu anticorpos neutralizantes de IL-17a antes da administração de LPS não houve melhora na interação social. Ou seja, a melhora na interação social requer a ação de IL-17a. Assim, a IL-17a pode tanto causar alterações no neurodesenvolvimento durante o período fetal quanto reverter o déficit de interação social na prole, ambas as ações no contexto da MIA.

As interações neuroimunes em doenças neuropsiquiátricas, principalmente quando a MIA é um fator de risco, apontam evidências consideráveis para a participação de células e moléculas do sistema imune na fisiopatologia destas doenças. Grande ênfase é dada para as citocinas, logo, não surpreendentemente, estas proteínas são apontadas como alvo terapêutico. Entretanto, os efeitos adversos observados em estudos utilizando a administração ou neutralização de citocinas (BOSCH; SAIZ; RAMOS-CASALS, 2011) demonstram a dificuldade de implementar estas estratégias como tratamento para doenças neuropsiquiátricas. Nesse contexto, o reposicionamento de drogas com ação sobre os sistemas imune e nervoso pode ser uma possibilidade interessante, já que estas drogas têm seus efeitos colaterais mais bem elucidados. Entre as drogas com potencial terapêutico está a cetamina, estudada há anos por sua ação principalmente no sistema nervoso, mas também no sistema imune.

2.4 Cetamina como moduladora do comportamento e processos neuroimunes

A cetamina é um anestésico dissociativo antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). A cetamina é uma mistura racêmica, (D/E)-cetamina, com quantidades iguais de seus enantiômeros, a (E)-cetamina (escetamina) e a (D)-cetamina (dextrocetamina). O NMDA, junto com o receptor do ácido α -amino-3-hidróxi-5-metilsoxazol-4-propiónico (AMPA) e o receptor cainato são especializados na transmissão sináptica rápida mediada pelo glutamato. Na ausência de despolarização da membrana plasmática um íon magnésio (Mg^{2+}) impede o influxo de Ca^{2+} por se ligar no interior do poro do receptor NMDA. Diante da despolarização, o íon Mg^{2+} é expelido e na presença de glutamato e glicina na fenda sináptica o receptor

NMDA tende ao estado aberto, o que permite o influxo de Ca^{2+} , sendo esse receptor dez vezes mais permeável ao Ca^{2+} que a outros íons. O influxo de Ca^{2+} funciona como um segundo mensageiro modulando a eficácia da transmissão sináptica e outros processos celulares. A (D/E)-cetamina, por sua vez, liga-se no interior do poro em um local diferente do Mg^{2+} , mantendo o receptor NMDA numa conformação fechada, bloqueando, portanto, o influxo de Ca^{2+} (RIGGS; GOULD, 2021).

Como visto, a ação antagonista sobre o receptor NMDA exercida pela (D/E)-cetamina já está bem elucidada, sendo esse o mecanismo mais aceito para seu efeito anestésico. Entretanto, estudos têm demonstrado que outros receptores podem ser modulados pela (D/E)-cetamina e que estas outras propriedades farmacológicas, além da ação como anestésico, podem ser utilizadas para tratar a depressão. A (D/E)-cetamina apresenta ação antidepressiva rápida e por isso tem se mostrado importante nos casos de resistência ao tratamento convencional acompanhados de ideação suicida, onde o tempo de resposta ao tratamento é um fator crucial (WILKINSON; BALLARD; BLOCH; MATHEW *et al.*, 2018). Graças a esta ação rápida, o *spray* nasal de escetamina foi recentemente aprovado para tratar casos de depressão resistente pela *Food and Drug Administration*, nos Estados Unidos da América, em 2019, (PROTTI; MANDRIOLI; MARASCA; CAVALLI *et al.*, 2020) e em 2020, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no Brasil (ANVISA, 2020). Apesar dos benefícios da (D/E)-cetamina como antidepressivo, seus efeitos colaterais indesejados (risco de uso abusivo e efeitos dissociativos e psicotomiméticos) podem limitar sua utilização a ambientes altamente controlados como hospitais e clínicas especializadas (YANG; YANG; LUO; HASHIMOTO, 2019). Devido a tais limitações, tem sido crescente o esforço da comunidade científica para entender os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na ação antidepressiva rápida da (D/E)-cetamina e prover meios de diminuir seus efeitos colaterais indesejáveis.

Os efeitos colaterais resultantes do antagonismo do receptor NMDA parecem estar relacionados ao nível de afinidade da molécula antagonista pelo receptor. A afinidade dos antagonistas do receptor NMDA é, em ordem decrescente, MK-801 > fenciclidina > escetamina > dextrocetamina (TEMME; SCHEPMANN; SCHREIBER; FREHLAND *et al.*, 2018), ou seja, entre esses antagonistas a dextrocetamina apresenta menor afinidade pelo receptor NMDA. Estudos com roedores têm demonstrado que a dextrocetamina tem efeitos antidepressivos mais potentes e duradouros que a escetamina (YANG; SHIRAYAMA; ZHANG; REN *et al.*, 2015;

ZANOS; MOADDEL; MORRIS; GEORGIU *et al.*, 2016), e também menores efeitos colaterais (CHANG; ZHANG; PU; QU *et al.*, 2019). Em relação ao tempo de duração, os efeitos antidepressivos de MK-801 foram inferiores a 24 horas após sua administração, diferentemente da dextrocetamina e escetamina (ZANOS; MOADDEL; MORRIS; GEORGIU *et al.*, 2016).

Além de ser testado quanto aos seus efeitos antidepressivos, o antagonismo do receptor NMDA também vem sendo utilizado com o objetivo de simular experimentalmente a sintomatologia da esquizofrenia, face às propriedades psicotomiméticas e dissociativas de drogas com esse perfil de ação. Nesses modelos, além das alterações comportamentais, também foi observado aumento da liberação de dopamina, semelhantemente ao que é observado em pacientes com esquizofrenia (JONES; WATSON; FONE, 2011). Hashimoto e colaboradores (HASHIMOTO; KAKIUCHI; OHBA; NISHIYAMA *et al.*, 2017) demonstraram em primatas não-humanos que a administração de escetamina, mas não dextrocetamina, promove aumento da liberação de dopamina no núcleo estriado. Esses achados trazem evidências para a maior exuberância dos efeitos colaterais produzidos pela escetamina em comparação com a dextrocetamina. Uma vez que os efeitos psicotomiméticos e dissociativos da (D/E)-cetamina são indesejados e parecem não ser relevantes para o tratamento da depressão, utilizar um antagonista com menor afinidade a esse receptor pode ser uma estratégia para manter os efeitos antidepressivos e mitigar os efeitos colaterais indesejáveis.

Além da ação como antagonista do receptor NMDA, a (D/E)-cetamina está envolvida com a modulação de outros receptores e fatores neurotróficos. Tem sido demonstrado que o receptor AMPA tem participação importante nas ações da (D/E)-cetamina, uma vez que o bloqueio desse receptor inibe seus efeitos antidepressivos (ZANOS; MOADDEL; MORRIS; GEORGIU *et al.*, 2016). Assim, pode ser considerado que o acúmulo de glutamato na fenda sináptica após o bloqueio do receptor NMDA e a consequente ativação do receptor AMPA seja um dos mecanismos dos efeitos antidepressivos da (D/E)-cetamina. Ago e colaboradores (AGO; TANABE; HIGUCHI; TSUKADA *et al.*, 2019) demonstraram recentemente em camundongos, que a administração de dextrocetamina ou escetamina aumentou a liberação de serotonina no córtex pré-frontal, sendo que o efeito da primeira foi maior que o da segunda. Como alguns dos fármacos utilizados para o tratamento da depressão em pacientes são inibidores seletivos da recaptção de serotonina, aumentando sua

disponibilidade na fenda sináptica, esse pode ser um dos mecanismos responsáveis pelo efeito antidepressivo da cetamina. Outro mecanismo parece envolver o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*), uma neurotrofina amplamente conhecida por estar envolvida na fisiopatologia da depressão e também no tratamento efetivo da doença. Sabe-se que a (D/E)-cetamina aumenta a expressão de BDNF no encéfalo e que seu efeito antidepressivo rápido desaparece em animais que não expressam BDNF (AUTRY; ADACHI; NOSYREVA; NA *et al.*, 2011) ou que tiveram seu receptor inibido (YANG; HU; ZHOU; ZHANG *et al.*, 2013), enfatizando a necessidade da sinalização do BDNF para o reparo sináptico.

Somando aos mecanismos descritos acima para sua ação antidepressiva, a dextrocetamina apresenta ação imunomoduladora considerável. Zhang e colaboradores (ZHANG; SAKAMOTO; CHANG; QU *et al.*, 2021), utilizando um protocolo de estresse crônico em camundongos, separaram dois grupos de acordo com a apresentação de comportamento relacionado à depressão ou resiliência ao estresse. Devido a possíveis interações no eixo encéfalo-baço na depressão, os pesquisadores verificaram o peso e a composição celular do baço desses animais. Os animais com comportamento semelhante à depressão apresentaram maior peso do baço e maior número de granulócitos e células *natural killer* CD159⁺ D nesse órgão em relação aos grupos controle e resiliente ao estresse. O tratamento com dextrocetamina reverteu tanto as alterações comportamentais quanto as alterações de peso e composição de células *natural killer* CD159⁺ D no baço. As células *natural killer* CD159⁺ são potentes ativadoras do sistema imune. Estas células funcionam principalmente como sensores de DAMPs para engajar e estimular outros tipos de células *natural killer* e linfócitos T, contribuindo para regular a resposta inflamatória. Esse estudo demonstra possíveis ações da dextrocetamina modulando direta ou indiretamente componentes do sistema imune que parecem estar envolvidos com o comportamento relacionado à depressão induzido por estresse crônico.

Wang e colaboradores (WANG; YU; SHEN; GAO *et al.*, 2015) demonstraram que, utilizando um modelo animal de depressão induzido por estresse crônico em ratos, a administração de (D/E)-cetamina além de reverter as alterações comportamentais promoveu redução na expressão gênica das interleucinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no hipocampo desses animais 1 hora após a administração. Dada a importância das interleucinas em diversos processos normais e patológicos, os efeitos da (D/E)-cetamina associados à normalização destes sinalizadores pode ser um dos

seus mecanismos de ação para reverter alterações comportamentais. Tan e colaboradores (TAN; FUJITA; PU; CHANG *et al.*, 2022) demonstraram que a indução de MIA com administração de poly I:C do DG 12 ao 17 induz redução da densidade sináptica e alterações cognitivas, o que os autores relacionaram a um modelo experimental de esquizofrenia. Nesse estudo a administração de dextroacetamina reverteu as alterações estruturais e comportamentais causadas pela MIA. Ou seja, um evento que ocorreu ainda no período fetal, caracterizado por uma resposta imunológica severa, implicou em alterações neurobiológicas na vida pós-natal da prole que foram revertidas pela dextroacetamina. Entretanto, os autores não analisaram nenhum componente relacionado ao sistema imune nesses animais.

Levando em consideração os diversos estudos que demonstram que a MIA promove diversas alterações estruturais, moleculares e comportamentais na prole e o emergente potencial da dextroacetamina como tratamento para esses distúrbios, neste estudo, nós utilizamos a indução da MIA para: primeiro, verificar se a MIA causa, na prole, distúrbios comportamentais e alterações na expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e TGF- β 1 no cerebelo, hipocampo e córtex pré-frontal; e segundo, verificar se após dez dias da administração de dextroacetamina o tratamento é capaz de prevenir as alterações comportamentais e de expressão gênica causadas pela MIA. A análise comportamental e de expressão gênica dez dias após o fim do tratamento visa verificar se os efeitos da dextroacetamina sobre o comportamento e a expressão gênica são duradouros. Ainda, como a dextroacetamina pode causar efeitos colaterais indesejados, nós analisamos os efeitos da droga dez dias após sua administração sobre o comportamento e expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e TGF- β 1 em animais que não sofreram um insulto prévio – a MIA – verificando assim, se existem alterações comportamentais duradouras e se componentes do sistema imune poderiam estar relacionados aos efeitos colaterais.

3 HIPÓTESE

A administração do antagonista do receptor NMDA, a dextrocetamina, previne as alterações comportamentais e na expressão gênica de citocinas na prole exposta à ativação imune materna.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da administração de dextrocetamina nas alterações comportamentais e expressão de citocinas em camundongos machos expostos à ativação imune materna.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar nas fêmeas progenitoras controle e submetidas à ativação imune com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano:

- Ganho de massa corpórea entre os DG 15 e 16;
- Duração da gestação;
- Número de filhotes nascidos por ninhada.

Estudar na prole controle, controle com administração de dextrocetamina, submetida à ativação imune materna e à ativação imune materna com administração de dextrocetamina:

- Memória espacial de trabalho;
- Ansiedade experimental;
- Interação social;
- Expressão gênica das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e TGF- β 1 no cerebelo, hipocampo e córtex pré-frontal.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Os experimentos com animais foram conduzidos no Laboratório de Neuroendocrinologia e Metabolismo (LNEM) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, registrado sob o processo nº004/2021, Ofício nº 78/21) do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco e estão em acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Este estudo utilizou camundongos (*Mus Musculus*) machos e fêmeas (casais) da linhagem *Swiss*, provenientes do Biotério de Criação de Camundongos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco, com cerca de 30 dias de vida. Esses animais foram mantidos em gaiolas com pares do mesmo sexo e utilizados posteriormente para formação de casais e reprodução.

Os animais foram acondicionados em gaiolas de policarbonato em rack ventilado (mini-isolador, Alesco, Brasil) e mantidos em condições padrão de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), iluminação com ciclo claro-escuro de 12 horas (luz entre 05:20 e 17:20) e acesso livre à água e ração sólida. Injeções para administração dos componentes descritos abaixo foram realizadas entre 08:00 e 10:00 horas da manhã. Estas condições foram mantidas para todos os animais ao longo de todo o experimento.

5.2 Reprodução e ativação imune materna

Quando os animais completaram 60 dias de vida os casais foram formados (1 macho e 1 fêmea por gaiola) e foi realizada verificação diária, entre 07:00 e 10:00 horas da manhã, para observação de tampão (*plug*) vaginal. O dia seguinte à observação do tampão vaginal foi considerado o dia gestacional 1 (DG1). Nos dias subsequentes foi realizada verificação do ganho de peso e protusão abdominal para confirmação da gestação (ENAYATI; SOLATI; HOSSEINI; SHAHI *et al.*, 2012; LECCA; LUCHICCHI; SCHERMA; FADDA *et al.*, 2019).

Para ativação do sistema imune materno, fêmeas gestantes, nos DG15 e 16, receberam administração de lipopolissacarídeo (LPS, obtido da bactéria *Escherichia Coli* O26:B6, Sigma-Aldrich), com dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$, por via intraperitoneal (i.p.) (CUI; ASHDOWN; LUHESHI; BOKSA, 2009; LOTTER; MÖLLER; DEAN; BERK *et al.*, 2020), ou administração de solução salina com volume equivalente para compor os

grupos controle. O LPS foi administrado nos DG 15 e 16 com base nos diversos processos do neurodesenvolvimento que podem ser afetados pela MIA (**Figura 1.**).

Levando em consideração o ganho de massa corpórea de ± 4 g durante os 10 últimos dias de gestação, a evolução ponderal entre os dias 15 e 16 de gestação foi utilizada para verificar a resposta à administração de LPS (LECCA; LUCHICCHI; SCHERMA; FADDA *et al.*, 2019). Após o nascimento, foi realizada a sexagem através da verificação da distância ano-genital. A ninhada foi ajustada para oito filhotes, sendo 4 fêmeas e 4 machos preferencialmente (nas ninhadas onde não foi possível ajustar de forma equivalente, houve ao menos 3 animais do sexo oposto ao dominante). Filhotes supranumerários foram sacrificados por decapitação. No 21º dia pós-natal (DPN 21), os filhotes foram desmamados e mantidos em grupos de 3 a 5 animais com pares do mesmo sexo até o final do experimento. Para os procedimentos experimentais só foram considerados os filhotes machos. Para alocação nos grupos experimentais foram utilizados apenas dois animais de cada ninhada para um determinado grupo, os outros animais foram alocados em um grupo distinto. Posteriormente, os filhotes receberam administração de dextrocetamina (Ketamin, cloridrato de dextrocetamina, Cristália, Brasil) com dose de 20 mg/kg, i.p., do DPN 36 ao 50 (PARISE; ALCANTARA; WARREN; WRIGHT *et al.*, 2013), ou solução salina com volume equivalente. No período entre o DPN 50 e o 60 os animais foram manipulados apenas para manutenção das gaiolas.

5.3 Grupos experimentais

No DPN 36 os animais foram aleatoriamente alocados, de acordo com o tratamento pré e pós-natal (**Figura 2.**), nos seguintes grupos:

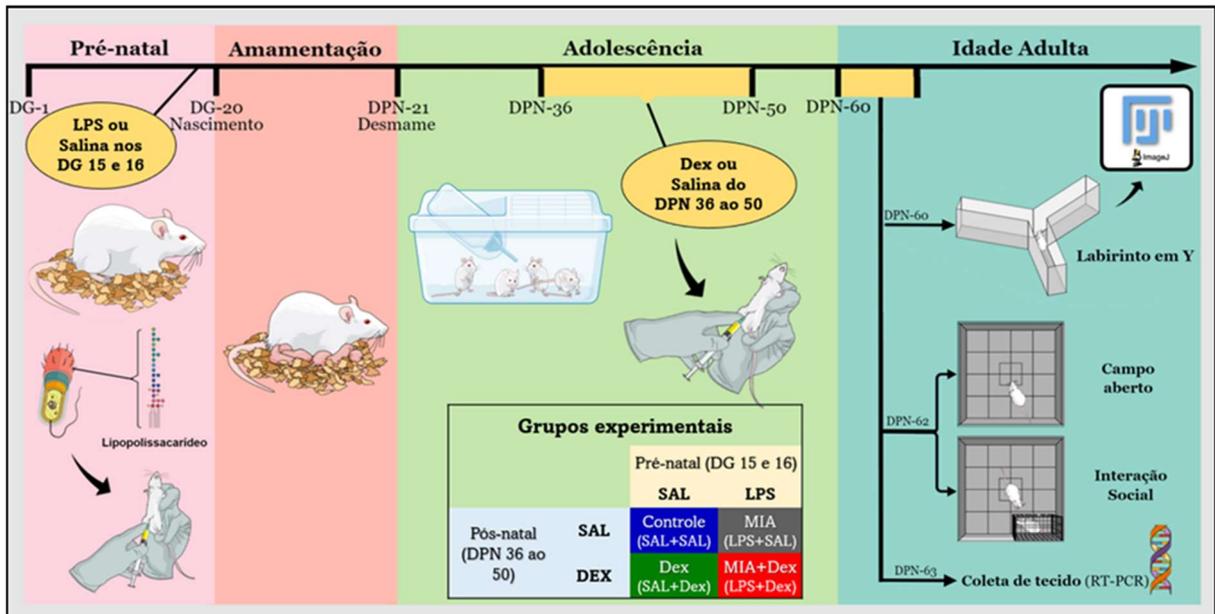
I) Grupo controle: Composto pela prole de fêmeas que receberam administração de solução salina 0,9 % (1ml/kg, i.p.) nos DG 15 e 16. Após o nascimento, do DPN 36 ao 50, a prole recebeu administração de solução salina 0,9% (1ml/kg, i.p.).

II) Grupo dextrocetamina (DEX): Composto pela prole de fêmeas que receberam administração de solução salina 0,9 % (1ml/kg, i.p.) nos DG 15 e 16. Após o nascimento, do DPN 36 ao 50, a prole recebeu administração de dextrocetamina (20 mg/kg, i.p.).

III) Grupo ativação imune materna (MIA): Composto pela prole de fêmeas que receberam administração de LPS (100 μ g/kg, i.p.) nos DG 15 e 16. Após o nascimento, do DPN 36 ao 50, a prole recebeu administração de solução salina 0,9% (1ml/kg, i.p.).

IV) Grupo ativação imune materna + dextrocetamina (MIA+DEX): Composto pela prole de fêmeas que receberam administração de LPS (100 µg/kg, i.p.) nos DG 15 e 16. Após o nascimento, do DPN 36 ao 50, a prole recebeu administração de dextrocetamina (20 mg/kg, i.p.).

Figura 2. Desenho experimental em formato de linha do tempo. Em detalhe no centro os grupos experimentais de acordo com os componentes administrados no período pré e pós-natal. DG, dia gestacional; DPN, dia pós-natal.



Fonte: Oliveira (2022).

5.4 Testes comportamentais

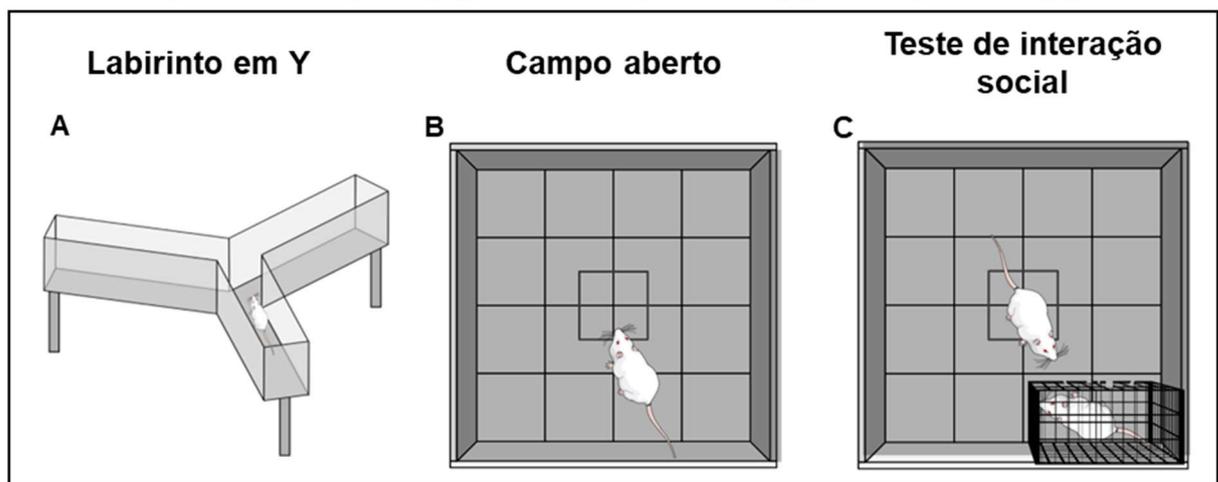
5.4.1 Obtenção de imagens e análise de comportamento

Os testes comportamentais foram realizados em uma sala específica para análise de comportamento no LNEM, onde temperatura (22 ± 2 °C) e luminosidade foram controladas. Os testes foram realizados nos DPN 60 e 62, no período escuro, entre 18:00 e 22:00 horas. Todos os animais foram testados na seguinte ordem: teste de alternância espontânea (DPN 60), teste de campo aberto e interação social (DPN 62). Todos os experimentos de comportamento foram gravados utilizando um sistema de câmeras (câmera HDCVI, Intelbras, Brasil) e gravador digital de vídeo (gravador digital de vídeo, Intelbras, Brasil). Os vídeos foram salvos e posteriormente utilizados para análise de comportamento.

A análise de comportamento nos testes de campo aberto e interação social foi realizada através do software Fiji ImageJ (SCHINDELIN; ARGANDA-CARRERAS; FRISE; KAYNIG *et al.*, 2012), utilizando o *plugin* MouBeaAT, como descrito por Bello-Arroyo e colaboradores (BELLO-ARROYO; ROQUE; MARCOS; ORIHUEL *et al.*,

2018). Os vídeos de cada animal foram salvos em arquivo AVI (*audio video interleave*) e foi realizado um corte para obtenção de um vídeo apenas com a área do aparato de campo aberto, que foi convertido em arquivo TIFF (*Tagged Image File Format*). Esse arquivo foi utilizado pelo Fiji ImageJ para análise do comportamento. Ao final de cada análise um arquivo de planilha do Microsoft Excel (Microsoft, USA) foi gerado com os dados numéricos. As unidades de medida fornecidas foram: centímetro (cm) para distância, segundo (s) para tempo e cm/s para velocidade. O comportamento dos animais no teste de alternância espontânea foi analisado manualmente, como descrito abaixo.

Figura 3. Ilustração demonstrando os aparatos utilizados para as análises comportamentais de memória espacial de curto prazo (A), ansiedade experimental (B) e interação social (C).



Fonte: Oliveira (2022).

5.4.2 Teste de alternância espontânea

O teste de alternância espontânea **Figura 3A** é baseado na tendência natural de roedores explorarem um ambiente novo utilizando a memória espacial de trabalho. Quando colocados em um labirinto em Y os animais exploram o ambiente de forma que eles naturalmente visitam um novo braço ao invés do braço visitado anteriormente, assim, há uma tendência a alternar as visitas entre os três braços. Para que a exploração do ambiente seja eficiente os animais devem manter informações das regiões mais recentemente visitadas e atualizá-la constantemente. Se o animal apresenta déficit na memória de trabalho ele tem dificuldade para lembrar qual braço foi visitado, logo, ele pode apresentar um número de alternâncias espontâneas reduzido (WIETRZYCH; MEZIANE; SUTTER; GHYSELINCK *et al.*, 2005). Ademais, é sugerido que esse teste dá ênfase principal à atenção, que é um dos aspectos importantes da memória de trabalho (WALL; MESSIER, 2002).

O teste de alternância espontânea foi realizado em um aparato feito de madeira, com três braços idênticos (30 cm de altura, 50 cm de comprimento e 14 cm de largura) colocados em distância de 120° entre eles, que convergem em um triângulo equilátero central. Os braços foram numerados de 1 a 3 e a gravação obtida de cada animal foi utilizada para análise posterior. Cada animal foi colocado no braço 1 e explorou livremente o ambiente por 8 minutos. A entrada ou saída do animal de um determinado braço foi considerada quando as quatro patas ultrapassaram o limite do braço. Uma alternância completa foi definida como entrada sucessiva em cada um dos três braços. As entradas totais e o número de alternâncias foram computados manualmente e a porcentagem de alternâncias foi calculada a partir da seguinte fórmula: % alternâncias = (número de alternâncias / número total de entradas) x 100 (WALL; MESSIER, 2002; WIETRZYCH; MEZIANE; SUTTER; GHYSELINCK *et al.*, 2005).

5.4.3 Teste de campo aberto

O teste é baseado no comportamento exploratório natural e aversão de roedores à uma situação de exposição. Tais agentes ansiogênicos, ou aversivos, podem ser, por exemplo, uma área desprotegida ou uma arena aberta. No campo aberto (**Figura 3B**), a “periferia” é a região mais próxima das paredes, protegida e segura, e a área central é a área ansiogênica por não ser protegida. O nível de ansiedade é expresso pelo número de entradas e o tempo despendido na área ansiogênica, assim, quanto menor o número de entradas, o tempo de permanência e a distância percorrida no centro do campo aberto, maior o nível de ansiedade do animal (CAROLA; D'OLIMPIO; BRUNAMONTI; MANGIA *et al.*, 2002; PENG; ZHANG; DONG; ZHANG *et al.*, 2016)

O teste do campo aberto foi realizado no DPN 62, em um aparato feito de madeira, com 50 x 50 cm e paredes de 40 cm. Os animais foram cuidadosamente colocados no aparato e deixados para explorar por 10 minutos. As gravações de vídeo obtidas de cada animal foram analisadas posteriormente utilizando o software ImageJ Fiji, como descrito no item 5.4.1. A área central do campo aberto foi de 28 x 28 cm, definida automaticamente pelo *plugin* MouBeAt a partir da identificação da área total do aparato. Os seguintes parâmetros fornecidos pela análise com software foram obtidos: distância total percorrida, distância percorrida no centro, distância percorrida na periferia, tempo despendido no centro, número de entradas no centro, tempo total de congelamento e velocidade média desenvolvida pelo animal. Ao final da análise foi obtida também uma imagem representativa do trajeto desenvolvido pelo animal no

campo aberto. Ademais, foi realizada contagem manual da atividade vertical para verificar o comportamento exploratório dos animais. Esse comportamento é expresso quando os animais se apoiam temporariamente sobre os membros posteriores e colocam o corpo ereto para explorar o ambiente (STURMAN; GERMAIN; BOHACEK, 2018).

5.4.4 Teste de interação social

O teste de interação social (**Figura 3C**) é utilizado para analisar a sociabilidade de um animal com um par desconhecido da mesma espécie. Tal teste é fundamentado na sociabilidade natural de roedores, sendo esse um comportamento essencial à sua sobrevivência (CRAWLEY, 2007). O teste de interação social foi realizado em um aparato de campo aberto. Antes do teste de interação social o animal foi colocado no aparato e deixado para explorar a arena livremente por 10 min, como descrito acima, para ambientação ao aparato. Durante o período de teste de interação social o animal testado foi deixado para explorar o ambiente livremente por 8 minutos, junto com uma pequena gaiola (15 x 10 x 16 cm) colocada no canto do aparato com um animal desconhecido dentro. O animal desconhecido era do mesmo sexo e linhagem, com peso e idade semelhante. Um vídeo para cada animal foi salvo e analisado posteriormente. O número de vezes que o animal testado se dirigiu à área onde estava o animal desconhecido e o tempo, em segundos, despendido na área próxima (8 cm a partir da gaiola, definida como região de interação) ao animal desconhecido foram obtidos através do software ImageJ Fiji. Ao final da análise foi obtida uma imagem semelhante a um mapa de calor, representativa das regiões onde o animal despendeu mais tempo ao longo do teste. Alguns animais conseguiram subir na gaiola, assim, o tempo despendido no topo da gaiola foi quantificado manualmente e somado ao tempo despendido na região de interesse.

5.5 Análise de expressão gênica

Para análise de expressão gênica 5 animais de cada grupo foram utilizados. A análise de expressão gênica foi realizada pela técnica de reação em cadeia polimerase em tempo real conforme descrito previamente por Silva e colaboradores (SILVA; BRAZ; DO NASCIMENTO; SANTANA *et al.*, 2019). Doze horas após o término dos testes comportamentais, os animais foram pré-anestesiados (Isoflurano) em câmara de indução e em seguida decapitados utilizando guilhotina própria para roedores. Após a eutanásia, o encéfalo foi rapidamente removido e o córtex pré-

frontal, hipocampo e cerebelo dissecados e congelados em nitrogênio líquido para posterior análise da expressão gênica de IL-1 β , IL-6, TGF- β 1 e TNF- α .

Inicialmente o RNA total foi extraído pelo método de extração com isotiocinato de guanidina e o reagente Trizol (Invitrogen, USA) na razão 1:1,5 de amostra. Após a homogeneização dos tecidos foi realizada uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente e posterior acréscimo de clorofórmio estabilizado para centrifugação a 12000g, a 4°C por 15 minutos. Ao RNA formado, foi adicionado álcool isopropílico e acetato de amônia 2M e a mistura foi então incubada a -20°C por 20 min, seguido de uma nova centrifugação a 12000g, a 4°C por 10 minutos. O pellet (RNA) então foi lavado em etanol a 75% e centrifugado a 7500xg, 4°C por 5 minutos. O sedimento de RNA foi ressuspensão em água livre de RNase e armazenado em -20°C durante os experimentos. Para a quantificação do RNA, foi usado o Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) onde o grau de pureza de todas as amostras deverá ser superior a 1.8 admitindo-se a razão entre os valores de absorbância a 260nm e 280nm.

Para a análise de expressão gênica, foi aplicada a técnica da reação em cadeia polimerase em tempo real através do Rotor-Gene Q (Qiagen, USA). As amostras foram utilizadas na concentração de 700 ng (analisadas em duplicata) e os parâmetros utilizados em cada reação seguiram as normas do fabricante.

5.6 Análise estatística

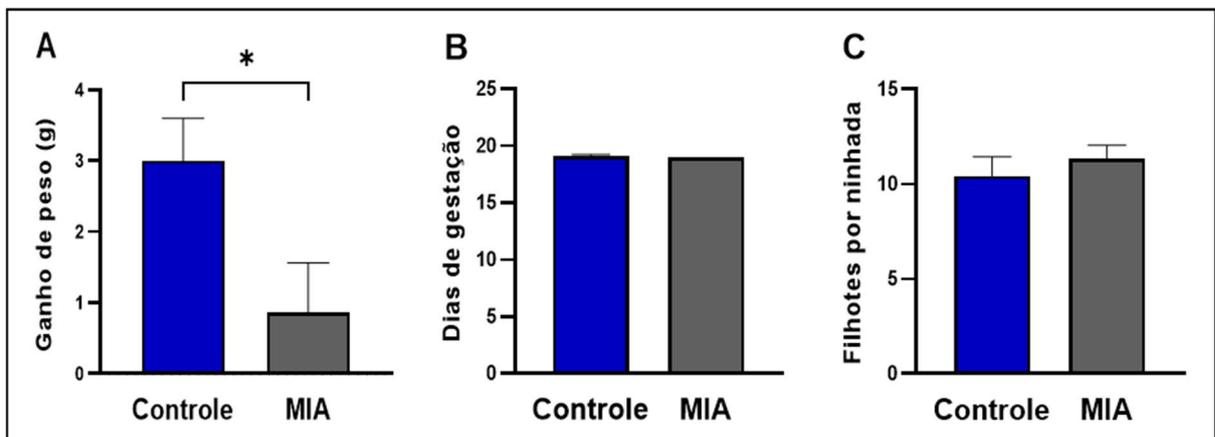
Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados foram testados quanto à normalidade através dos testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Para análise comparativa dos dados foram utilizados os seguintes testes: Teste T de "Student", para as análises entre dois grupos e teste de análise de variância ANOVA *two way* com pós-teste de Tukey para a análise dos resultados compostos por dois fatores (ativação imune materna x administração de dextrocetamina). Em todas as comparações os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os dados foram organizados em tabelas no software Excel (Microsoft, USA, versão 365) e as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., USA, versão 8).

6 RESULTADOS

6.1 Duração da gestação, número de filhotes por ninhada e massa corpórea das progenitoras prenhes

O grupo de fêmeas gestantes expostas à MIA apresentou redução do ganho de massa corpórea 24 horas após a administração da primeira dose de LPS (controle: $3,0 \pm 1,69$ vs MIA: $0,85 \pm 1,86$; $p < 0,05$) em relação ao grupo controle (**Figura 4A**)

Figura 4. Efeito da administração de LPS no DG 15 sobre o ganho de massa corpórea (**A**), duração da gestação (**B**) e número total de filhotes por ninhada (**C**). Fêmeas prenhes foram submetidas à administração de LPS ou solução salina nos DG 15 e 16, formando, respectivamente, os grupos Controle (n=8) ou MIA (n=7). O peso em gramas foi obtido 24 horas após a administração de LPS ou salina no DG 15. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Teste t de student, * $p < 0,05$.



Fonte: Oliveira (2022).

Os resultados apresentados nas **Figuras 4B** e **4C** mostram que a MIA não promoveu alterações na duração da gestação bem como no número total de filhotes por ninhada.

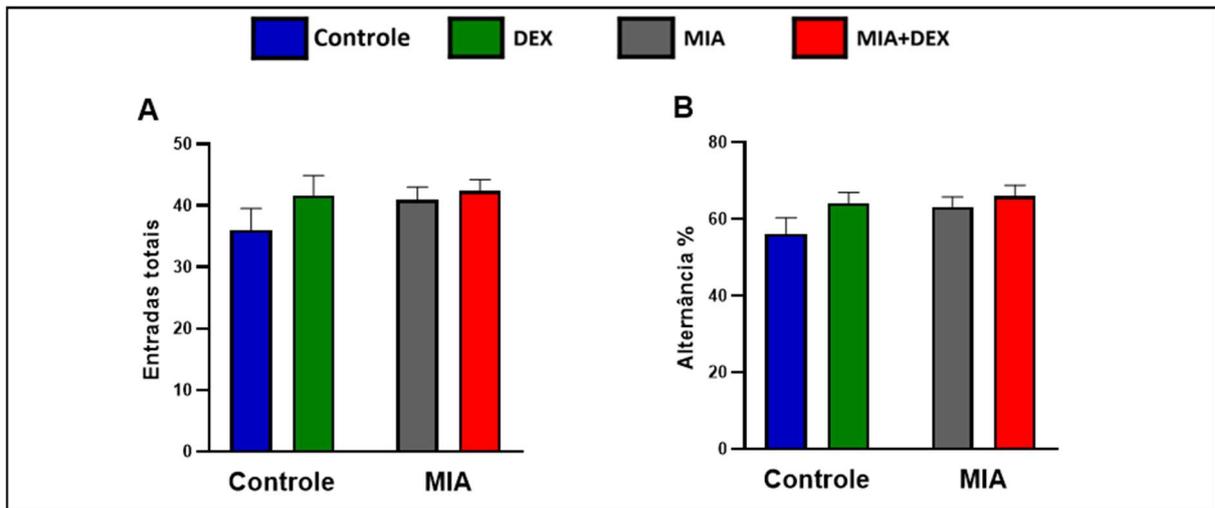
6.2 Testes comportamentais na prole

Os resultados descritos a seguir são oriundos dos testes realizados na prole das fêmeas controle e MIA. A prole foi alocada de acordo com o tratamento pós-natal, nos seguintes grupos: controle, DEX, MIA e MIA+DEX.

6.2.1 Memória espacial de trabalho

Na **Figura 5A** e **5B** observa-se que não houve diferença estatística no número de entradas totais dos animais nos braços do labirinto ou na porcentagem de alternância entre os quatro grupos experimentais.

Figura 5. Efeitos da administração de dextrocetamina na prole Controle ou submetida à MIA sobre a memória espacial de curto prazo no 60º DPN (n = 12 por grupo). Número de entradas totais (A) e porcentagem de alternância (B). Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way* com pós-teste de Tukey foi utilizado nas análises.



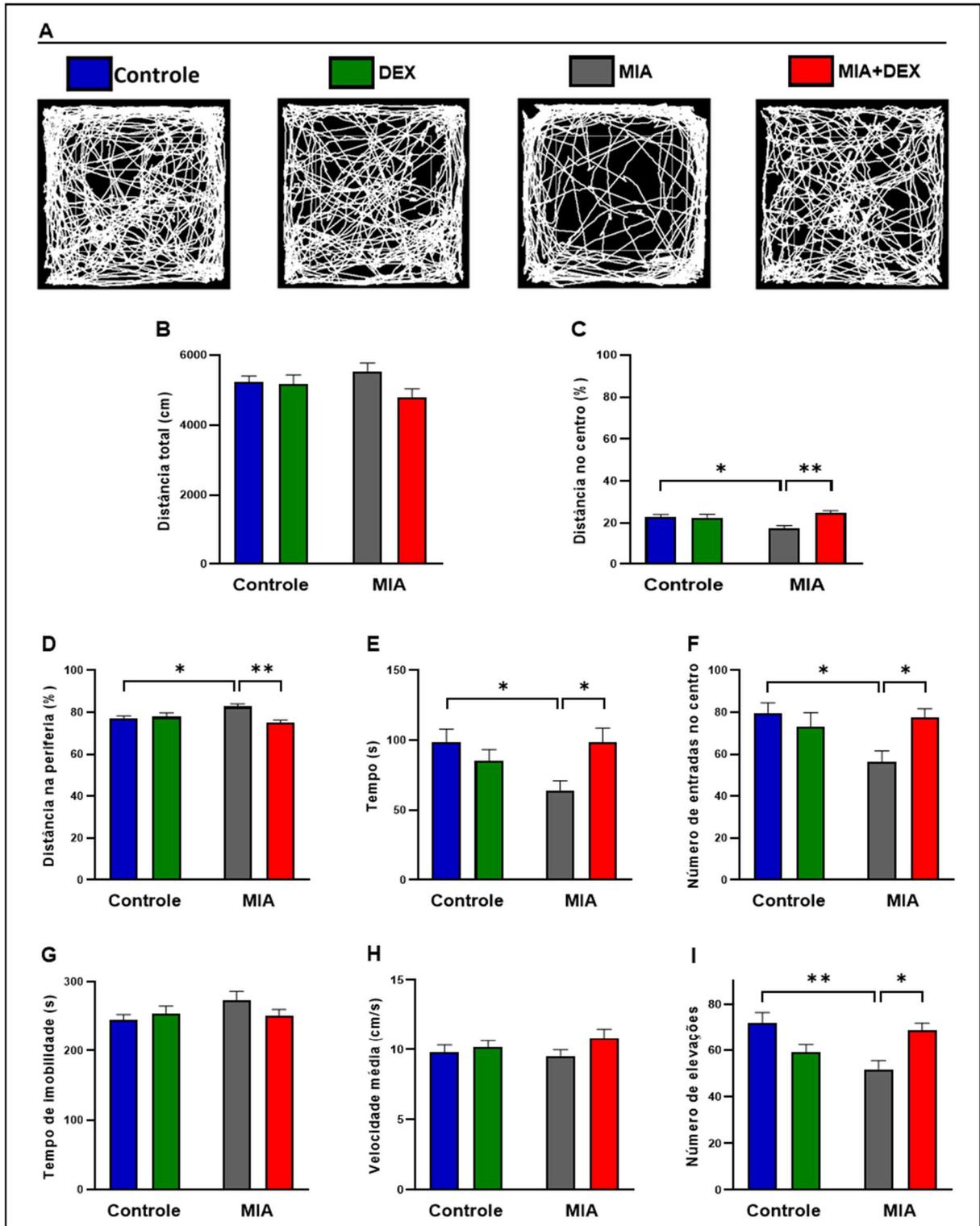
Fonte: Oliveira (2022).

6.2.2 Ansiedade experimental

A **Figura 6B** mostra que não houve diferença estatística na distância total percorrida entre os diferentes grupos experimentais. Pode-se observar pelos dados apresentados na **Figura 6C** que o grupo MIA apresentou redução da distância percorrida no centro do campo aberto comparado com o grupo controle (controle: $22,87 \pm 1,09$ vs MIA: $17,33 \pm 1,37$; $p < 0,05$), com correspondente aumento da distância percorrida na periferia (**Figura 6D**) (controle: $77,12 \pm 1,90$ vs MIA: $82,67 \pm 1,374$; $p < 0,05$). Ainda na **Figura 6C** e **6D**, é possível observar que no grupo MIA+DEX, o tratamento com dextrocetamina promoveu aumento da distância percorrida no centro do campo aberto (MIA+DEX: $24,76 \pm 1,00$ vs MIA: $17,33 \pm 1,37$; $p < 0,005$) e diminuição da distância percorrida na periferia em relação ao grupo MIA (MIA+DEX: $75,24 \pm 1,00$ vs MIA: $82,67 \pm 1,37$; $p < 0,005$).

O grupo MIA apresentou menor tempo despendido no centro do aparato (controle: $98,94 \pm 8,86$ vs MIA: $63,90 \pm 7,17$; $p < 0,05$), bem como, número de entradas no centro do aparato (controle: $79,67 \pm 4,85$ vs MIA: $56,27 \pm 5,24$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (**Figura 6E** e **6F**). O tratamento com dextrocetamina no grupo MIA+DEX promoveu aumento no tempo despendido no centro do aparato (MIA+DEX: $98,62 \pm 10,03$ vs MIA: $63,90 \pm 7,17$; $p < 0,05$) e número de entradas no centro do aparato (MIA+DEX: $77,70 \pm 4,00$ vs MIA: $56,27 \pm 5,245$; $p < 0,05$) em comparação com o grupo MIA (**Figura 6E** e **6F**).

Figura 6. Efeitos da administração de dextrocetamina na prole Controle ou submetida à MIA sobre a ansiedade experimental no 62º DPN (n = 10 a 12 por grupo). Imagens representativas do trajeto desenvolvido pelos animais (A), distância total percorrida (B), distância percorrida no centro (C), distância percorrida na periferia (D), tempo despendido no centro (E), número de entradas no centro (F), tempo de imobilidade (G), velocidade média desenvolvida (H) e comportamento vertical (I). Dados expressos em média \pm erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way* com pós-teste de Tukey foi utilizado nas análises, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$.



Fonte: Oliveira (2022).

No que concerne ao tempo de congelamento e velocidade média desenvolvida, a análise estatística não revelou diferenças entre os grupos experimentais (**Figura 6G e 6H**).

O grupo MIA apresentou redução da atividade vertical em relação ao grupo controle (controle: $72,0 \pm 4,4$ vs MIA: $51,8 \pm 3,7$; $p < 0,005$) e o tratamento com dextrocetamina promoveu aumento da atividade vertical no grupo MIA+DEX em comparação com o grupo MIA (MIA+DEX: $68,7 \pm 4,4$ vs MIA: $51,8 \pm 3,7$; $p < 0,05$), como pode ser observado na **Figura 6I**.

6.2.3 Interação Social

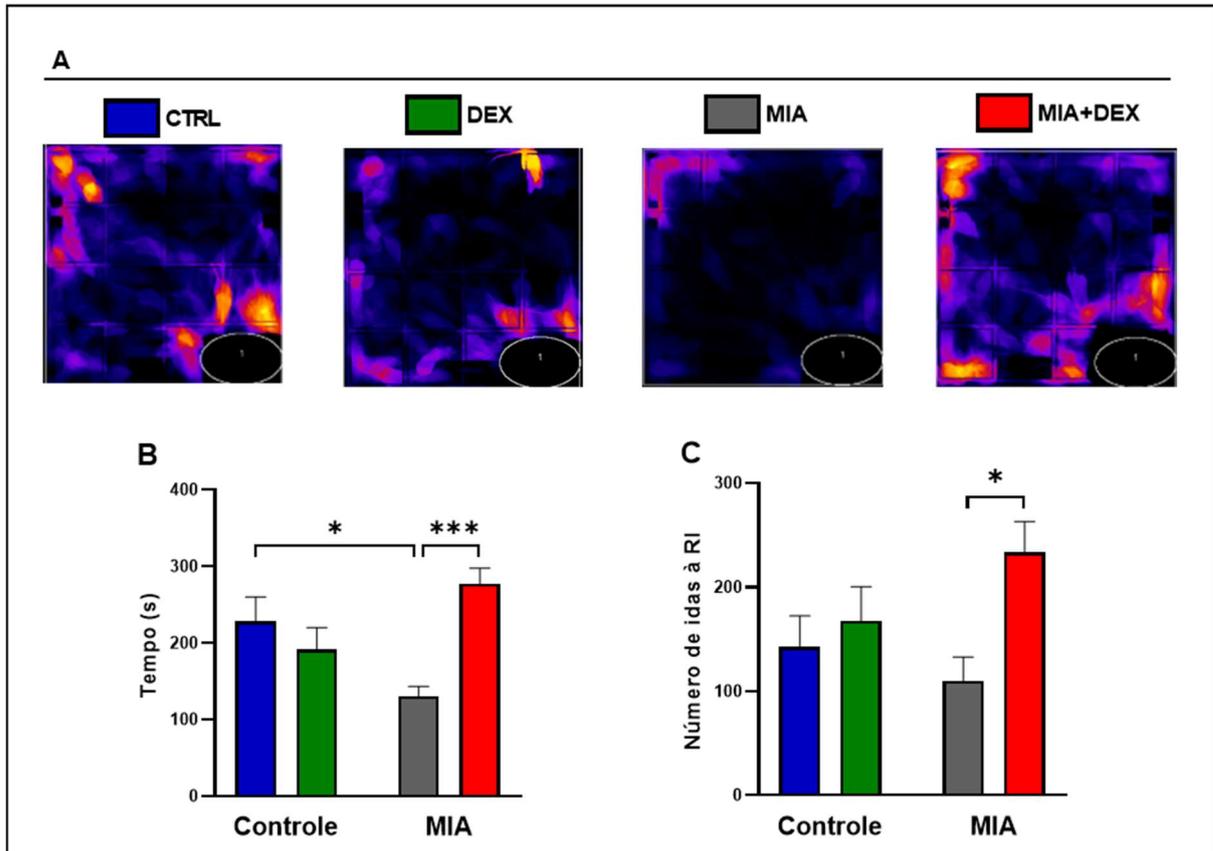
Observa-se na **Figura 7** os resultados obtidos no teste de interação social através do número de idas à região de interesse e tempo de permanência na região interação. O grupo MIA apresentou redução no tempo de interação quando comparado ao grupo controle (controle: $228,6 \pm 31,59$ vs MIA: $130,6 \pm 12,67$; $p < 0,05$) e, por sua vez, o tratamento com dextrocetamina aumentou o tempo de interação no grupo MIA+DEX comparado ao grupo MIA (MIA+DEX: $277,3 \pm 20,0$ vs MIA: $136,1 \pm 12,68$; $p < 0,0005$), como visto na **Figura 7B**. Como pode ser visto na **Figura 7C**, o grupo MIA+DEX apresentou aumento do número de idas à região de interação em comparação com o grupo MIA (MIA+DEX: $233,4 \pm 29,7$ vs MIA: $110,2 \pm 22,6$; $p < 0,05$).

6.3 Análise de expressão gênica

As **Figuras 8, 9 e 10** apresentam os resultados da análise de expressão de RNA mensageiro das citocinas IL-1 β , IL-6, TGF- β 1 e TNF- α no hipocampo, cerebelo e córtex pré-frontal.

No cerebelo (**Figura 8**), a expressão de IL-1 β foi reduzida nos grupos DEX (controle: $1,0 \pm 0,1$ vs DEX: $0,3 \pm 0,09$; $p < 0,005$), MIA (controle: $1,0 \pm 0,1$ vs MIA: $0,5 \pm 0,07$; $p < 0,05$) e MIA+DEX (controle: $1,0 \pm 0,1$ vs MIA+DEX: $0,3 \pm 0,08$; $p < 0,005$) em comparação com o grupo controle. A expressão de IL-6 e TGF- β 1 não foi alterada entre os grupos experimentais. A MIA promoveu aumento da expressão de TNF- α no grupo MIA em comparação com grupo controle (controle: $1,0 \pm 0,2$ vs MIA: $2,5 \pm 0,2$; $p < 0,005$) e a administração de dextrocetamina no grupo MIA+DEX promoveu redução na expressão dessa citocina em comparação com o grupo MIA (MIA+DEX: $1,0 \pm 0,2$ vs MIA: $2,5 \pm 0,2$; $p < 0,005$).

Figura 7. Efeitos da administração de dextrocetamina na prole Controle ou submetida à MIA sobre a interação social aos no 62º DPN (n = 9 a 11 por grupo). Imagens em mapa de calor representativas da região onde os animais despenderam mais tempo (A), tempo despendido na região de interação (RI) (B) e número de idas à região de interesse (C). Dados expressos em média \pm erro padrão da média. Teste ANOVA *two-way* com pós-teste de Tukey foi utilizado nas análises, * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

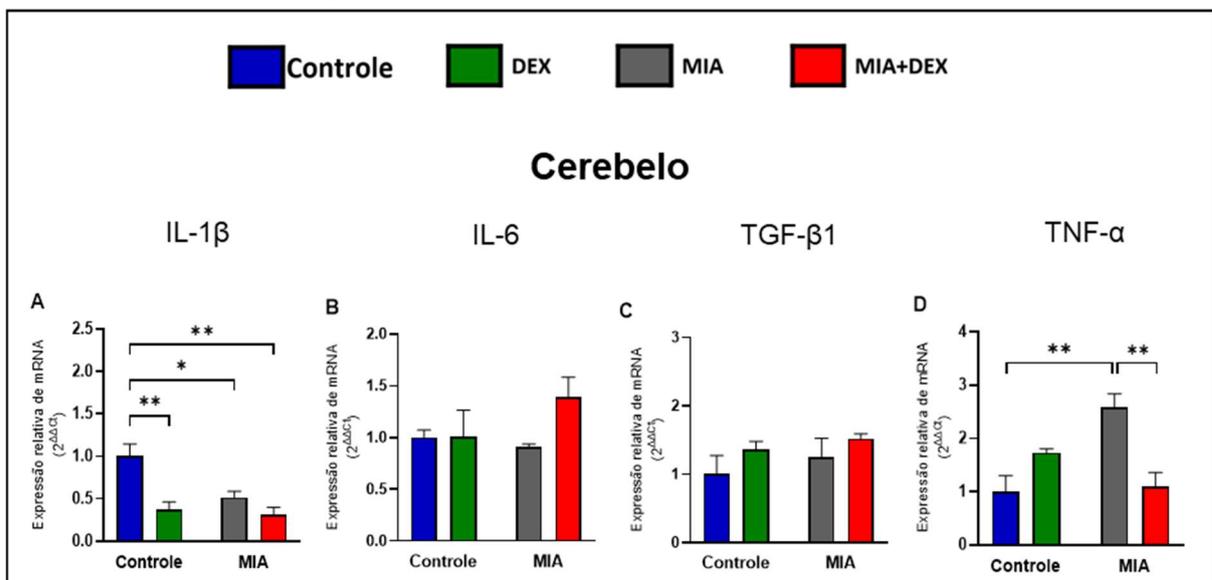


Fonte: Oliveira (2022).

No hipocampo (**Figura 9**), o grupo MIA+DEX apresentou aumento na expressão de IL-1 β em relação aos grupos DEX (MIA+DEX: $1,9 \pm 0,17$ vs DEX: $0,8 \pm 0,1$; $p < 0,005$) e MIA (MIA+DEX: $1,9 \pm 0,17$ vs MIA: $0,8 \pm 0,1$; $p < 0,005$). A citocina IL-6 teve sua expressão reduzida nos grupos MIA (controle: $1,0 \pm 0,06$ vs MIA: $0,4 \pm 0,1$; $p < 0,05$) e MIA+DEX (controle: $1,0 \pm 0,06$ vs MIA+DEX: $0,3 \pm 0,1$; $p < 0,005$) comparado ao grupo controle. TGF- β 1 teve sua expressão aumentada no grupo MIA+DEX comparado aos grupos controle (controle: $1,0 \pm 0,2$ vs MIA+DEX: $2,2 \pm 0,07$; $p < 0,0005$), DEX (MIA+DEX: $2,1 \pm 0,02$ vs DEX: $1,1 \pm 0,1$; $p < 0,005$) e MIA (MIA+DEX: $2,1 \pm 0,02$ vs MIA: $0,8 \pm 0,03$; $p < 0,0005$). O grupo DEX apresentou redução na expressão de TNF- α comparado ao grupo controle (controle: $1,0 \pm 0,1$ vs DEX: $0,3 \pm 0,1$; $p < 0,05$).

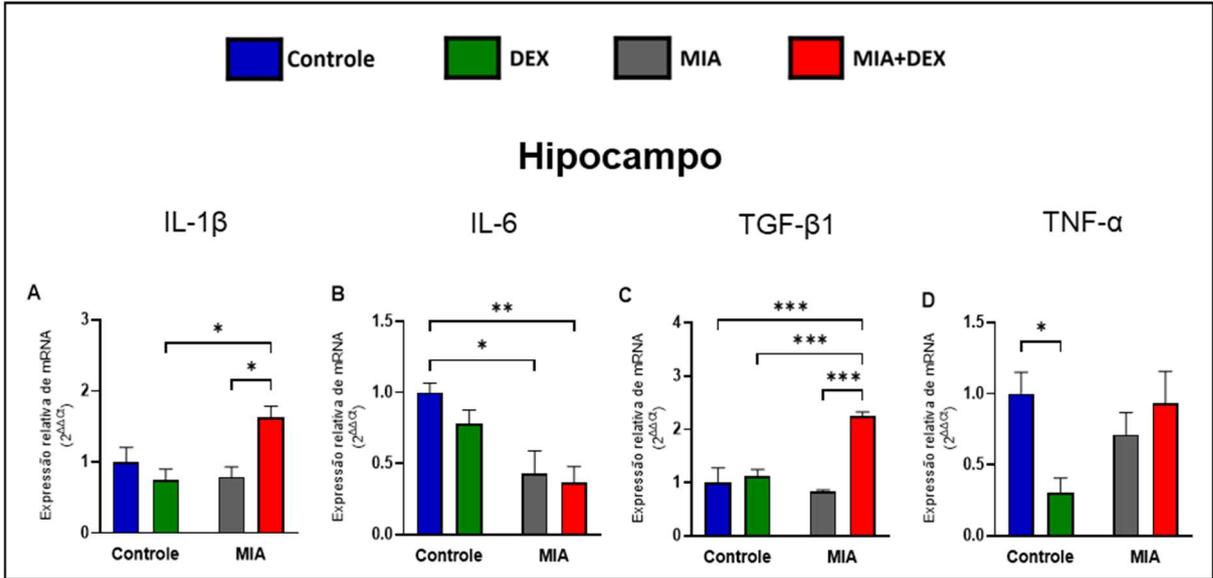
No córtex pré-frontal (**Figura 10**), a MIA promoveu aumento na expressão das citocinas IL-1 β (controle: $1,0 \pm 0,3$ vs MIA: $3,0 \pm 0,2$; $p < 0,005$), IL-6 (controle: $1,0 \pm 0,3$ vs MIA: $6,8 \pm 1,3$; $p < 0,005$) e TGF- β 1 (controle: $1,0 \pm 0,3$ vs MIA: $4,5 \pm 0,9$; $p < 0,005$) quando comparado com o grupo controle. No grupo MIA+DEX a administração de dextrocetamina promoveu redução na expressão IL-1 β (MIA+DEX: $1,3 \pm 0,4$ vs MIA: $3,0 \pm 0,2$; $p < 0,005$), IL-6 (MIA+DEX: $1,3 \pm 1,0$ vs MIA: $6,8 \pm 1,3$; $p < 0,005$) e TGF- β 1 (MIA+DEX: $1,7 \pm 0,5$ vs MIA: $4,5 \pm 0,9$; $p < 0,05$) comparado ao grupo MIA. A expressão da citocina TNF- α foi aumentada no grupo DEX em comparação com os grupos controle (controle: $1,0 \pm 0,2$ vs DEX: $3,7 \pm 0,6$; $p < 0,0005$), MIA (controle: $1,0 \pm 0,2$ vs MIA: $0,8 \pm 0,1$; $p < 0,0005$) e MIA+DEX (controle: $1,0 \pm 0,2$ vs MIA+DEX: $1,0 \pm 3,8$; $p < 0,0005$).

Figura 8. Efeitos da administração de dextrocetamina na prole Controle ou submetida à MIA sobre a expressão gênica de citocinas IL-1 β , IL-6, TGF- β e TNF- α no cerebelo (**A - D**).



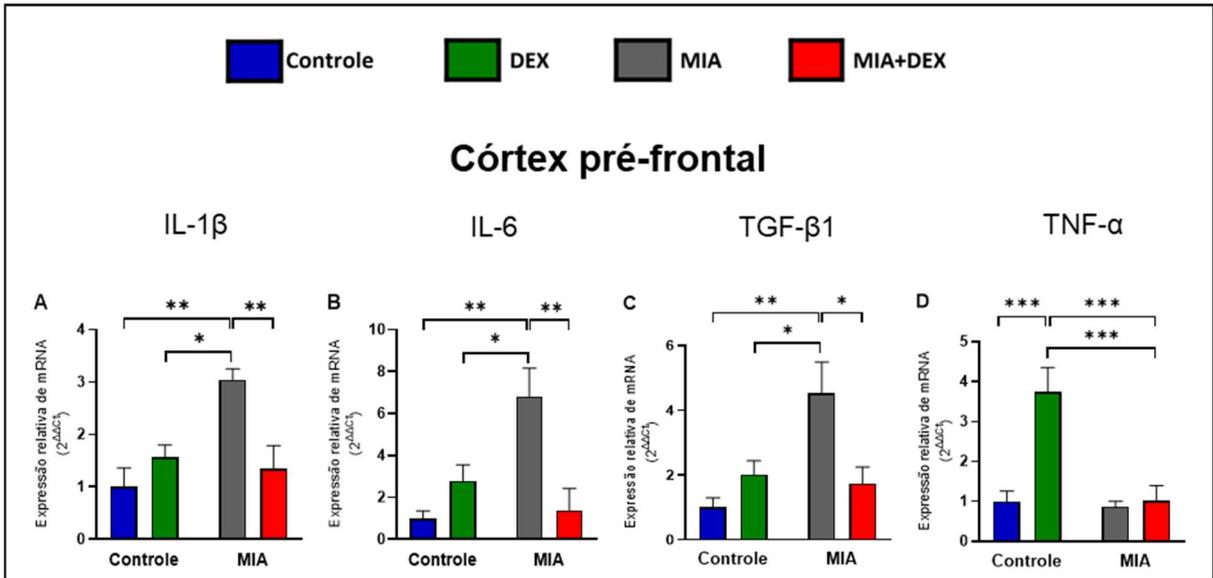
Fonte: Oliveira (2022).

Figura 9. Efeitos da administração de dextrocetamina na prole Controle ou submetida à MIA sobre a expressão gênica de citocinas IL-1 β , IL-6, TGF- β e TNF- α no hipocampo (A – D).



Fonte: Oliveira (2022).

Figura 10. Efeitos da administração de dextrocetamina na prole Controle ou submetida à MIA sobre a expressão gênica de citocinas IL-1 β , IL-6, TGF- β e TNF- α no córtex pré-frontal (A - D).



Fonte: Oliveira (2022).

7 DISCUSSÃO

Neste estudo nós testamos o potencial da dextrocetamina para prevenir as alterações comportamentais e moleculares causadas pela exposição à MIA durante o período fetal. Nossos achados demonstraram que a administração de dextrocetamina preveniu o aumento da ansiedade experimental e a redução da interação social induzidas pela MIA, o que pode ser associado com a regulação da expressão gênica das citocinas nas diferentes regiões do encéfalo estudadas. Embora os mecanismos de ação da dextrocetamina não sejam totalmente compreendidos, nossos resultados sugerem que a regulação da expressão gênica de citocinas pode ser um dos mecanismos utilizados para prevenir as alterações comportamentais induzidas pela MIA.

Diversos estudos têm apresentado evidências que a exposição à MIA é um fator de risco para o desenvolvimento de autismo e esquizofrenia, como revisado por Estes e McAllister (ESTES; MCALLISTER, 2016). A possibilidade de envolvimento de mediadores do sistema imune em doenças do neurodesenvolvimento é ratificada pela presença de um estado pró-inflamatório nesses pacientes (ZENGELER; LUKENS, 2021). Em roedores, o estado pró-inflamatório no encéfalo do feto induzido pela MIA parece ser conservado até a vida adulta (BERGDOLT; DUNAEVSKY, 2019). Nós demonstramos que a indução da MIA com LPS promoveu, na prole adulta, aumento na ansiedade experimental, redução da interação social e alterações na expressão gênica de citocinas, sugerindo um desbalanceamento, pois foi observado aumento na expressão de IL-1 β , IL-6 e TGF- β 1 no córtex pré-frontal, redução da expressão de IL-6 no hipocampo e, no cerebelo, aumento da expressão de TNF- α e redução da expressão de IL-1 β .

Déficits de interação social e ansiedade são descritos com frequência em pacientes com doenças do neurodesenvolvimento como a esquizofrenia (KAHN; SOMMER; MURRAY; MEYER-LINDENBERG *et al.*, 2015; TEMMINGH; STEIN, 2015). Nós utilizamos o teste de campo aberto para analisar a ansiedade experimental e o comportamento exploratório. No grupo MIA, a redução da atividade vertical e da exploração do centro do aparato, sem alterações na distância total percorrida, sugerem aumento da ansiedade experimental em resposta ao ambiente ansiogênico. Nossos achados indicando que a MIA induz aumento da ansiedade experimental na prole adulta estão em acordo com estudos prévios (RAHIMI; PEERI; AZARBAYJANI; ANOOSHEH *et al.*, 2020; SPINI; FERREIRA; GOMES; DUARTE *et al.*, 2021; YANG;

WANG; ZHONG; CHEN *et al.*, 2021). Demonstramos também que a MIA causou redução da interação social, o que é corroborado por estudos anteriores (CARLEZON; KIM; MISSIG; FINGER *et al.*, 2019; LI; MISSIG; FINGER; LANDINO *et al.*, 2018). Haja vista os resultados dos testes de comportamento no grupo MIA+DEX, segundo o nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho demonstrando os efeitos sustentados (que se prolonga por 12 dias, desde o final da administração da dextroacetamina até a análise do comportamento) da dextroacetamina para prevenir o aumento da ansiedade experimental e a redução de interação social em animais expostos à MIA.

Estudos pré-clínicos têm demonstrado o potencial da dextroacetamina para tratar alterações comportamentais em modelos experimentais de depressão, com efeitos antidepressivos verificados imediatamente ou, no máximo, até 7 dias após o fim da administração (SCOTTON; ANTQUEVIEZC; VASCONCELOS; DALPIAZ *et al.*, 2022). Em relação aos estudos com modelos experimentais semelhantes ao utilizado no presente trabalho, segundo o nosso conhecimento, apenas o estudo de Yunfei e colaboradores testou os efeitos da dextroacetamina para prevenir as alterações comportamentais induzidas pela MIA em camundongos (TAN; FUJITA; PU; CHANG *et al.*, 2022). Os autores descreveram que a MIA induziu déficit cognitivo, que foi analisado através do teste de reconhecimento de novo objeto. Os déficits cognitivos foram prevenidos de forma sustentada (14 dias) pela administração dextroacetamina. Nossos resultados ratificam a capacidade da dextroacetamina para prevenir de forma duradoura as alterações comportamentais induzidas pela MIA em outros domínios do comportamento como a ansiedade experimental e a interação social. Tendo em vista a diversidade de alterações comportamentais induzidas pela MIA (BROWN; MEYER, 2018), mais estudos devem ser realizados para verificar a capacidade da dextroacetamina para tratar outras alterações comportamentais relevantes para o estudo pré-clínico do tratamento de doenças do neurodesenvolvimento.

Nossos resultados no teste de labirinto em Y demonstraram que a MIA não induziu déficits na memória espacial de trabalho. A literatura diverge a respeito dos efeitos da MIA sobre a memória espacial de trabalho analisada através da alternância espontânea no labirinto em Y. Por exemplo, o estudo de Mueller e colaboradores demonstrou que a administração de poly I:C no dia gestacional (DG) 12, mas não no DG 9, promove redução da alternância no labirinto em Y em camundongos adultos, embora as doses de poly I:C sejam iguais (MUELLER; POLESEL; RICHETTO; MEYER *et al.*, 2018). Esses achados concordam com o estudo de O'Leary e

colaboradores, que demonstrou que a indução da MIA com poly I:C no DG 9, em camundongos, não foi capaz de promover alterações na alternância no labirinto em Y (O'LEARY; DESBONNET; CLARKE; PETIT *et al.*, 2014). No estudo de Alizadeh e colaboradores, os autores observaram redução da alternância em animais adultos expostos à MIA induzida por LPS no DG 15 e 16 (ALIZADEH; DAVOODIAN; KAZEMI; GHASEMI-KASMAN *et al.*, 2020). Entretanto nesse estudo os autores utilizaram ratos e a dose de LPS foi cinco vezes maior que a utilizada em nosso trabalho. Ainda, camundongos expostos à MIA podem ser resilientes, não apresentando alterações na alternância, enquanto outros animais são susceptíveis à exposição à MIA (MUELLER; SCARBOROUGH; SCHALBETTER; RICHETTO *et al.*, 2021). As diferenças entre os resultados dos estudos citados acima (inclusive o nosso) podem ser devido ao agente (LPS ou poly I:C) e dose utilizada para induzir a MIA, idade gestacional na qual a MIA foi induzida, espécie utilizada no estudo e idade da prole durante a análise da memória espacial de trabalho. De acordo com esses estudos, a dose utilizada em nosso trabalho pode não ter sido suficiente para induzir alterações que influenciassem a alternância, ou o período no qual induzimos à MIA não era de susceptibilidade.

Apesar dos nossos resultados demonstrarem que a administração de dextrocetamina foi capaz de prevenir as alterações comportamentais induzidas pela MIA, a (D/E)-cetamina tem sido utilizada para induzir um modelo farmacológico de esquizofrenia, com alterações comportamentais diversas, incluindo aumento da ansiedade e redução da interação social em camundongos (FROHLICH; VAN HORN, 2014). Nesses estudos, o modelo de esquizofrenia é induzido com a administração da mistura racêmica da cetamina – (D/E)-cetamina. No entanto, nossos resultados no grupo DEX demonstraram que a administração de dextrocetamina não promoveu alterações comportamentais, seja na memória espacial de trabalho, ansiedade experimental ou interação social, em comparação com o grupo controle. A ausência de alterações comportamentais no grupo DEX em nosso experimento pode ser explicada pela menor afinidade da dextrocetamina pelo receptor NMDA (TEMME; SCHEPMANN; SCHREIBER; FREHLAND *et al.*, 2018). Em concordância, Chang e colaboradores demonstraram, em camundongos, que quanto maior for a afinidade do antagonista pelo receptor NMDA, maior será a potência dos seus efeitos para induzir alterações comportamentais e menores seus efeitos antidepressivos (CHANG; ZHANG; PU; QU *et al.*, 2019). Ainda no presente estudo, nós iniciamos a análise do comportamento dez dias após o fim da administração de dextrocetamina. Como não

realizamos análises de comportamento 1 dia após o fim da administração, não sabemos se a dextrocetamina tem efeito agudo para prevenir ou potencializar as alterações induzidas pela MIA. Esta é uma limitação deste trabalho.

Citocinas são proteínas de sinalização com ação pleiotrópica, que no sistema nervoso central podem ser secretadas por neurônios, micróglia, astrócitos e células imunes infiltradas (ZENGELER; LUKENS, 2021). Nossos resultados demonstraram que os animais que receberam a administração de dextrocetamina, a indução da MIA, ou ambos, apresentaram alterações na expressão gênica de citocinas de forma diferente entre as regiões analisadas. As citocinas são constitutivamente expressas no sistema nervoso central e podem ser diferentemente reguladas em processos normais e patológicos, como tem sido demonstrado em pacientes com esquizofrenia e autismo (ZENGELER; LUKENS, 2021). Em roedores, a MIA induz alterações na expressão de citocinas no encéfalo da prole e estas alterações variam de acordo com a região analisada. Além de sua ação como imunomediador, as citocinas têm papel distinto nas diferentes regiões do encéfalo, regulando desde a atividade neuronal até o comportamento (BERGDOLT; DUNAEVSKY, 2019).

Além de sua participação essencial em processos relacionados ao controle motor, o cerebelo tem participação importante em processos como interação social e o processamento emocional, demonstrando alterações em doenças como o autismo e a esquizofrenia (PHILLIPS; HEWEDI; EISSA; MOUSTAFA, 2015). A análise da expressão gênica no cerebelo demonstrou que os grupos DEX, MIA ou MIA+DEX apresentaram redução da expressão de IL-1 β . Ainda, foi observado que a MIA induziu aumento da expressão de TNF- α e que a administração de dextrocetamina preveniu esse aumento. Em conjunto, esses resultados ratificam a atividade anti-inflamatória da dextrocetamina no cerebelo. Yamamoto e colaboradores demonstraram que o modelo experimental de depressão induzido pela administração de LPS no cerebelo induziu alterações comportamentais que foram prevenidas pela inativação de TNF- α (YAMAMOTO; KIM; IMAI; ITAKURA *et al.*, 2019), assim, no presente trabalho, a redução da expressão de TNF- α no grupo MIA+DEX comparado ao grupo MIA pode ser um dos mecanismos pelo qual a dextrocetamina preveniu as alterações comportamentais induzidas pela MIA.

No hipocampo, a análise da expressão gênica das citocinas demonstrou que a MIA induziu redução na expressão de IL-6, assim como no grupo MIA+DEX, sugerindo que a dextrocetamina não foi capaz de prevenir esta redução. A expressão de IL-1 β

foi aumentada no grupo MIA+DEX em comparação com os grupos DEX e MIA, sem alterações em comparação ao grupo controle, sugerindo que a dextrocetamina foi capaz de aumentar a expressão desta citocina apenas nos animais expostos à MIA. A expressão gênica de TGF- β 1 foi aumentada no grupo MIA+DEX em comparação com os demais grupos. Outros trabalhos têm demonstrado que o TGF- β 1 tem ações neurotróficas e neuroprotetoras no hipocampo (CARACI; GULISANO; GUIDA; IMPELLIZZERI *et al.*, 2015) e que a ação antidepressiva da dextrocetamina é dependente da expressão de TGF- β 1 no hipocampo (ZHANG; YANG; CHANG; SAKAMOTO *et al.*, 2020). Embora nosso trabalho não tenha analisado a plasticidade sináptica, Oh-Nishi e colaboradores demonstraram que a exposição à MIA induz redução da plasticidade sináptica no hipocampo (OH-NISHI; OBAYASHI; SUGIHARA; MINAMIMOTO *et al.*, 2010). Esses estudos sugerem que os efeitos da dextrocetamina para prevenir as alterações comportamentais induzidas pela MIA observadas no presente trabalho podem ser mediados pelo aumento da expressão de TGF- β 1 e sua regulação sobre a neuroplasticidade.

A exposição à MIA induziu, no córtex pré-frontal, aumento da expressão gênica das citocinas IL-1 β , IL-6 e TGF- β 1 e a administração de dextrocetamina reduziu o aumento induzido pela MIA. Classicamente, IL-1 β e IL-6 são citocinas com ação pró-inflamatória e TGF- β 1 tem ação anti-inflamatória. Esses resultados sugerem um estado pró-inflamatório no córtex pré-frontal induzido pela MIA, como demonstrado por Garay e colaboradores (GARAY; HSIAO; PATTERSON; MCALLISTER, 2013), e que a dextrocetamina teve ação regulatória anti-inflamatória. O córtex pré-frontal tem participação importante em processos relacionados à ansiedade e interação social (LE MERRE; ÄHRLUND-RICHTER; CARLÉN, 2021), assim, o estado pró-inflamatório induzido pela MIA pode promover alterações no córtex pré-frontal associadas às alterações comportamentais observadas nesse trabalho. A regulação anti-inflamatória pode explicar, em partes, o mecanismo através do qual a dextrocetamina previne as alterações comportamentais. Nossos resultados são corroborados por Zhang e colaboradores, que demonstraram, em camundongos, que a administração de LPS promoveu alterações comportamentais e um estado pró-inflamatório e que a administração de dextrocetamina reverteu as alterações comportamentais e teve ação anti-inflamatória no córtex pré-frontal (ZHANG; MA; WAN; SHAN *et al.*, 2021).

Em resumo, o presente trabalho demonstrou que a administração de dextrocetamina preveniu o aumento da ansiedade e a redução da interação social

induzidos pela MIA. Os efeitos preventivos foram observados no 12º dia após o final do período de administração da dextrocetamina, indicando uma ação sustentada da dextrocetamina. A nível molecular, a dextrocetamina aumentou a expressão de TGF- β no hipocampo, reduziu o aumento da expressão de TNF- α induzido pela MIA no cerebelo e preveniu o estado pró-inflamatório no córtex pré-frontal induzido pela MIA. Esses achados associam um estado inflamatório desregulado induzido pela MIA às alterações comportamentais observadas, sugerindo que a dextrocetamina, ao regular a expressão de citocinas, previne o aumento da ansiedade experimental e a redução da interação social.

8 CONCLUSÃO

A dextrocetamina previne o aumento da ansiedade experimental e a redução da interação social induzidos pela ativação imune materna, associado à modulação da expressão de citocinas no cerebelo, hipocampo e córtex pré-frontal.

REFERÊNCIAS

AGO, Y.; TANABE, W.; HIGUCHI, M.; TSUKADA, S. *et al.* (R)-Ketamine Induces a Greater Increase in Prefrontal 5-HT Release Than (S)-Ketamine and Ketamine Metabolites via an AMPA Receptor-Independent Mechanism. **Int J Neuropsychopharmacol**, 22, n. 10, p. 665-674, Oct 1 2019.

AJMONE-CAT, M. A.; CACCI, E.; RAGAZZONI, Y.; MINGHETTI, L. *et al.* Pro-gliogenic effect of IL-1alpha in the differentiation of embryonic neural precursor cells in vitro. **J Neurochem**, 113, n. 4, p. 1060-1072, May 2010.

ALEXOPOULOU, L.; HOLT, A. C.; MEDZHITOV, R.; FLAVELL, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **Nature**, 413, n. 6857, p. 732-738, Oct 18 2001.

ALIZADEH, F.; DAVOODIAN, N.; KAZEMI, H.; GHASEMI-KASMAN, M. *et al.* Prenatal zinc supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced behavioral impairments in maternal immune activation model. **Behav Brain Res**, 377, p. 112247, Jan 13 2020.

ALVES DE LIMA, K.; RUSTENHOVEN, J.; DA MESQUITA, S.; WALL, M. *et al.* Meningeal $\gamma\delta$ T cells regulate anxiety-like behavior via IL-17a signaling in neurons. **Nat Immunol**, 21, n. 11, p. 1421-1429, Nov 2020.

ANACKER, C.; CATTANEO, A.; LUONI, A.; MUSAELYAN, K. *et al.* Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis. **Neuropsychopharmacology**, 38, n. 5, p. 872-883, Apr 2013.

ANDOH, M.; SHIBATA, K.; OKAMOTO, K.; ONODERA, J. *et al.* Exercise Reverses Behavioral and Synaptic Abnormalities after Maternal Inflammation. **Cell Rep**, 27, n. 10, p. 2817-2825.e2815, Jun 4 2019.

ANVISA, A. N. d. V. S.-. SPRAVATO ® (cloridrato de escetamina): novo registro. p. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/novos-medicamentos-e-indicacoes/spravato-r-cloridrato-de-escetamina-novo-registo>, 2020.

ATLADÓTTIR, H. O.; THORSEN, P.; ØSTERGAARD, L.; SCHENDEL, D. E. *et al.* Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. **J Autism Dev Disord**, 40, n. 12, p. 1423-1430, Dec 2010.

AUTRY, A. E.; ADACHI, M.; NOSYREVA, E.; NA, E. S. *et al.* NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. **Nature**, 475, n. 7354, p. 91-95, Jun 15 2011.

BASIL, P.; LI, Q.; DEMPSTER, E. L.; MILL, J. *et al.* Prenatal maternal immune activation causes epigenetic differences in adolescent mouse brain. **Transl Psychiatry**, 4, n. 9, p. e434, Sep 2 2014.

BELLO-ARROYO, E.; ROQUE, H.; MARCOS, A.; ORIHUEL, J. *et al.* MouBeAT: A New and Open Toolbox for Guided Analysis of Behavioral Tests in Mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 12, n. 201, 2018-September-07 2018. Methods.

BERGDOLT, L.; DUNAEVSKY, A. Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders. **Prog Neurobiol**, 175, p. 1-19, Apr 2019.

BOATO, F.; HECHLER, D.; ROSENBERGER, K.; LÜDECKE, D. *et al.* Interleukin-1 beta and neurotrophin-3 synergistically promote neurite growth in vitro. **J Neuroinflammation**, 8, p. 183, Dec 26 2011.

BORSINI, A.; ZUNSZAIN, P. A.; THURET, S.; PARIANTE, C. M. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. **Trends Neurosci**, 38, n. 3, p. 145-157, Mar 2015.

BOSCH, X.; SAIZ, A.; RAMOS-CASALS, M. Monoclonal antibody therapy-associated neurological disorders. **Nat Rev Neurol**, 7, n. 3, p. 165-172, Mar 2011.

BROWN, A. S. Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. **Schizophr Bull**, 32, n. 2, p. 200-202, Apr 2006.

BROWN, A. S.; MEYER, U. Maternal Immune Activation and Neuropsychiatric Illness: A Translational Research Perspective. **Am J Psychiatry**, 175, n. 11, p. 1073-1083, Nov 1 2018.

CAFFERTY, W. B.; GARDINER, N. J.; DAS, P.; QIU, J. *et al.* Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knock-out mice. **J Neurosci**, 24, n. 18, p. 4432-4443, May 5 2004.

CARACI, F.; GULISANO, W.; GUIDA, C. A.; IMPELLIZZERI, A. A. *et al.* A key role for TGF- β 1 in hippocampal synaptic plasticity and memory. **Sci Rep**, 5, p. 11252, Jun 10 2015.

CAROLA, V.; D'OLIMPIO, F.; BRUNAMONTI, E.; MANGIA, F. *et al.* Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behav Brain Res**, 134, n. 1-2, p. 49-57, Aug 21 2002.

CHANG, L.; ZHANG, K.; PU, Y.; QU, Y. *et al.* Comparison of antidepressant and side effects in mice after intranasal administration of (R,S)-ketamine, (R)-ketamine, and (S)-ketamine. **Pharmacol Biochem Behav**, 181, p. 53-59, Jun 2019.

CHESS, S. Autism in children with congenital rubella. **J Autism Child Schizophr**, 1, n. 1, p. 33-47, Jan-Mar 1971.

CHOI, G. B.; YIM, Y. S.; WONG, H.; KIM, S. *et al.* The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. **Science**, 351, n. 6276, p. 933-939, Feb 26 2016.

COULTHARD, L. G.; HAWKSWORTH, O. A.; WOODRUFF, T. M. Complement: The Emerging Architect of the Developing Brain. **Trends Neurosci**, 41, n. 6, p. 373-384, Jun 2018.

CRAWLEY, J. N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. **Brain Pathol**, 17, n. 4, p. 448-459, Oct 2007.

CUI, K.; ASHDOWN, H.; LUHESHI, G. N.; BOKSA, P. Effects of prenatal immune activation on hippocampal neurogenesis in the rat. **Schizophr Res**, 113, n. 2-3, p. 288-297, Sep 2009.

DEAKIN, B.; SUCKLING, J.; BARNES, T. R. E.; BYRNE, K. *et al.* The benefit of minocycline on negative symptoms of schizophrenia in patients with recent-onset psychosis (BeneMin): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet Psychiatry**, 5, n. 11, p. 885-894, Nov 2018.

DOI, M.; USUI, N.; SHIMADA, S. Prenatal Environment and Neurodevelopmental Disorders. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 13, p. 860110, 2022.

ENAYATI, M.; SOLATI, J.; HOSSEINI, M. H.; SHAHI, H. R. *et al.* Maternal infection during late pregnancy increases anxiety- and depression-like behaviors with increasing age in male offspring. **Brain Res Bull**, 87, n. 2-3, p. 295-302, Feb 10 2012.

ESTES, M. L.; MCALLISTER, A. K. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. **Science**, 353, n. 6301, p. 772-777, Aug 19 2016.

FILLMAN, S. G.; CLOONAN, N.; CATTS, V. S.; MILLER, L. C. *et al.* Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. **Mol Psychiatry**, 18, n. 2, p. 206-214, Feb 2013.

FRICK, L. R.; WILLIAMS, K.; PITTINGER, C. Microglial dysregulation in psychiatric disease. **Clin Dev Immunol**, 2013, p. 608654, 2013.

FROHLICH, J.; VAN HORN, J. D. Reviewing the ketamine model for schizophrenia. **J Psychopharmacol**, 28, n. 4, p. 287-302, Apr 2014.

GARAY, P. A.; HSIAO, E. Y.; PATTERSON, P. H.; MCALLISTER, A. K. Maternal immune activation causes age- and region-specific changes in brain cytokines in offspring throughout development. **Brain Behav Immun**, 31, p. 54-68, Jul 2013.

GILLMAN, M. W. Developmental origins of health and disease. **The New England journal of medicine**, 353, n. 17, p. 1848-1850, 2005.

GIRARD, S.; TREMBLAY, L.; LEPAGE, M.; SÉBIRE, G. IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation. **J Immunol**, 184, n. 7, p. 3997-4005, Apr 1 2010.

GOUGEON, P. Y.; LOURENSSEN, S.; HAN, T. Y.; NAIR, D. G. *et al.* The pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α are neurotrophic for enteric neurons. **J Neurosci**, 33, n. 8, p. 3339-3351, Feb 20 2013.

GUMA, E.; PLITMAN, E.; CHAKRAVARTY, M. M. The role of maternal immune activation in altering the neurodevelopmental trajectories of offspring: A translational review of neuroimaging studies with implications for autism spectrum disorder and schizophrenia. **Neurosci Biobehav Rev**, 104, p. 141-157, Sep 2019.

GUMUSOGLU, S. B.; STEVENS, H. E. Maternal Inflammation and Neurodevelopmental Programming: A Review of Preclinical Outcomes and Implications for Translational Psychiatry. **Biol Psychiatry**, 85, n. 2, p. 107-121, Jan 15 2019.

HASHIMOTO, K.; KAKIUCHI, T.; OHBA, H.; NISHIYAMA, S. *et al.* Reduction of dopamine D(2/3) receptor binding in the striatum after a single administration of esketamine, but not R-ketamine: a PET study in conscious monkeys. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, 267, n. 2, p. 173-176, Mar 2017.

HIEW, L. F.; POON, C. H.; YOU, H. Z.; LIM, L. W. TGF- β /Smad Signalling in Neurogenesis: Implications for Neuropsychiatric Diseases. **Cells**, 10, n. 6, Jun 3 2021.

HSIAO, E. Y.; PATTERSON, P. H. Activation of the maternal immune system induces endocrine changes in the placenta via IL-6. **Brain Behav Immun**, 25, n. 4, p. 604-615, May 2011.

INTA, D.; LANG, U. E.; BORGWARDT, S.; MEYER-LINDENBERG, A. *et al.* Microglia Activation and Schizophrenia: Lessons From the Effects of Minocycline on Postnatal

Neurogenesis, Neuronal Survival and Synaptic Pruning. **Schizophr Bull**, 43, n. 3, p. 493-496, May 1 2017.

JASH, S.; SHARMA, S. In utero immune programming of autism spectrum disorder (ASD). **Hum Immunol**, 82, n. 5, p. 379-384, May 2021.

JIANG, N. M.; COWAN, M.; MOONAH, S. N.; PETRI, W. A., Jr. The Impact of Systemic Inflammation on Neurodevelopment. **Trends in molecular medicine**, 24, n. 9, p. 794-804, 2018.

JONES, C. A.; WATSON, D. J.; FONE, K. C. Animal models of schizophrenia. **Br J Pharmacol**, 164, n. 4, p. 1162-1194, Oct 2011.

JUCKEL, G.; MANITZ, M. P.; BRÜNE, M.; FRIEBE, A. *et al.* Microglial activation in a neuroinflammatory animal model of schizophrenia--a pilot study. **Schizophr Res**, 131, n. 1-3, p. 96-100, Sep 2011.

JÜTTLER, E.; TARABIN, V.; SCHWANINGER, M. Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity. **Neuroscientist**, 8, n. 3, p. 268-275, Jun 2002.

KAHN, R. S.; SOMMER, I. E.; MURRAY, R. M.; MEYER-LINDENBERG, A. *et al.* Schizophrenia. **Nat Rev Dis Primers**, 1, p. 15067, Nov 12 2015.

KNUESEL, I.; CHICHA, L.; BRITSCHGI, M.; SCHOBEL, S. A. *et al.* Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. **Nat Rev Neurol**, 10, n. 11, p. 643-660, Nov 2014.

KOGA, K.; ALDO, P. B.; MOR, G. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. **J Obstet Gynaecol Res**, 35, n. 2, p. 191-202, Apr 2009.

KOSTOVIĆ, I.; JOVANOVIĆ-MILOSEVIĆ, N. The development of cerebral connections during the first 20-45 weeks' gestation. **Semin Fetal Neonatal Med**, 11, n. 6, p. 415-422, Dec 2006.

KUMMER, K. K.; ZEIDLER, M.; KALPACHIDOU, T.; KRESS, M. Role of IL-6 in the regulation of neuronal development, survival and function. **Cytokine**, 144, p. 155582, Aug 2021.

LE BELLE, J. E.; SPERRY, J.; NGO, A.; GHOCHANI, Y. *et al.* Maternal inflammation contributes to brain overgrowth and autism-associated behaviors through altered redox signaling in stem and progenitor cells. **Stem Cell Reports**, 3, n. 5, p. 725-734, Nov 11 2014.

LE MERRE, P.; ÄHRLUND-RICHTER, S.; CARLÉN, M. The mouse prefrontal cortex: Unity in diversity. **Neuron**, 109, n. 12, p. 1925-1944, Jun 16 2021.

LECCA, S.; LUCHICCHI, A.; SCHERMA, M.; FADDA, P. *et al.* Δ^9 -Tetrahydrocannabinol During Adolescence Attenuates Disruption of Dopamine Function Induced in Rats by Maternal Immune Activation. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 13, n. 202, 2019-September-06 2019. Brief Research Report.

LING, Z.; ZHU, Y.; TONG, C.; SNYDER, J. A. *et al.* Progressive dopamine neuron loss following supra-nigral lipopolysaccharide (LPS) infusion into rats exposed to LPS prenatally. **Exp Neurol**, 199, n. 2, p. 499-512, Jun 2006.

LOTTER, J.; MÖLLER, M.; DEAN, O.; BERK, M. *et al.* Studies on Haloperidol and Adjunctive α -Mangostin or Raw Garcinia mangostana Linn Pericarp on Bio-Behavioral Markers in an Immune-Inflammatory Model of Schizophrenia in Male Rats. **Front Psychiatry**, 11, p. 121, 2020.

LU-CULLIGAN, A.; IWASAKI, A. The Role of Immune Factors in Shaping Fetal Neurodevelopment. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 36, p. 441-468, Oct 6 2020.

MA, L.; LI, X. W.; ZHANG, S. J.; YANG, F. *et al.* Interleukin-1 beta guides the migration of cortical neurons. **J Neuroinflammation**, 11, p. 114, Jun 21 2014.

MÄRZ, P.; HERGET, T.; LANG, E.; OTTEN, U. *et al.* Activation of gp130 by IL-6/soluble IL-6 receptor induces neuronal differentiation. **Eur J Neurosci**, 9, n. 12, p. 2765-2773, Dec 1997.

MASI, A.; GLOZIER, N.; DALE, R.; GUASTELLA, A. J. The Immune System, Cytokines, and Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. **Neurosci Bull**, 33, n. 2, p. 194-204, Apr 2017.

MATTA, S. K.; RINKENBERGER, N.; DUNAY, I. R.; SIBLEY, L. D. Toxoplasma gondii infection and its implications within the central nervous system. **Nat Rev Microbiol**, 19, n. 7, p. 467-480, Jul 2021.

MATTEI, D.; IVANOV, A.; FERRAI, C.; JORDAN, P. *et al.* Maternal immune activation results in complex microglial transcriptome signature in the adult offspring that is reversed by minocycline treatment. **Transl Psychiatry**, 7, n. 5, p. e1120, May 9 2017.

MCDONALD, A. J.; MEW, E. J.; HAWLEY, N. L.; LOWE, S. R. Anticipating the long-term neurodevelopmental impact of the COVID-19 pandemic on newborns and infants: A call for research and preventive policy. **J Affect Disord Rep**, 6, p. 100213, Dec 2021.

MEYER, U. Neurodevelopmental Resilience and Susceptibility to Maternal Immune Activation. **Trends Neurosci**, 42, n. 11, p. 793-806, Nov 2019.

MINAKOVA, E.; WARNER, B. B. Maternal immune activation, central nervous system development and behavioral phenotypes. **Birth Defects Res**, 110, n. 20, p. 1539-1550, Dec 1 2018.

MOR, G.; ALDO, P.; ALVERO, A. B. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. **Nat Rev Immunol**, 17, n. 8, p. 469-482, Aug 2017.

MORTENSEN, P. B.; NØRGAARD-PEDERSEN, B.; WALTOFT, B. L.; SØRENSEN, T. L. *et al.* Toxoplasma gondii as a risk factor for early-onset schizophrenia: analysis of filter paper blood samples obtained at birth. **Biol Psychiatry**, 61, n. 5, p. 688-693, Mar 1 2007.

MUELLER, F. S.; POLESEL, M.; RICETTO, J.; MEYER, U. *et al.* Mouse models of maternal immune activation: Mind your caging system! **Brain Behav Immun**, 73, p. 643-660, Oct 2018.

MUELLER, F. S.; SCARBOROUGH, J.; SCHALBETTER, S. M.; RICETTO, J. *et al.* Behavioral, neuroanatomical, and molecular correlates of resilience and susceptibility to maternal immune activation. **Mol Psychiatry**, 26, n. 2, p. 396-410, Feb 2021.

MURPHY, C. E.; WALKER, A. K.; WEICKERT, C. S. Neuroinflammation in schizophrenia: the role of nuclear factor kappa B. **Transl Psychiatry**, 11, n. 1, p. 528, Oct 14 2021.

NAYAK, D.; ROTH, T. L.; MCGAVERN, D. B. Microglia Development and Function. **Annual Review of Immunology**, 32, n. 1, p. 367-402, 2014.

NOLAN, A. M.; NOLAN, Y. M.; O'KEEFFE, G. W. IL-1 β inhibits axonal growth of developing sympathetic neurons. **Mol Cell Neurosci**, 48, n. 2, p. 142-150, Oct 2011.

O'LEARY, C.; DESBONNET, L.; CLARKE, N.; PETIT, E. *et al.* Phenotypic effects of maternal immune activation and early postnatal milieu in mice mutant for the schizophrenia risk gene neuregulin-1. **Neuroscience**, 277, p. 294-305, Sep 26 2014.

OH-NISHI, A.; OBAYASHI, S.; SUGIHARA, I.; MINAMIMOTO, T. *et al.* Maternal immune activation by polyriboinosinic-polyribocytidilic acid injection produces synaptic dysfunction but not neuronal loss in the hippocampus of juvenile rat offspring. **Brain Res**, 1363, p. 170-179, Dec 2 2010.

PARISE, E. M.; ALCANTARA, L. F.; WARREN, B. L.; WRIGHT, K. N. *et al.* Repeated ketamine exposure induces an enduring resilient phenotype in adolescent and adult rats. **Biol Psychiatry**, 74, n. 10, p. 750-759, Nov 15 2013.

PARK, S. Y.; KANG, M. J.; HAN, J. S. Interleukin-1 beta promotes neuronal differentiation through the Wnt5a/RhoA/JNK pathway in cortical neural precursor cells. **Mol Brain**, 11, n. 1, p. 39, Jul 4 2018.

PENG, M.; ZHANG, C.; DONG, Y.; ZHANG, Y. *et al.* Battery of behavioral tests in mice to study postoperative delirium. **Sci Rep**, 6, p. 29874, Jul 20 2016.

PHILLIPS, J. R.; HEWEDI, D. H.; EISSA, A. M.; MOUSTAFA, A. A. The cerebellum and psychiatric disorders. **Front Public Health**, 3, p. 66, 2015.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M. Y. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, 282, n. 5396, p. 2085-2088, Dec 11 1998.

PROBERT, L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. **Neuroscience**, 302, p. 2-22, Aug 27 2015.

PROTTI, M.; MANDRIOLI, R.; MARASCA, C.; CAVALLI, A. *et al.* New-generation, non-SSRI antidepressants: Drug-drug interactions and therapeutic drug monitoring. Part 2: NaSSAs, NRIs, SNDRIs, MASSAs, NDRIs, and others. **Med Res Rev**, 40, n. 5, p. 1794-1832, Sep 2020.

RAHIMI, S.; PEERI, M.; AZARBAYJANI, M. A.; ANOOSHEH, L. *et al.* Long-term exercise from adolescence to adulthood reduces anxiety- and depression-like behaviors following maternal immune activation in offspring. **Physiol Behav**, 226, p. 113130, Nov 1 2020.

REED, M. D.; YIM, Y. S.; WIMMER, R. D.; KIM, H. *et al.* IL-17a promotes sociability in mouse models of neurodevelopmental disorders. **Nature**, 577, n. 7789, p. 249-253, Jan 2020.

RIGGS, L. M.; GOULD, T. D. Ketamine and the Future of Rapid-Acting Antidepressants. **Annu Rev Clin Psychol**, 17, p. 207-231, May 7 2021.

ROUSSA, E.; WIEHLE, M.; DÜNKER, N.; BECKER-KATINS, S. *et al.* Transforming growth factor beta is required for differentiation of mouse mesencephalic progenitors into dopaminergic neurons in vitro and in vivo: ectopic induction in dorsal mesencephalon. **Stem Cells**, 24, n. 9, p. 2120-2129, Sep 2006.

RUDOLPH, M. D.; GRAHAM, A. M.; FECZKO, E.; MIRANDA-DOMINGUEZ, O. *et al.* Maternal IL-6 during pregnancy can be estimated from newborn brain connectivity and predicts future working memory in offspring. **Nat Neurosci**, 21, n. 5, p. 765-772, May 2018.

SADEGHIEH, T.; SARGEANT, J. M.; GREER, A. L.; BERKE, O. *et al.* Zika virus outbreak in Brazil under current and future climate. **Epidemics**, 37, p. 100491, Aug 20 2021.

SANTELLO, M.; BEZZI, P.; VOLTERRA, A. TNF α controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. **Neuron**, 69, n. 5, p. 988-1001, Mar 10 2011.

SCHAFFER, D. P.; LEHRMAN, E. K.; STEVENS, B. The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. **Glia**, 61, n. 1, p. 24-36, Jan 2013.

SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E.; KAYNIG, V. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nat Methods**, 9, n. 7, p. 676-682, Jun 28 2012.

SCOTTON, E.; ANTQUEVIEZC, B.; VASCONCELOS, M. F.; DALPIAZ, G. *et al.* Is (R)-ketamine a potential therapeutic agent for treatment-resistant depression with less detrimental side effects? A review of molecular mechanisms underlying ketamine and its enantiomers. **Biochem Pharmacol**, 198, p. 114963, Apr 2022.

SILVA, S. C. A.; BRAZ, G. R. F.; DO NASCIMENTO, L. C. P.; SANTANA, D. F. *et al.* Influence of maternal protein malnutrition on oxidative stress and regulators of mitochondrial biogenesis in female rat hearts over succeeding generations. **Life Sci**, 232, p. 116579, Sep 1 2019.

SIMÕES, L. R.; SANGIOGO, G.; TASHIRO, M. H.; GENEROSO, J. S. *et al.* Maternal immune activation induced by lipopolysaccharide triggers immune response in pregnant mother and fetus, and induces behavioral impairment in adult rats. **J Psychiatr Res**, 100, p. 71-83, May 2018.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nat Rev Immunol**, 10, n. 2, p. 89-102, Feb 2010.

SMITH, S. E.; LI, J.; GARBETT, K.; MIRNICS, K. *et al.* Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. **J Neurosci**, 27, n. 40, p. 10695-10702, Oct 3 2007.

SOLEK, C. M.; FAROOQI, N.; VERLY, M.; LIM, T. K. *et al.* Maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. **Dev Dyn**, 247, n. 4, p. 588-619, Apr 2018.

SPINI, V.; FERREIRA, F. R.; GOMES, A. O.; DUARTE, R. M. F. *et al.* Maternal Immune Activation with H1N1 or Toxoplasma gondii Antigens Induces Behavioral Impairments Associated with Mood Disorders in Rodents. **Neuropsychobiology**, 80, n. 3, p. 234-241, 2021.

STEINER, J.; BIELAU, H.; BRISCH, R.; DANOS, P. *et al.* Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. **J Psychiatr Res**, 42, n. 2, p. 151-157, Jan 2008.

STELLWAGEN, D.; MALENKA, R. C. Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. **Nature**, 440, n. 7087, p. 1054-1059, Apr 20 2006.

STILES, J.; JERNIGAN, T. L. The basics of brain development. **Neuropsychol Rev**, 20, n. 4, p. 327-348, Dec 2010.

STURMAN, O.; GERMAIN, P. L.; BOHACEK, J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. **Stress**, 21, n. 5, p. 443-452, Sep 2018.

SUZUKI, K.; SUGIHARA, G.; OUCHI, Y.; NAKAMURA, K. *et al.* Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. **JAMA Psychiatry**, 70, n. 1, p. 49-58, Jan 2013.

TALUKDAR, P. M.; ABDUL, F.; MAES, M.; BERK, M. *et al.* A proof-of-concept study of maternal immune activation mediated induction of Toll-like receptor (TLR) and inflammasome pathways leading to neuroprogressive changes and schizophrenia-like behaviours in offspring. **Eur Neuropsychopharmacol**, 52, p. 48-61, Nov 2021.

TAN, Y.; FUJITA, Y.; PU, Y.; CHANG, L. *et al.* Repeated intermittent administration of (R)-ketamine during juvenile and adolescent stages prevents schizophrenia-relevant phenotypes in adult offspring after maternal immune activation: a role of TrkB signaling. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, Jan 3 2022.

TEMME, L.; SCHEPMANN, D.; SCHREIBER, J. A.; FREHLAND, B. *et al.* Comparative Pharmacological Study of Common NMDA Receptor Open Channel Blockers Regarding Their Affinity and Functional Activity toward GluN2A and GluN2B NMDA Receptors. **ChemMedChem**, 13, n. 5, p. 446-452, Mar 6 2018.

TEMMINGH, H.; STEIN, D. J. Anxiety in Patients with Schizophrenia: Epidemiology and Management. **CNS Drugs**, 29, n. 10, p. 819-832, 2015.

URAKUBO, A.; JARSKOG, L. F.; LIEBERMAN, J. A.; GILMORE, J. H. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. **Schizophr Res**, 47, n. 1, p. 27-36, Jan 15 2001.

VALLIÈRES, L.; CAMPBELL, I. L.; GAGE, F. H.; SAWCHENKO, P. E. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. **J Neurosci**, 22, n. 2, p. 486-492, Jan 15 2002.

VAN DEN EYNDE, K.; MISSAULT, S.; FRANSEN, E.; RAEYMAEKERS, L. *et al.* Hypolocomotive behaviour associated with increased microglia in a prenatal immune activation model with relevance to schizophrenia. **Behav Brain Res**, 258, p. 179-186, Jan 1 2014.

WALL, P. M.; MESSIER, C. Infralimbic kappa opioid and muscarinic M1 receptor interactions in the concurrent modulation of anxiety and memory. **Psychopharmacology (Berl)**, 160, n. 3, p. 233-244, Mar 2002.

WALLENIUS, V.; WALLENIUS, K.; AHRÉN, B.; RUDLING, M. *et al.* Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. **Nat Med**, 8, n. 1, p. 75-79, Jan 2002.

WANG, N.; YU, H. Y.; SHEN, X. F.; GAO, Z. Q. *et al.* The rapid antidepressant effect of ketamine in rats is associated with down-regulation of pro-inflammatory cytokines in the hippocampus. **Ups J Med Sci**, 120, n. 4, p. 241-248, 2015.

WANG, X.; FU, S.; WANG, Y.; YU, P. *et al.* Interleukin-1beta mediates proliferation and differentiation of multipotent neural precursor cells through the activation of SAPK/JNK pathway. **Mol Cell Neurosci**, 36, n. 3, p. 343-354, Nov 2007.

WASTNEDGE, E. A. N.; REYNOLDS, R. M.; VAN BOECKEL, S. R.; STOCK, S. J. *et al.* Pregnancy and COVID-19. **Physiol Rev**, 101, n. 1, p. 303-318, Jan 1 2021.

WEI, H.; CHADMAN, K. K.; MCCLOSKEY, D. P.; SHEIKH, A. M. *et al.* Brain IL-6 elevation causes neuronal circuitry imbalances and mediates autism-like behaviors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, 1822, n. 6, p. 831-842, 2012/06/01/ 2012.

WIETRZYCH, M.; MEZIANE, H.; SUTTER, A.; GHYSELINCK, N. *et al.* Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice. **Learn Mem**, 12, n. 3, p. 318-326, May-Jun 2005.

WILKINSON, S. T.; BALLARD, E. D.; BLOCH, M. H.; MATHEW, S. J. *et al.* The Effect of a Single Dose of Intravenous Ketamine on Suicidal Ideation: A Systematic Review and Individual Participant Data Meta-Analysis. **Am J Psychiatry**, 175, n. 2, p. 150-158, Feb 1 2018.

WONG, H.; HOEFFER, C. Maternal IL-17A in autism. **Exp Neurol**, 299, n. Pt A, p. 228-240, Jan 2018.

WU, W. L.; HSIAO, E. Y.; YAN, Z.; MAZMANIAN, S. K. *et al.* The placental interleukin-6 signaling controls fetal brain development and behavior. **Brain Behav Immun**, 62, p. 11-23, May 2017.

XIAO, J.; BUKA, S. L.; CANNON, T. D.; SUZUKI, Y. *et al.* Serological pattern consistent with infection with type I *Toxoplasma gondii* in mothers and risk of psychosis among adult offspring. **Microbes Infect**, 11, n. 13, p. 1011-1018, Nov 2009.

XU, Z.; ZHANG, X.; CHANG, H.; KONG, Y. *et al.* Rescue of maternal immune activation-induced behavioral abnormalities in adult mouse offspring by pathogen-activated maternal T(reg) cells. **Nat Neurosci**, 24, n. 6, p. 818-830, Jun 2021.

YAMAMOTO, M.; KIM, M.; IMAI, H.; ITAKURA, Y. *et al.* Microglia-Triggered Plasticity of Intrinsic Excitability Modulates Psychomotor Behaviors in Acute Cerebellar Inflammation. **Cell Rep**, 28, n. 11, p. 2923-2938.e2928, Sep 10 2019.

YANG, C.; HU, Y. M.; ZHOU, Z. Q.; ZHANG, G. F. *et al.* Acute administration of ketamine in rats increases hippocampal BDNF and mTOR levels during forced swimming test. **Ups J Med Sci**, 118, n. 1, p. 3-8, Mar 2013.

YANG, C.; SHIRAYAMA, Y.; ZHANG, J. C.; REN, Q. *et al.* R-ketamine: a rapid-onset and sustained antidepressant without psychotomimetic side effects. **Transl Psychiatry**, 5, n. 9, p. e632, Sep 1 2015.

YANG, C.; YANG, J.; LUO, A.; HASHIMOTO, K. Molecular and cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine enantiomers and its metabolites. **Transl Psychiatry**, 9, n. 1, p. 280, Nov 7 2019.

YANG, Y.; WANG, B.; ZHONG, Z.; CHEN, H. *et al.* Clonazepam attenuates neurobehavioral abnormalities in offspring exposed to maternal immune activation by enhancing GABAergic neurotransmission. **Biochem Pharmacol**, 192, p. 114711, Oct 2021.

YI, J. J.; BARNES, A. P.; HAND, R.; POLLEUX, F. *et al.* TGF-beta signaling specifies axons during brain development. **Cell**, 142, n. 1, p. 144-157, Jul 9 2010.

YOU, Z.; LUO, C.; ZHANG, W.; CHEN, Y. *et al.* Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress: involvement in depression. **Behav Brain Res**, 225, n. 1, p. 135-141, Nov 20 2011.

ZANOS, P.; MOADDEL, R.; MORRIS, P. J.; GEORGIU, P. *et al.* NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. **Nature**, 533, n. 7604, p. 481-486, May 26 2016.

ZENGELER, K. E.; LUKENS, J. R. Innate immunity at the crossroads of healthy brain maturation and neurodevelopmental disorders. **Nat Rev Immunol**, 21, n. 7, p. 454-468, Jul 2021.

ZHANG, J.; MA, L.; WAN, X.; SHAN, J. *et al.* (R)-Ketamine attenuates LPS-induced endotoxin-derived delirium through inhibition of neuroinflammation. **Psychopharmacology (Berl)**, 238, n. 10, p. 2743-2753, Oct 2021.

ZHANG, K.; SAKAMOTO, A.; CHANG, L.; QU, Y. *et al.* Splenic NKG2D confers resilience versus susceptibility in mice after chronic social defeat stress: beneficial effects of (R)-ketamine. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, 271, n. 3, p. 447-456, Apr 2021.

ZHANG, K.; YANG, C.; CHANG, L.; SAKAMOTO, A. *et al.* Essential role of microglial transforming growth factor- β 1 in antidepressant actions of (R)-ketamine and the novel antidepressant TGF- β 1. **Transl Psychiatry**, 10, n. 1, p. 32, Jan 27 2020.

ZHONG, J.; DIETZEL, I. D.; WAHLE, P.; KOPF, M. *et al.* Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice. **J Neurosci**, 19, n. 11, p. 4305-4313, Jun 1 1999.

ZHOU, Y. X.; ZHAO, M.; LI, D.; SHIMAZU, K. *et al.* Cerebellar deficits and hyperactivity in mice lacking Smad4. **J Biol Chem**, 278, n. 43, p. 42313-42320, Oct 24 2003.

ZUNSZAIN, P. A.; ANACKER, C.; CATTANEO, A.; CHOUDHURY, S. *et al.* Interleukin-1 β : a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis. **Neuropsychopharmacology**, 37, n. 4, p. 939-949, Mar 2012.

ANEXO A – Aprovação da comissão de ética no uso de animais



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife – PE – Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 25 de fevereiro de 2021

Ofício nº 78/21

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Dayane Aparecida Gomes**
 Departamento de Fisiologia e Farmacologia/CB
 processo nº004/2021

Certificamos que a proposta intitulada **“Análise molecular, histomorfológica e comportamental do modelo experimental de esquizofrenia induzido por ativação inflamatória materna e manipulação do sistema glutamatérgico por antagonismo do receptor nmda da prole”**, registrado com o nº004/2021 sob a responsabilidade da **Prof Dayane Aparecida Gomes** 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 aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 23/02/2021

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/03/2021 a 01/02/2024
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico
Nº de animais	240
Peso/Idade	25g-45g/ 30 dias
Sexo	Macho (120) e Femea (120)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Recife - UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Sala de Experimentação de Camundongos do Laboratório de Neuroendocrinologia e Metabolismo – Recife - UFPE

Atenciosamente

Prof. Sebastião R. F. Silva
 Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691