

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

TATHIANE ALVES LIMA EVANGELISTA

**ATIVACÃO IMUNE MATERNA E VACINAÇÃO CONTRA
INFLUENZA A (H1N1) DURANTE A GESTAÇÃO EM RATAS
WISTAR E SUA RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DE
TRANSTORNOS PSQUIÁTRICOS NA PROLE ADULTA**

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde
para a obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a
Alexandra Zugno

CRICIÚMA, 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

E92a Evangelista, Tathiane Alves Lima.

Ativação imune materna e vacinação contra Influenza A (H1N1) durante a gestação em ratas wistar e sua relação com o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na prole adulta / Tathiane Alves Lima Evangelista; orientador: Alexandra Zugno. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2017.

82 p: il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul

Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2017.

1. Ativação imune materna. 2. Grávidas– Aspectos imunológicos. 3. Imunidade celular. 4 Transtorno neurodesenvolvimental. 5. Influenza A (H1N1) - Vacinação. 6. CitocinasI. I. Título.

CDD. 22ª ed. 616.079

Bibliotecária Rosângela Westrupp – CRB 14º/364

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata **Tathiane Alves Lima Evangelista** sob o título “ATIVACÃO IMUNE MATERNA COMO FATOR DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DE TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS”, para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

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

Criciúma, SC, 09 de dezembro de 2016.


Prof.ª Dra. Josiane Budni

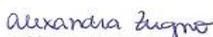
Membro Relator


Prof.ª Dra. Samira da Silva Valvassori

Membro Interno


Prof.ª Dra. Fabricia Cardoso Petronilho

Membro Externo


Prof.ª Dra. Alexandra Ioppi Zugno
Orientadora

Prof.ª Dra. Maria Inês da Rosa
Coordenadora PPGCS
Prof.ª Dra. Maria Inês da Rosa
Coordenadora do PPGCS

Folha informativa

A dissertação foi escrita seguindo o estilo Vancouver e será apresentada de forma tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Resumo

A presença de infecção durante a gravidez pode aumentar consideravelmente a incidência de transtornos neurodesenvolvimentais nos filhos, em especial esquizofrenia e autismo, além de ansiedade e depressão. Desde 2005 a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que mulheres grávidas sejam vacinadas contra influenza A. No entanto, a utilização desta vacina durante a gravidez permanece limitada, devido às preocupações sobre o desenvolvimento do feto e os possíveis efeitos teratogênicos, uma vez que a gravidez é um critério de exclusão para a participação em ensaios clínicos com vacinas. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros comportamentais de déficit olfatório, ansiedade, atividade locomotora e comportamento tipo-depressivo, além dos níveis de neurotrofinas (NTs) na prole adulta de ratas Wistar submetidas à vacinação contra influenza A e comparar esses parâmetros na prole de ratas induzidas a uma infecção com PolyI: C durante a gestação. Utilizaram-se ratas Wistar gestantes, as quais foram divididas em três grupos: 1) grupo controle que recebeu salina; 2) grupo administrado com a vacina contra influenza A (H1N1); 3) grupo PolyI: C, submetido a uma única injeção de PolyI: C; todas administradas no 9º dia de gestação. Após o desmame, os filhotes machos e fêmeas foram agrupados conforme o tratamento materno e, ao completarem 60 dias, ambas as proles foram submetidas aos testes comportamentais: discriminação olfatória, labirinto em cruz elevada, atividade locomotora e splash teste. Após os testes, os animais foram decapitados e suas estruturas cerebrais (córtex frontal, hipocampo, estriado e bulbo olfatório - BO) retiradas para análises dos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento neuronal (NGF). De modo geral, os resultados apontaram que a ativação imune materna (AIM) por PolyI: C foi capaz de induzir déficit olfatório, um comportamento tipo-depressivo e alterou a atividade locomotora na vida tardia da prole, independentemente do gênero, confirmando que a infecção pré-natal está implicada nos transtornos neurodesenvolvimentais. Em relação aos efeitos da vacina H1N1 na gestação sobre a prole adulta, ao associar os resultados comportamentais e os níveis de NTs, observou-se que a vacina apenas alterou o comportamento tipo-depressivo nos ratos machos. Todavia, o fato dos níveis cerebrais de BDNF e NGF estarem diminuídos nestes animais poderia contribuir na compreensão deste achado

comportamental, uma vez que a redução das NTs pode comprometer a angiogênese e neurogênese cerebral e, em consequência, influenciar na resposta comportamental dos animais H1N1. Verificou-se ainda que a vacina contra influenza A na gravidez aumentou os níveis de BDNF apenas no córtex frontal de ratas fêmeas, sugerindo que os níveis desta NT foram influenciados pela vacina H1N1 durante a gestação, a qual pode ter exercido um efeito protetor a longo prazo, embora somente neste parâmetro neuroquímico. Por fim, dados da literatura confirmam que vacinação na fase pré-natal induz uma resposta imune protetora em processos neuronais, como a neurogênese, e no comportamento da prole adulta, sugerindo que os possíveis mecanismos de mediação do desenvolvimento do cérebro pós-natal estão relacionados aos fatores neurotróficos, bem como à liberação de citocinas e questões hormonais, as quais devem ser investigadas em pesquisas posteriores.

Palavras-chaves: Ativação imune materna, PolyI: C, vacina contra influenza A (H1N1), gestação, modelo animal, transtornos neurodesenvolvimentais. relação ao teste de memória de habituação ao campo aberto houve

Abstract

The presence of infection during pregnancy can greatly increase the incidence of neurodevelopmental disorders in children, especially schizophrenia and autism, as well as anxiety and depression. Since 2005, the World Health Organization (WHO) recommends that pregnant women be vaccinated against influenza. However, the use of this vaccine during pregnancy remains limited due to concerns about its potential effect on fetal development and possible teratogenic effects, since pregnancy is an exclusion criteria for participation in clinical trials with vaccines. Thus, the present study aimed to evaluate the behavioral parameters of olfactory deficit, anxiety, locomotor activity and type-depressive behavior, as well as levels of neurotrophins (NTs) in adult male and female offspring subjected to influenza A vaccination and to compare these parameters in the offspring of rats induced with PolyI: C infection during gestation. Pregnant Wistar rats were used, which were divided into three groups: 1) control group that received saline; 2) group administered with influenza A (H1N1) vaccine; 3) PolyI: C group, subjected to a single PolyI: C injection; All administered on the 9th day of gestation. After weaning, the male and female offspring were grouped according to maternal treatment, and at 60 days, both offspring were subjected to behavioral tests: olfactory discrimination, elevated plus maze, locomotor activity and splash test. After these tests, animals were decapitated and their brain structures (frontal cortex, hippocampus, striatum and olfactory bulb - OB) were removed for biochemical analyzes of NTs levels: brain derived neurotrophic factor (BDNF) and neuronal growth factor (NGF). In general, results indicate that maternal immune activation (AIM) by PolyI: C was able to induce olfactory deficit, the type-depressive behavior and altered locomotor activity in adult offspring, regardless of sex, confirming that the prenatal infection implicated in neurodevelopmental disorders. In relation to the effects of the H1N1 vaccine on gestation on adult offspring, by associating the behavioral results and the levels of NTs, it was observed that the vaccine only altered the type-depressive behavior in the male rats. However, the fact that brain levels of BDNF and NGF are decreased in these animals could contribute to the understanding of this behavioral finding, since the reduction of NTs may compromise angiogenesis and neurogenesis and, consequently, influence the behavioral response of H1N1 animals. It was also found that influenza A vaccine in pregnancy increased the levels of BDNF only in the frontal cortex of female rats, suggesting that

the levels this NT were influenced by the H1N1 vaccine during gestation. This suggests that prenatal vaccination exerted a protective effect in the long term, although only in this neurochemical parameter. After all, data from the literature confirm that prenatal vaccination induces a protective immune response in the neuronal processes, such as neurogenesis, and in the adult offspring behavior, suggesting that the possible mechanisms of mediating the development of the postnatal brain are related to neurotrophic factors, as well as release of cytokines and hormone issues, which should be investigated in later research.

Key words: Maternal immune activation, PolyI: C, influenza A (H1N1) vaccine, gestation, animal model, neurodevelopmental disorders.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIM - Ativação Imune Materna.
ANOVA - Análise de Variância.
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, do inglês Brain Derived Neurotrophic Factor.
BO - Bulbo Olfatório.
CEUA - Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais.
CNTF - Fator Neurotrófico Ciliar, do inglês Ciliary Neurotrophic Factor.
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.
CXCL1 - Fator de Estimulação de Colônias de Granulócitos, de Proteína Quimiotáxia de Monócitos e KC, do inglês Granulocyte Colony Stimulation Factor, Monocyte Chemotactic Protein and KC.
EGTA - Etileno Glicol (2-aminoetil éter)-N, N, N'N' Ácido Tetraacético.
EPM - Erro Padrão da Média.
GD - Giro Danteado.
NGF - Fator de Crescimento Nervoso, do inglês Nervous Growth Factor.
GDNF - Fator Neurotrófico Derivado da Glia, do inglês Neurotrophic Factor Derived from Glia.
H1N1 - Influenza A.
HPA - Hipotálamo-Hipófise-Adrenal.
IFN - Interferons.
IFN α - Interferon Alfa.
IFN γ - Interferon Gama.
IL - Interleucinas.
IL-6 - Interleucina 6.
NFkB - Fator de Transcrição Nuclear- κ B.
LIF - Fator Inibidor de Leucemia, do inglês Leukemia Inhibitory Factor.
LPS - Lipopolissacarídeo.
NTs - Neurotrofinas.
NT-3 - Neurotrofina 3.
NT-4 - Neurotrofina 4.
OMS - Organização Mundial de Saúde.
OSM - Oncostatina M.
PMSF - Flúor Fenilmetilsulfonil.

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

SNC - Sistema Nervoso Central.

SNP - Sistema Nervoso Periférico.

SZV - Zona Zubventricular.

TBS - Tampão Fosfato Salino.

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

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

UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 21 |
| 1.1 ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA (AIM) DURANTE A GESTAÇÃO E TRANSTORNOS NEURODESENVOLVIMENTAIS NA PROLE..... | 21 |
| 1.2 VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA A DUTANTE A GESTAÇÃO E SEUS EFEITOS NA VODA TARDIA DA PROLE RELACIONADOS AOS TRANSTORNOS NEURODESENVOLVIMENTAIS..... | 25 |
| 1.3 NEUROTROFINAS..... | 27 |
| 2 OBJETIVOS..... | 31 |
| 2.1 2.1 GERAL..... | 31 |
| 2.2 2.2 ESPECÍFICOS..... | 31 |
| 3 METODOLOGIA..... | 32 |
| 3.1 ASPÉCTOS ÉTICOS..... | 32 |
| 3.2 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 32 |
| 3.3 ADMINISTRAÇÃO DE SALINA, VACINA CONTRA INFLUENZA A (H1N1) E POLYL: C NAS RATAS GESTANTES..... | 35 |
| 3.4.1 Discriminação olfatória..... | 36 |
| 3.4.2 Labirinto em cruz elevada (Elevated Plus-Maze)..... | 37 |
| 3.4.3 Atividade locomotora..... | 37 |
| 3.4.4 Splash teste..... | 37 |
| 3.5 ANÁLISES NEUROQUÍMICAS..... | 38 |
| 3.5.1 Níveis BDNF e NGF..... | 38 |
| 3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... | 38 |
| 4. RESULTADO..... | 40 |
| 4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS..... | 40 |
| 4.1.1 Discriminação olfatória..... | 40 |
| 4.1.2 Labirinto em cruz elevada (Elevated plus maze)..... | 42 |
| 4.1.3 Atividade locomotora..... | 43 |
| 4.1.4 Splash teste..... | 45 |
| 4.2 Análises Neuroquímicas..... | 48 |
| 4.2.1 Níveis cerebrias de BDNF e NGF..... | 48 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 53 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 67 |
| REFÊRENCIAS..... | 68 |
| ANEXO | 80 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA (AIM) DURANTE A GESTAÇÃO E TRANSTORNOS NEURODESENVOLVIMENTAIS NA PROLE

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

A etiologia dos transtornos psiquiátricos neurodesenvolvimentais como esquizofrenia, autismo, ansiedade e depressão envolve alterações na formação cerebral (Brandon e Sawa, 2011). Assim, eventos adversos no útero podem influenciar os processos críticos do desenvolvimento do cérebro dos filhos e predispor o aparecimento de doenças mentais na idade jovem-adulta (Brown, 2006).

Um dos mais significativos fatores de risco ambientais para a esquizofrenia é a infecção no 1º (Brown et al., 2006) e 2º trimestre de gestação (Clarke et al., 2006), a qual pode afetar o desenvolvimento cerebral, devido a liberação de hormônios relacionados ao estresse, hipóxia, hipertermia ou desnutrição e, assim, desencadear a liberação e, por conseguinte, o aumento de citocinas pró-inflamatórias na mãe, placenta e no feto (Patterson, 2007).

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

bacterianos e virais, respectivamente, na gravidez (Anderson e Maes, 2013).

Assim, a PolyI: caracteriza-se como um análogo sintético de cadeia dupla de RNA que leva à produção pronunciada, mas por tempo limitado de citocinas pró-inflamatórias e estimula reações fisiológicas induzidas por infecção viral sendo, por este motivo, amplamente usada para mimetizar a AIM em modelos animais (Majde, 2000; Alexopoulou, 2011). Baseado nas observações de que a exposição pré-natal à infecção constitui um fator de risco para a esquizofrenia, a PolyI: C foi selecionada para este estudo, e tem sido empregada no 9º dia de gestação em roedores como um bom modelo neurodesenvolvimental de AIM capaz de induzir anormalidades estruturais, comportamentais, neuroquímicas e cerebrais características da esquizofrenia na prole adulta (Meyer e Feldon, 2012; Hadar et al., 2015; Reisinger et al., 2015).

De modo geral, a administração de PolyI: C em ratos Wistar durante a gravidez, tem levado a impactos na prole, indicando um efeito transplacentário da AIM no feto em desenvolvimento (Boksa, 2010; Meyer e Feldon, 2012). De qualquer forma, ambas as infecções por LPS e PolyI: C, aumentam a liberação de citocinas pró-inflamatórias na mãe (placenta e líquido amniótico) e no cérebro do feto, sendo que a PolyI: C ainda induz uma resposta aguda a infecções virais, aumentando consideravelmente a liberação de interferons (IFN): IFN α e IFN γ (Winter et al., 2009). Desse modo, pelo fato das citocinas direcionarem a resposta imune inata, foi atribuído a estas o papel de candidatas à interrupção do desenvolvimento cérebro-fetal (Figura 1) (Smith et al., 2007; Reisinger et al., 2015).

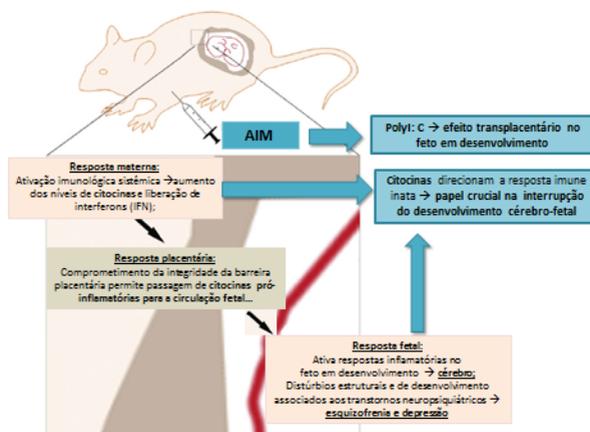


Figura 1: Modelo de AIM em roedores: A infecção gestacional é mimetizada pela estimulação imunológica de roedores gestantes com agentes imunoestimulantes como Poly I:C. As respostas no compartimento materno incluem a ativação imunológica sistêmica caracterizada por níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias. Conseqüentemente, a integridade da barreira placentária torna-se comprometida, permitindo a entrada de citocinas na circulação fetal, o que induz respostas inflamatórias no feto em desenvolvimento, inclusive no cérebro-fetal. Tudo isso leva a distúrbios estruturais e de desenvolvimento associados aos transtornos neuropsiquiátricos como esquizofrenia e depressão. Fonte: Adaptado de Reisinger et al., 2015.

Adicionalmente, a administração de LPS ou PolyI: C leva à ativação da microglia e induz a inflamação via fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B) no cérebro do feto (Saadani-Makki et al., 2008). Como consequência da AIM, há um aumento da inflamação no útero materno e a conseqüente perda de células precursoras de oligodendrócitos, hipomielinização e neuroinflamação fetal, o que pode acarretar em alterações comportamentais, cognitivas e neuroquímicas na vida tardia da prole (Svedin et al., 2005; Monji et al., 2009). Além disso, o tratamento com PolyI: C gestacional pode comprometer o desenvolvimento do sistema límbico e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), através da liberação de corticotrofina no cérebro-fetal, resultando em comportamento ansiogênico e depressivo, além de déficits de aprendizagem e atenção na vida jovem-adulta da prole. Ademais, os gêneros (masculino e feminino) podem diferir quanto à

sensibilidade das áreas cerebrais em desenvolvimento e aos hormônios do estresse e manifestar diferentes respostas mediante a exposição de uma mesma situação estressora (Weinstock, 2007; Schwendener et al., 2009).

Neste sentido, a plasticidade neuronal permite que o cérebro se adapte estruturalmente perante mudanças ambientais ou agentes estressores, sendo a resposta imune periférica, um estressor neuroetiológico para este processo (Dantzer et al., 2008). Assim, um exemplo primordial de plasticidade é a neurogênese adulta, na qual novos neurônios são gerados durante toda a vida perante situações adversas (Cameron and McKay, 1999). No entanto, ainda não está claro como este processo é regulado fisiologicamente (Xia et al., 2014a). Sabe-se que a neurogênese é o aspecto mais vital do sistema nervoso central (SNC) e ocorre em todas as áreas do cérebro durante o desenvolvimento (Ziv e Schwartz, 2008), no entanto, há duas regiões neurogênicas principais em mamíferos adultos: giro denteado (GD) do hipocampo, região diretamente envolvida na aprendizagem e memória, e a zona subventricular (SZV) ou bulbo olfatório (BO) (Wang et al., 2011; Wu et al., 2013). Pesquisa indica que a neurogênese reduzida no BO pode causar déficits na discriminação olfatória (Bath et al., 2008). Em adição, o olfato tem sido identificado como um biomarcador importante para esquizofrenia e autismo (Atanasova et al., 2008). De fato, recente estudo de neuroimagem demonstrou que o volume do BO em pacientes esquizofrênicos apresenta-se diminuído (Nguyen et al., 2011), o que torna relevante investigar se as funções olfativas na prole adulta de mães expostas à AIM encontram-se comprometidas (Liu et al., 2013).

De modo geral, a neurogênese, em ambas as regiões é controlada por fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo as citocinas pró-inflamatórias que têm um papel crítico nos processos cognitivos, tais como plasticidade sináptica e neuromodulação (Balu e Lucki, 2009). Diante disso, as interleucinas (IL), IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), apresentam efeitos negativos na neurogênese adulta e encontram-se elevadas pela AIM (Spooren et al., 2011; Gonzalez-Perez et al., 2012).

Ademais, estudos têm demonstrado que o comprometimento comportamental e cognitivo na prole adulta de mães expostas à AIM pode ser resultante da exposição aguda e crônica de citocinas pró-inflamatórias (Meyer et al., 2006; Garay et al., 2013), as quais levam a alterações neuroquímicas e morfológicas. A desregulação dos sistemas dopaminérgico (Meyer et al., 2008a), serotoninérgico (Fatemi et al.,

2008), glutamatérgico (Meyer et al., 2008b) e GABAérgico também foi observada em descendentes de AIM (Samuelsson et al., 2006). Morfologicamente, a AIM causa lesões corticais cerebrais durante a fase neonatal (Girard et al., 2010), diminuição da atividade cerebelar das células Purkinje (Shi et al., 2009) e aumento da apoptose em ambos os neurônios e células da glia em várias regiões cerebrais (Boksa, 2010). Somado a isso, a neurogênese no GD hipocampal tem se mostrado prejudicada na prole adulta induzida por AIM (Meyer et al., 2006; Cui et al., 2009).

Com base nas evidências acima descritas, estudos sugerem que a intervenção viral ou bacteriana na gravidez é capaz de diminuir a proliferação celular, sobrevivência dos neurônios e causar mudanças comportamentais acentuadas na vida tardia da prole (Cui et al., 2009; Shi et al., 2009). Contudo, se a os efeitos da imunização contra influenza A (H1N1) ou da vacinação sazonal contra a gripe durante a gravidez podem influenciar no desenvolvimento fetal ainda não está claro, necessitando de mais pesquisas (Xia et al., 2014a,b).

1.2 VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA A DUTANTE A GESTAÇÃO E SEUS EFEITOS NA VODA TARDIA DA PROLE RELACIONADOS AOS TRANSTORNOS NEURODESENVOLVIMENTAIS

É sabido que as mulheres grávidas são consideradas o grupo de risco mais importante para a vacinação contra a gripe, também denominada influenza ou H1N1 (McMillan et al., 2015). Em adição, mulheres com doença crônica, tal como função pulmonar prejudicada, asma grave, diabetes mellitus, deficiência imunológica e obesidade apresentam risco aumentado de complicações para influenza, sendo oferecida a vacinação já no 1º trimestre de gestação (Helmig et al., 2015). Assim, sugere-se que este aumento da susceptibilidade à infecção pelo vírus influenza durante a gravidez é causado pela redução da resposta imune, particularmente durante o 3º trimestre de gestação (Chavant et al., 2013). Baseado nisso, ambas as vacinas, pandêmica ou sazonal para a gripe, são recomendadas internacionalmente para mulheres grávidas, independentemente da presença de condições de risco à saúde pré-existentes. Entretanto, embora a vacinação de gestantes tenha sido recomendada desde 2005 pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005; 2014), a utilização desta permanece limitada, em função das preocupações sobre seu potencial efeito no

desenvolvimento do feto e possíveis ações teratogênicas (Bednarczyk et al., 2012).

McMillan e colaboradores (2015) afirmam que as mulheres grávidas são uma população única devido às mudanças imunológicas e fisiológicas que ocorrem durante essa fase. Em particular, as alterações imunológicas, como a ativação de citocinas pró-inflamatórias, podem resultar em reações de reatogenicidade pela vacina contra influenza e, assim, o risco de dano ao feto torna-se uma grande preocupação. Para avaliar a segurança da vacina no desenvolvimento fetal, alguns parâmetros como o aborto espontâneo, a morte fetal, o parto prematuro, o peso do feto para a idade gestacional, a informação congênita e o baixo peso ao nascer da criança são avaliados. Associado a isso, a resposta inflamatória que pode estar relacionada aos efeitos adversos para o feto durante a infecção da gripe é uma consideração importante para a segurança da vacina contra influenza, especialmente na fase da embriogênese e no 1º trimestre de gestação quando o feto está mais exposto aos riscos (Ruedy, 1984; McCarthy et al., 2012).

Desta forma, McMillan et al. (2015) concluíram que a vacinação materna contra a gripe não está associada a um risco aumentado de morte fetal, aborto espontâneo ou malformações congênitas. Conclusão semelhante à de McMillan et al. (2015) foi sugerida por Fabiani et al. (2015) em seu estudo, o qual também não verificou efeitos adversos em fetos, cujas as mães receberam vacina contra influenza durante o 2º e 3º trimestre de gestação. Por conseguinte, ambas as revisões enfatizam que não é possível excluir totalmente o risco de danos ao feto, devido à imprecisão estatística, o desenho observacional e a heterogeneidade clínica e metodológica destas pesquisas. Portanto, estudos que investiguem principalmente mulheres vacinadas durante o 1º trimestre de gravidez deve ser uma prioridade, a fim de permitir estimativas mais precisas e conclusivas quanto à segurança fetal.

Neste sentido, poucas evidências pré-clínicas têm observado os possíveis efeitos na prole jovem-adulta, da vacinação contra influenza A na fase gestacional. Xia et al. (2014a) realizou dois estudos, sendo que primeiramente avaliou a influência da vacinação contra gripe (H1N1) no início da gestação, em especial, na neurogênese hipocampal e na memória espacial dos animais gestantes. Neste estudo verificou que a vacinação, no 1º trimestre de gravidez, contribuiu para a neurogênese hipocampal e melhorou a memória de trabalho nas gestantes (camundongos C57BL/6J fêmeas). Em seu segundo estudo, Xia et al. (2014b), observou uma resposta imune protetora na neurogênese e no

comportamento da prole adulta destas fêmeas que foram vacinadas durante a gestação, sugerindo que os possíveis mecanismos de mediação do desenvolvimento do cérebro pós-natal podem ter sido influenciados por alterações nos níveis de citocinas e fatores de crescimento.

Diante de tudo, assim como os medicamentos são raramente testados para teratogenicidade em ensaios clínicos controlados, para a vacina contra influenza essa realidade também é predominante. Sabe-se que evidências de segurança são muitas vezes derivadas de estudos epidemiológicos, pequenos estudos descritivos, relato de casos individuais e poucas pesquisas pré-clínicas, o que pode causar preocupações quanto à qualidade das provas disponíveis sobre as recomendações para a prática clínica (Ruedy, 1984; McMillan et al., 2015). Devido à necessidade de pesquisas que assegurem os efeitos da vacinação contra influenza A durante a fase gestacional e o não comprometimento do desenvolvimento cérebro-fetal, estudos pré-clínicos se tornam essenciais. Mediante isso e, sendo a polyI: C capaz de induzir ativação pré-natal em roedores, a realização deste trabalho tem relevância, uma vez que ilustra os efeitos da AIM, bem como da vacina contra influenza A durante a gestação em parâmetros comportamentais e neuroquímicos na prole adulta de ratas Wistar, trazendo consideráveis achados para a ciência e a prática clínica.

1.3 NEUROTROFINAS

Sabe-se que durante a vida fetal ocorre o chamado período crítico do desenvolvimento, época de fragilidade na qual se desenvolvem os tecidos e os órgãos, em especial o cérebro (Widdowson e McCance, 1975). A neurogênese, crescimento dos neurônios, existe em toda a área cerebral no decorrer dessa fase, predominantemente no GD hipocampal e no BO. Assim, a evolução do hipocampo, por sua vez, influencia diretamente o aprendizado e a memória (Van Praag et al., 2002; Ziv e Schwartz, 2008) e pode ser regulado por diversos fatores, incluindo citocinas, fatores de crescimento e de transcrição (Balu e Lucki, 2009).

Adicionalmente, para que os neurônios cresçam e tenham um desenvolvimento funcional, faz-se necessário a presença de moléculas que estimulem e permitam este processo, sendo essas denominadas neurotrofinas (NTs). Na ausência dos fatores neurotróficos, as células neurais têm suas comunicações sinápticas e metabolismo diminuído (Lessmann et al., 2003). De fato, as NTs estão envolvidas na regeneração dos neurônios (Ip et al., 1993; Winter et al., 1995), na regulação da atividade das sinapses (Altar et al., 1997; Bartrup et al.,

1997) e, deste modo, mantêm a plasticidade cerebral (Prakash et al., 1996; Thoenen, 1996).

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o fator de crescimento nervoso (GNF), a neurotrofina 3 (NT-3) e a neurotrofina 4 (NT-4) são consideradas NTs devido à origem gênica comum (Lessmann et al., 2003; Hallbook et al., 1991). Tanto na vida pré-natal quanto na vida adulta, os receptores das NTs são expressos no SNC e sistema nervoso periférico (SNP) (Muragaki et al., 1995). Assim, tais moléculas estão inclusas em um grupo mais amplo e são conhecidas como fatores neurotróficos, o qual engloba também o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (Chao, 2003) e algumas citocinas: fator neurotrófico ciliar (CNTF); fator inibidor de leucemia (LIF) e oncostatina M (OSM) (Horton et al., 1996).

O desenvolvimento adequado da placenta é essencial durante a gravidez, uma vez que essa constitui a interface entre as circulações materno-fetal, sendo fundamental para a nutrição e oxigenação do feto. Diante disso, as NTs (NGF, BDNF, NT-3 e NT-4) são moléculas naturais que regulam o desenvolvimento da placenta e do cérebro. O BDNF e NGF também estão envolvidos na regulação da angiogênese, desempenhando importante papel no desenvolvimento, regulação e manutenção das funções do SNC e SNP (Dhobale, 2014). Desse modo, alterações nos níveis de NTs podem produzir efeitos duradouros sobre processos neurotróficos (número de neurônios e sinapses) que influenciam a maturação neuronal e a plasticidade na vida tardia (Vicario-Abejón et al., 2002). Com base nisso, a sinalização intracelular do BDNF e seu receptor tirosina quinase (TrkB) é essencial para a sobrevivência neuronal, plasticidade e morfogênese (Numakawa et al., 2010). Já o NGF tem sido associado com a atividade funcional das células que inclui os sistemas imune e endócrino e atua como um mediador inflamatório (Berry et al., 2012).

A produção das NTs inicia-se por moléculas precursoras denominadas pró-NTs, as quais serão quebradas e transformadas em proteínas não covalentes diméricas (Chao, 2003) que se ligarão aos receptores da família Trk (Dechant et al., 1994). Assim, a via de sinalização prossegue com a ativação do processo de dimerização, fosforilação das frações de tirosina e ativação de sítios da quinase. Tais ações iniciam um processo de seleção proteica específica culminando na modificação da expressão gênica e síntese de proteínas (Poo, 2001).

É sabido que fatores estressores durante a gestação, como a presença de infecções, aumenta o risco de parto prematuro, pode

comprometer o neurodesenvolvimento do feto e predispor o aparecimento de doenças neurológicas e transtornos psiquiátricos na prole (Dammann et al., 2002). Além disso, ativadores imunológicos e inflamatórios, tais como PolyI: C e LPS, ativam a microglia no SNC, induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e radicais livres, os quais são conhecidos por causar degeneração neuronal, anormalidades na substância branca e diminuição da neurogênese. Estas interações neurônio-microglia podem, inclusive, ser um dos fatores importantes envolvidos na fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia (Figura 2) (Monji et al., 2009).

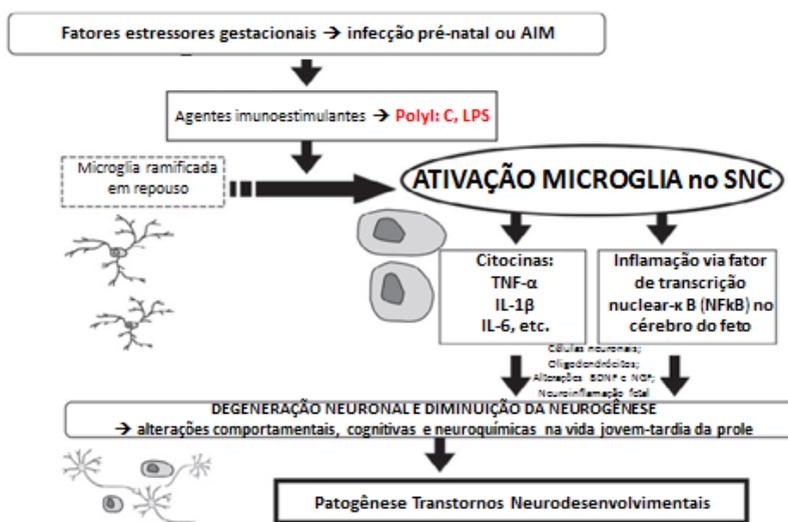


Figura 2: Hipótese da ativação da microglia na patogênese de transtornos neurodesenvolvimentais: Condições estressoras durante a fase gestacional podem ser induzidas por ativadores imunológicos / inflamatórios tais como PolyI:C e LPS, ativando a microglia no SNC. A microglia ativada libera citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α), além de radicais livres, e ativam ainda fatores de transcrição inflamatórios como NFK-B. Estes mediadores desencadeiam degeneração neuronal, anormalidades da substância branca, perda de células precursoras de oligodendrócitos, hipomielinização, neuroinflamação no feto e diminuição da neurogênese, o que interfere no comportamento, cognição e em parâmetros neuroquímicos, como nos níveis de NTs, na vida jovem-tardia da prole. Essas interações neurônio-microglia podem ser um dos fatores importantes na fisiopatologia da esquizofrenia e de outros transtornos neurodesenvolvimentais. LPS, lipopolissacarídeo; SNC, sistema nervoso central; IL, interleucina; TNF- α , fator de necrose tumoral; NfκB, fator

de transcrição nuclear- κ B; NTs, neurotrofinas. Fonte: Adaptado de Monji et al., 2009.

Baseado nisso, as NTs têm seu papel cada vez mais estudado em pesquisas relacionadas a estes transtornos. Ademais, já está bem descrito a interação entre fatores genéticos e ambientais na fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos e, por conseguinte, as NTs também se encontram envolvidas, seja com sua síntese e / ou sua liberação alterada (Shintani, 1999). Neste contexto, dados conflitantes vêm sendo encontrados nos últimos anos. Enquanto Durany et al. (2001) verificaram, em tecidos post-mortem de pacientes esquizofrênicos, um decréscimo significativo dos níveis de BDNF em áreas hipocâmpais e corticais, Takahashi et al. (2000) relataram um aumento dessa NT no córtex cingulado anterior e hipocampo. Estudos pioneiros, no entanto, também concluíram que houve uma redução significativa na atividade de BDNF (Toyooka et al., 2002) e NGF (Perez-Polo et al., 1978) em indivíduos esquizofrênicos.

Diante de tudo, investigar o efeito da AIM, bem como da vacina contra influenza A durante a gestação na prole adulta de ratas Wistar tem uma ação primordial para a clínica, visto que ainda há carência de estudos e, também, pelo fato de que ambas podem interferir diretamente no neurodesenvolvimento e, conseqüentemente, alterar padrões comportamentais e neuroquímicos na vida tardia da prole.

2 OBJETIVOS

2.1 2.1 GERAL

Avaliar os parâmetros comportamentais e neuroquímicos na prole adulta de ratas Wistar submetidas à vacinação contra influenza A (H1N1) e comparar esses parâmetros na prole de ratas induzidas à infecção com PolyI: C durante a fase gestacional, considerando o gênero: ratos machos e fêmeas.

2.2 2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar parâmetros comportamentais de déficit olfatório, ansiedade, atividade locomotora e depressão (anedonia) na prole adulta de ratas Wistar submetidas à vacinação contra influenza A (H1N1) e comparar esses parâmetros na prole de ratas induzidas à infecção com PolyI: C durante a gestação, considerando o gênero: ratos machos e fêmeas;

Avaliar os níveis de BDNF e NGF nas estruturas cerebrais, córtex frontal, hipocampo, estriado e BO, na prole adulta de ratas Wistar submetidas à vacinação contra influenza A (H1N1) e comparar esses parâmetros na prole de ratas induzidas à infecção com PolyI: C durante a gestação, considerando o gênero: ratos machos e fêmeas.

3 METODOLOGIA

3.1 ASPÉCTOS ÉTICOS

Este estudo caracteriza-se como experimental, utilizando um modelo animal. Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob o protocolo 038/2016-1 (Anexo). Os procedimentos foram executados de acordo com o Instituto Nacional de Guia de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) projetado para minimizar o sofrimento e limitar o número de animais utilizados.

3.2 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para desenvolver este trabalho, utilizaram-se 36 ratas Wistar adultas, pesando entre 250g a 300g, as quais passaram por uma única noite de acasalamento. Os animais foram obtidos do Biotério da Universidade e mantidos em gaiolas em ciclos de 12h dia-noite, com alimentação e água disponível e temperatura controlada entre $22 \pm 1^\circ \text{C}$. Cada fêmea foi mantida na mesma caixa com um macho durante um ciclo de 12h. A manhã do dia seguinte representou o dia zero de gestação, sendo que todas as ratas foram consideradas como grávidas, devido a falta de um método para tal diagnóstico. Assim, as ratas foram divididas em três grupos:

- Grupo de ratas prenhas denominado grupo controle (n = 12);
- Grupo de ratas prenhas denominado grupo H1N1(n = 12);
- Grupo de ratas prenhas denominado grupo PolyI: C (n = 12).

Em seguida à fase gestacional, os filhotes foram mantidos junto à mãe para a amamentação. Vinte e um dias após o nascimento, os mesmos foram submetidos ao desmame e à sexagem, sendo separados em **machos e fêmeas**, conforme o **tratamento materno** (Tabela 1). Nesta pesquisa, a prole de ambos os gêneros foi utilizada, a fim de verificar se o efeito do tratamento materno poderia levar a diferentes respostas nestes animais, considerando-se o gênero dos animais, um fator importante.

Tabela 1: Apresentação do número de filhotes adultos, machos e fêmeas distribuídos por grupo, de acordo com o tratamento materno.

| Tratamento Materno | Número (n) machos adultos | Número (n) fêmeas adultas |
|---------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Grupo controle | n = 11 | n = 9 |
| Grupo H1N1 | n = 11 | n = 9 |
| Grupo PolyI: C | n = 10 | n = 16 |
| Total | n = 32 | n = 34 |

Fonte: Dados da pesquisadora, 2016.

Após a amamentação, as mães anteriormente expostas aos procedimentos, foram submetidas à eutanásia por decapitação pelo biotério da Universidade.

Ao completar 53 dias de idade, que corresponde à idade adulta, a prole (machos) foi primeiramente submetida aos testes comportamentais: discriminação olfatória, labirinto em cruz elevada, atividade locomotora e splash teste. Já as fêmeas foram utilizadas a partir do 55º dia de vida, sendo submetidas aos mesmos testes comportamentais. Utilizou-se um número variado de prole adulta para a realização dos comportamentos, o qual oscilou entre 9-16 animais por grupo, variando de acordo com o tratamento materno e o número de filhotes nascidos por mãe (Tabela 1). Estes testes foram realizados em quatro dias, sendo dois dias para machos e dois dias para as fêmeas. Assim, as análises comportamentais foram divididas do seguinte modo: período matutino e período vespertino para melhor desenvolvimento do estudo, conforme apresentado na Figura 3.

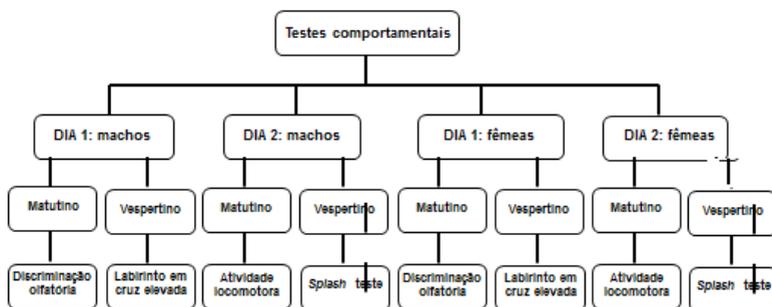


Figura 3: Divisão da prole adulta para realização dos testes comportamentais. Fonte: dados da pesquisadora, 2016.

Todos os mesmos animais, machos e fêmeas adultos, foram expostos aos quatro testes comportamentais, pois não houve nenhum fator estressor que impossibilitasse tal realização. O desenho experimental mostrado acima, assim como a escala de utilização dos animais (machos e fêmeas) nos comportamentos foi deste modo distribuído para melhor organização do experimento.

Imediatamente após estes testes, os animais foram decapitados e suas estruturas cerebrais (córtex frontal, hipocampo, estriado e BO) dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer - 80C° para posteriores análises bioquímicas das NTs: níveis cerebrais de BDNF e NGF. Para tais análises, utilizaram-se 6 animais por grupo (n = 6). Abaixo segue o desenho experimental do estudo (Figura 4).

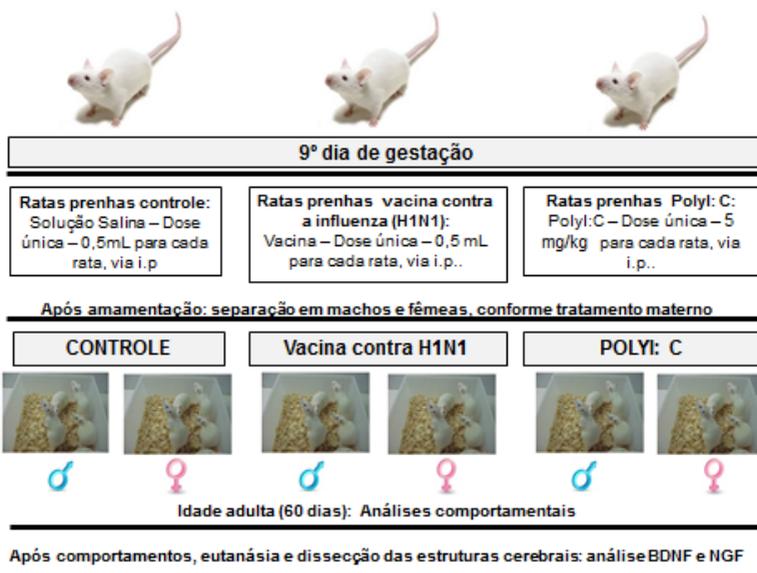


Figura 4: Desenho experimental do estudo. Fonte: dados da pesquisadora, 2016.

Após a decapitação, os animais foram descartados e acondicionados em saco branco leitoso e conduzidos para o freezer (conservação) na Universidade. Posteriormente, foram coletados e transportados por empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e em seguida encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Procedimentos realizados conforme RDC nº 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

3.3 ADMINISTRAÇÃO DE SALINA, VACINA CONTRA INFLUENZA A (H1N1) E POLYL: C NAS RATAS GESTANTES

As ratas gestantes foram divididas em três grupos: **controle, H1N1 e PolyI: C** conforme apresentado acima. No 9º dia de gestação, o qual equivale ao 1º trimestre de gravidez em humanos, as ratas de cada grupo foram submetidas, uma única vez, ao seu tratamento específico.

No grupo controle foi aplicada uma solução salina estéril (Cloreto de sódio – NaCl, 0,9%) na dose única de 0,5 mL por animal, via intraperitoneal (i.p.);

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

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

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 Discriminação olfatória

A discriminação olfatória avalia a capacidade dos roedores em diferenciar odores e, assim, o déficit olfatório do animal. O teste foi realizado conforme previamente descrito por Soffié e Lamberty (1988) e, posteriormente, modificado por Prediger et al. (2005a,b). Os animais foram mantidos em grupo por 48 horas na sua caixa habitual (42 x 34 x 17 cm), sem que ocorresse a troca da maravalha (serragem da sua própria caixa), a fim de que houvesse uma padronização da impregnação do odor deste ambiente, considerado este o ambiente familiar (habitual) para os animais. A caixa de discriminação olfatória consiste em dois compartimentos (ambientes) idênticos (30 x 30 x 20 cm) separados por uma porta aberta que permite o acesso dos animais para os dois compartimentos. O chão de um dos ambientes foi forrado com a maravalha retirada da gaiola, na qual o animal permaneceu por 48 horas (ambiente familiar ou habitual). Já o outro compartimento foi forrado com uma serragem limpa e inodora, sendo considerado o ambiente não familiar (ambiente novo) para o animal. O experimento consistiu em colocar o rato na caixa de discriminação olfatória e registrar durante um período de 5 minutos, o tempo que o animal gastou investigando cada um dos compartimentos. Segundo Prediger et al. (2005a,b) os animais são capazes de distinguir o odor do compartimento familiar e não familiar, sendo geralmente comum gastarem mais tempo no ambiente familiar, uma vez que preferem seu próprio odor. Todavia, sabe-se que os roedores são animais de caráter exploratório, assim, a exploração do ambiente não familiar também pode ser considerado um comportamento padrão dos animais. Em contrapartida, o tempo de permanência

semelhante em ambos os ambientes familiar e não familiar está associado ao prejuízo no déficit olfatório, visto que neste caso, os animais não optam por permanecer mais tempo em um dos dois compartimentos.

3.4.2 Labirinto em cruz elevada (*Elevated Plus-Maze*)

O nível de ansiedade dos animais foi avaliado por meio do labirinto em cruz elevada (*Elevated Plus-Maze*). Este labirinto consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm) dispostos de forma perpendicular formando uma plataforma central (5 x 5 cm), com 50 cm de altura do chão. Os experimentos foram conduzidos em sala escura com luz vermelha posicionada a 30 cm de altura da plataforma central do aparelho. Os parâmetros avaliados foram o tempo de permanência no braço aberto ou no braço fechado (Pellow et al., 1985; Rodgers e Cole, 1994).

3.4.3 Atividade locomotora

Este teste consiste em avaliar a distância percorrida pelos animais. A análise da atividade locomotora foi realizada em uma caixa com 50 x 25 x 50 cm de dimensão. Os animais foram submetidos individualmente à exploração durante o período de 15 minutos e a atividade locomotora foi avaliada automaticamente através do uso de uma caixa de atividade locomotora (Insight equipamentos para laboratório, Ribeirão Preto, SP). Esta monitorada através da distância percorrida (cm) pelo animal, dividindo o tempo total de avaliação blocos de 5 minutos (De Oliveira et al., 2009; Canever et al., 2010).

3.4.4 *Splash* teste

O splash teste tem por finalidade avaliar o comportamento anedônico dos animais. Este teste foi realizado no período vespertino, após a atividade locomotora. Os animais foram colocados individualmente no campo aberto (*open field*) e o tempo gasto pelo animal com seu autocuidado, tais como o tempo gasto em lambidas (*grooming*) e o número de lambidas, foi cronometrado por um período de 5 minutos. Estes parâmetros representam um índice de autocuidado (*grooming*) e comportamentos motivacionais, considerados comparáveis a alguns sintomas depressivos, como o comportamento anedônico (Willner, 2005). Para isso, foi esguichada uma solução de sacarose a 10% sobre o dorso do rato, macho ou fêmea, antes de colocá-lo no campo aberto. A solução de sacarose foi levemente esguichada e espalhada manualmente pelo dorso, para que o animal não respingasse

nas paredes ao se sacudir, enquanto estivesse dentro do campo aberto (Willner, 2005; Rosa et al., 2014). Depois de aplicar a solução de sacarose, o tempo total gasto em lambidas, bem como a quantidade de lambidas foi registrado. Foram consideradas lambidas em todas as partes do animal, inclusive nas patas.

3.5 ANÁLISES NEUROQUÍMICAS

3.5.1 Níveis BDNF e NGF

Os níveis de BDNF e NGF foram avaliados no córtex frontal, hipocampo, estriado, BO e medidos por ensaio imunoenzimático, utilizando-se kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante (NGF e BDNF, R&D Systems, Inc. – USA). Resumidamente, as estruturas cerebrais foram homogeneizadas em tampão fosfato (PBS) com 1 mM de flúor fenilmetilsulfonil (PMSF) e etileno glicol 1mM bis (2-aminoetil éter)-N, N, N'N' ácido tetraacético (EGTA). Placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram revestidas por 24h com o anticorpo de captura. No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes com o reagente de lavagem (wash buffer) e, após, adicionado o reagente diluente por 1h. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e, em seguida, foram adicionadas as amostras e o padrão para realização da curva por 2h. As placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos de detecção (anti-BDNF e anti-NGF) por 2h em temperatura ambiente. Após a lavagem, adicionou-se a estreptavidina por 20 minutos, evitando-se o contato com a luz. Novamente, as placas foram lavadas e foi adicionada a solução de substrato por mais 20 minutos, sendo que as placas foram guardadas no escuro. Após 20 minutos adicionou-se a solução de parada e finalmente foi realizada a leitura das placas em 450nm. A proteína total foi medida pelo método de Lowry (1951) usando soro albumina bovina como padrão.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os testes comportamentais, exceto de discriminação olfatória, assim como os níveis de NTs, para machos e fêmeas, foram avaliadas separadamente através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo post hoc Tukey. Já os efeitos, gênero (machos e fêmeas), tratamento materno (salina, vacina H1N1 e PolyI: C) e a interação entre gênero e tratamento materno para todos os parâmetros deste estudo foram analisados por meio de ANOVA de duas vias. Quando houve

interação entre as variáveis, gênero e tratamento materno, e quando os valores de F foram significativos, comparações post hoc foram feitas por *Tukey*.

Para analisar os resultados do parâmetro comportamental, discriminação olfatória, utilizou-se o teste t de Student's, a fim de comparar o tempo gasto pelos animais do mesmo gênero no ambiente familiar e no ambiente não familiar. Ainda, para o teste labirinto em cruz elevada, também foi utilizado o teste t de Student's para comparar as variáveis (tempo de permanência no braço aberto e braço fechado) dos animais do mesmo gênero, conforme os grupos analisados.

Os dados foram expressos como média (\pm) e erro padrão da média (média \pm E.P.M). A significância estatística foi considerada para valores de $p \leq 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas através do programa Statistica versão 8.0 e utilizou-se o programa GraphPad Prism 5 para a elaboração dos gráficos.

4. RESULTADO

4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.1.1 Discriminação olfatória

A Figura 5A e 5B representa os parâmetros avaliados no teste de discriminação olfatória (tempo gasto no compartimento ou ambiente familiar e não familiar) pelos ratos machos e fêmeas adultos, respectivamente, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 e PolyI:C durante a gestação. Na figura 5A, de acordo com o teste t Student, pode-se verificar que houve diferença significativa entre o tempo gasto no ambiente familiar e não familiar [$t(1,30) = - 91,61$ $p \leq 0,01$] para os animais machos. Ainda, observou-se que os ratos machos do grupo controle [$t(1,10) = - 131,45$ $p \leq 0,01$] e do grupo H1N1 [$t(1,10) = - 81,27$ $p \leq 0,01$] gastaram mais tempo no ambiente não familiar do que no ambiente familiar, o que demonstra um comportamento padrão (exploratório) de roedores. É importante salientar que a permanência por um maior tempo no ambiente familiar também pode ser considerado um comportamento normal para os animais, os quais podem preferir o ambiente do seu próprio odor. Em contraste, no grupo PolyI: C [$t(1,9) = - 55,55$ $p = 0,16$] a diferença do tempo gasto no ambiente familiar e não familiar não foi significativa, o que indica que estes animais exploraram ambos os ambientes por um tempo semelhante. Este achado aponta um provável déficit olfatório nos ratos machos PolyI: C, visto que não permaneceram por mais tempo em um dos ambientes, gastando um tempo similar em ambos os compartimentos.

Para as ratas fêmeas, figura 5B, o teste t Student revelou que não houve diferença significativa para o tempo gasto no ambiente familiar e não familiar [$t(1,35) = 17,08$ $p = 0,20$], exceto para as ratas fêmeas do grupo H1N1 [$t(1,9) = 64,44$ $p \leq 0,05$], as quais permaneceram um tempo mais significativo no ambiente familiar quando comparado ao ambiente não familiar. Nos grupos controle [$t(1,9) = - 10,22$ $p = 0,65$] e PolyI: C [$t(1,17) = 6,47$ $p = 0,74$] não houve diferença significativa para o tempo de permanência no ambiente familiar e não familiar, achado que sugere um possível prejuízo olfatório nestes animais, visto que permaneceram um tempo semelhante em ambos os ambientes, demonstrando um caráter exploratório similar para os dois compartimentos.

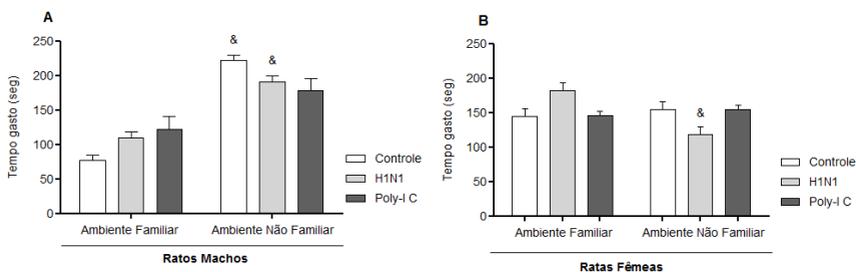


Figura 5: A figura 5A (ratos machos) e 5B (ratos fêmeas) representa os parâmetros avaliados no teste de discriminação olfatória (tempo gasto no compartimento ou ambiente familiar e não familiar) na prole adulta cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 e PolyI: C durante a gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$, $n=8-10$. & diferente do seu respectivo grupo, comparando o ambiente familiar e não familiar nos animais do mesmo gênero, conforme teste t Student. Fonte: dados da autora, 2016.

Para avaliar os efeitos, gênero (machos e fêmeas), tratamento materno (salina, vacina H1N1 e PolyI: C), e a interação entre gênero e tratamento materno nos parâmetros do teste de discriminação olfatória (tempo gasto no ambiente familiar e não familiar), ANOVA de duas vias foi utilizada, sendo os resultados apresentados na figura 6A (ambiente familiar) e 6B (ambiente não familiar). Assim, ANOVA de duas vias revelou interação significativa entre as seguintes variáveis: gênero e tratamento materno [$F(2,42) = 3,90$, $p \leq 0,05$], para ambos os parâmetros comportamentais analisados. As figuras 6A e 6B apontam que as ratas fêmeas pertencentes aos grupos controle ($p \leq 0,01$) e H1N1 ($p \leq 0,01$) permaneceram mais tempo no ambiente familiar, e conseqüentemente, menos tempo no ambiente não familiar quando comparado aos seus respectivos grupos machos. Este achado sugere que as fêmeas, cujas mães receberam salina (controle) e vacina H1N1 na gestação apresentaram um comportamento olfatório padrão de roedores. Já os ratos machos destes grupos gastaram mais tempo no ambiente não familiar, o que também indica um comportamento normal dos animais. Em contraste, no grupo PolyI: C ($p=0,81$) não houve diferença significativa quanto ao gênero para o tempo de permanência no ambiente familiar e não familiar, o que reflete que tanto os ratos machos como as fêmeas do grupo PolyI: C permaneceram o mesmo tempo em ambos os ambientes demonstrando, assim, um provável déficit olfatório.

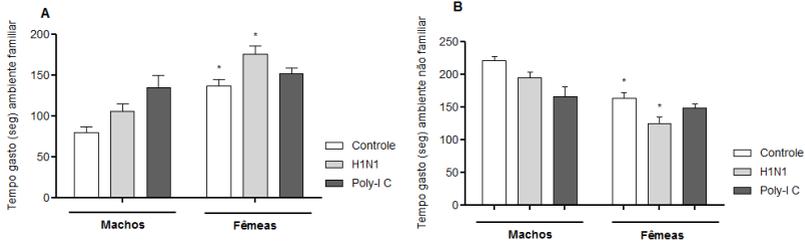


Figura 6: A figura 6A (ambiente familiar) e 6B (ambiente não familiar) representa separadamente por ambiente, a interação entre gênero (machos e fêmeas) e tratamento materno (salina, vacina H1N1 e PolyI: C) na prole adulta. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$, $n=8-10$. * diferente do seu respectivo grupo, comparando machos e fêmeas, no mesmo parâmetro comportamental, segundo ANOVA de duas vias. Fonte: dados da autora, 2016.

4.1.2 Labirinto em cruz elevada (*Elevated plus maze*)

A Figura 7A e 7B representa os parâmetros comportamentais, tempo gasto pelos animais no braço aberto e no braço fechado, avaliados no teste labirinto em cruz elevada (*Elevated plus maze*) na prole (machos e fêmeas) adulta, respectivamente, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 e PolyI:C durante a gestação. Na figura 7A, ANOVA de uma via não demonstrou diferença significativa entre os ratos machos dos grupos controle, H1N1 e PolyI: C para o tempo gasto no braço aberto [$F(2,24) = 0,37$, $p=0,69$], bem como não houve diferença entre os grupos no tempo de permanência no braço fechado [$F(2,24) = 0,65$, $p=0,53$]. Por conseguinte, através do teste t, pode-se perceber uma diferença significativa entre o tempo gasto pelos ratos machos no braço aberto e fechado, uma vez que os animais dos três grupos avaliados ($p \leq 0,01$) permaneceram um maior tempo no braço fechado em relação ao braço aberto, sendo cada grupo comparado ao seu respectivo controle do mesmo gênero. Tal achado indica um comportamento padrão de roedores, devido à preferência por um ambiente fechado e seguro (braço fechado), não demonstrando comportamento ansiogênico.

Resultado semelhante foi encontrado nas ratas fêmeas (Figura 7B). ANOVA de uma via apontou que não houve diferença significativa entre as ratas dos três grupos avaliados, tanto para o tempo gasto no braço aberto [$F(2,25) = 0,98$, $p=0,38$], como para o tempo de

permanência no braço fechado [$F(2,25) = 0,82$, $p=0,45$]. Observou-se por meio do teste t, uma diferença significativa entre o tempo gasto pelas ratas fêmeas no braço aberto e fechado, uma vez que os animais dos grupos controle, H1N1 e PolyI: C ($p \leq 0,01$) permaneceram um maior tempo no braço fechado quando comparado ao braço aberto. Em geral, assim como os ratos machos, as fêmeas também demonstraram um comportamento padrão de roedores, uma vez que permaneceram mais tempo no braço fechado. Em resumo, estes resultados indicam um comportamento normal dos animais avaliados, independentemente do gênero, visto que ambas as proles do grupo H1N1 e PolyI: C se comportaram do mesmo modo que a prole controle, não demonstrando um comportamento ansiogênico.

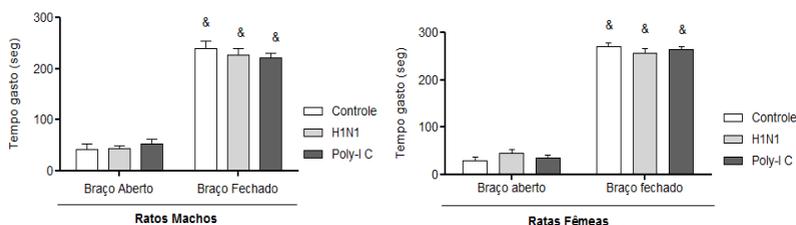


Figura 7: A figura 7A (ratos machos) e 7B (ratas fêmeas) representa os parâmetros comportamentais (tempo gasto pelos animais no braço aberto e fechado) avaliados no teste labirinto em cruz elevada (Eleveted plus maze) na prole adulta cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 e PolyI:C durante a gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,01$, $n=8-10$. & diferente do seu respectivo grupo, comparando o braço aberto e o braço fechado nos animais do mesmo gênero, conforme teste t Student. Fonte: dados da autora, 2016.

4.1.3 Atividade locomotora

A Figura 8 apresenta a distância percorrida pela prole de machos (Figura 8A) e fêmeas (Figura 8B) adulta, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 e PolyI:C durante a gestação. Na Figura 8A, ANOVA de uma via demonstrou que houve diferença significativa entre os animais machos neste parâmetro comportamental [$F(2,21) = 5,58$, $p \leq 0,05$]. Foi observado uma hiperlocomção nos animais do grupo PolyI: C ($p \leq 0,01$) em relação ao grupo controle. Em

contrapartida, nas ratas fêmeas (Figura 8B), ANOVA de uma via não revelou diferença estatística [$F(2,22) = 2,37, p=0,12$] entre os grupos analisados.

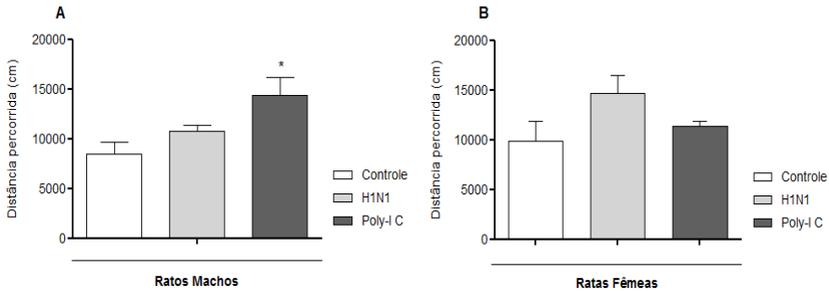


Figura 8: A figura 8A (ratos machos) e 8B (ratas fêmeas) representa a distância percorrida pela prole adulta cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 e PolyI:C durante a gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$, $n=8-9$. * diferente do grupo controle, segundo ANOVA de uma via; Fonte: dados da autora, 2016.

Para avaliar os efeitos, gênero (machos e fêmeas), tratamento materno (salina, vacina H1N1 e PolyI: C), e a interação entre gênero e tratamento materno no teste comportamental atividade locomotora, utilizou-se ANOVA de duas vias, sendo os resultados apresentados na figura 9. Observou-se que ANOVA de duas vias não apontou interação significativa entre tais variáveis, [$F(2,43) = 3,02, p=0,06$], neste teste para os animais de ambos os gêneros. Este achado sugere, ao comparar ratos machos e fêmeas, cada qual de acordo com seu respectivo grupo, que nenhuma diferença foi observada na distância percorrida entre o gênero dos animais.

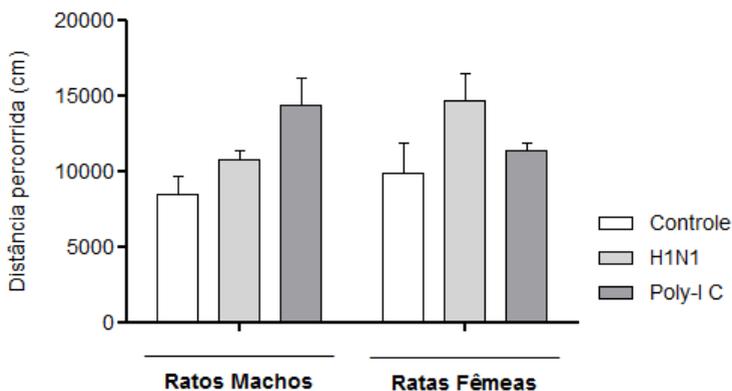


Figura 9: A figura 9 representa a interação entre gênero (machos e fêmeas) e tratamento materno (salina, vacina H1N1 e PolyI: C) na prole adulta, segundo ANOVA de duas vias. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$, $n=8-10$. Fonte: dados da autora, 2016.

4.1.4 *Splash* teste

A Figura 10 apresenta os resultados comportamentais do splash teste nos ratos machos em dois parâmetros, tempo total de limpeza (Figura 10A) e quantidade de lambidas (Figura 10B), os quais indicam um índice de autocuidado (grooming) dos animais e podem ser comparados a sintomas depressivos, como o comportamento anedônico. Na figura 10A, ANOVA de uma via revelou que houve diferença significativa entre os ratos machos para o tempo total de limpeza [$F(2,24) = 5,09$, $p \leq 0,05$]. Verificou-se que os animais do grupo H1N1 ($p \leq 0,05$) e PolyI: C ($p \leq 0,05$) apresentaram um menor tempo de limpeza quando comparados ao grupo controle. Esse achado pode indicar um comportamento tipo-depressivo tanto na prole cujas mães receberam a vacina H1N1 na gestação como na prole em que as mães sofreram uma AIM, visto que estes ratos machos não demonstraram preocupação com seu autocuidado. Quanto ao número de lambidas (Figura 10B), ANOVA de uma via não apontou diferença estatística entre os grupos nos machos [$F(2,24) = 1,61$, $p=0,22$].

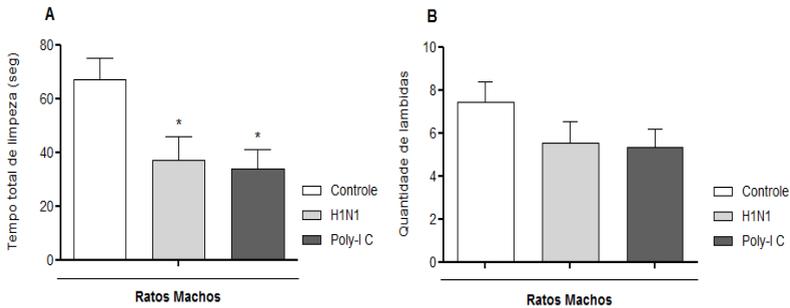


Figura 10: A figura 10 representa o teste comportamental splash teste nos ratos machos em dois parâmetros, os quais indicam um índice de autocuidado (grooming) dos animais. Figura 10A apresenta o tempo total de limpeza e figura 10B o número ou quantidade de lambidas realizadas pela prole de machos cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 e PolyI:C durante a gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$, $n=9$. * diferente do grupo controle, segundo Anova de uma via. Fonte: dados da autora, 2016.

A Figura 11 apresenta os resultados comportamentais do splash teste, porém nas ratas fêmeas, nos mesmos parâmetros apresentados anteriormente: tempo total de limpeza (Figura 11A) e quantidade de lambidas (Figura 11B) nas fêmeas adultas cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 e PolyI:C durante a gestação. Os resultados indicam, conforme ANOVA de uma via, que não houve diferença significativa entre as fêmeas para o tempo total de limpeza [$F(2,23) = 1,06$, $p=0,36$] e para o número de lambidas [$F(2,23) = 0,98$, $p=0,39$].

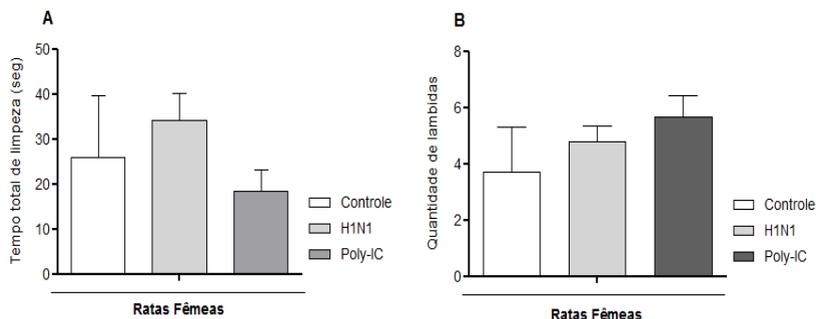


Figura 11: A figura 11 representa o teste comportamental *splash* teste nas ratas fêmeas em dois parâmetros, os quais indicam um índice de autocuidado (*grooming*) dos animais. Figura 11A apresenta o tempo total de limpeza e figura 11B o número ou quantidade de lambidas realizadas pela prole de ratas fêmeas cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 e PolyI: C durante a gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$, $n=8-10$. Fonte: dados da autora, 2016.

A fim de avaliar os efeitos, gênero (machos e fêmeas), tratamento materno (salina, vacina H1N1 e PolyI: C), e a interação entre gênero e tratamento materno para o *splast* teste, ANOVA de duas vias foi utilizada, sendo os resultados apresentados na Figura 12. ANOVA de duas vias revelou interação significativa entre tais variáveis, $[F(2,41) = 3,35, p \leq 0,05]$, para o tempo total de limpeza dos animais. Foi verificado que as ratas fêmeas pertencentes ao grupo controle ($p \leq 0,05$) apresentaram menor tempo total de limpeza em relação ao grupo controle dos ratos machos. Isso sugere um comportamento tipo-depressivo (anedônico), visto que demonstraram menor preocupação com seu autocuidado.

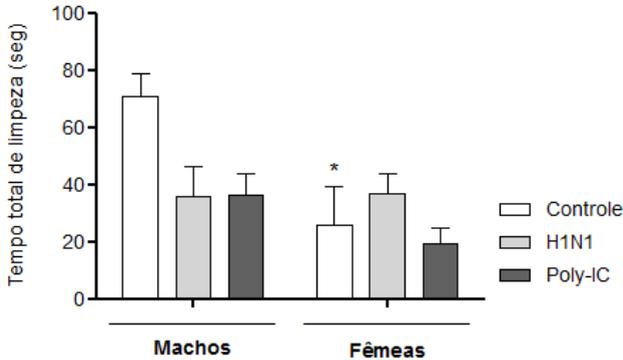


Figura 12: A figura 12 representa a interação entre gênero (machos e fêmeas) e tratamento materno (salina, vacina H1N1 e PolyI: C) na prole adulta. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$, $n=8-10$. * diferente do seu respectivo grupo, comparando machos e fêmeas, para o tempo total de limpeza, segundo Anova de duas vias. Fonte: dados da autora, 2016.

4.2 ANÁLISES NEUROQUÍMICAS

4.2.1 Níveis cerebrais de BDNF e NGF

A figura 13 representa os níveis cerebrais de BDNF (Figura 13A) e NGF (Figura 13B) na prole de machos adulta cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 e PolyI: C durante a gestação. De acordo com as figuras abaixo, ANOVA de uma via demonstrou que houve diferença significativa entre os grupos de ratos machos, nos níveis de BDNF (Figura 13A) e NGF (Figura 13B), respectivamente, nas seguintes estruturas cerebrais: córtex [$F(2,9) = 5,98$, $p \leq 0,05$] e [$F(2,10) = 9,56$, $p \leq 0,01$]; estriado [$F(2,10) = 7,98$, $p \leq 0,01$] e [$F(2,11) = 6,58$, $p \leq 0,05$], além do BO [$F(2,10) = 10,98$, $p \leq 0,01$] e [$F(2,9) = 10,81$, $p \leq 0,01$]. No hipocampo, em contraste, ANOVA de uma via não revelou diferença estatística entre os grupos de animais machos, nos níveis de BDNF [$F(2,10) = 0,66$, $p=0,53$] e NGF [$F(2,9) = 2,26$, $p=0,16$], respectivamente.

Diante disso, os resultados da figura 13A indicam que os ratos machos do grupo PolyI: C apresentaram níveis diminuídos de BDNF no córtex frontal ($p \leq 0,05$), estriado ($p \leq 0,05$) e BO ($p \leq 0,01$) em relação ao grupo controle. Já nos animais do grupo H1N1 também houve uma redução nos níveis de BDNF, porém no estriado ($p \leq 0,05$) e BO

($p \leq 0,05$), quando comparado ao grupo controle. Similarmente, a figura 13B, apontou no córtex frontal que os ratos machos pertencentes ao grupo PolyI: C mostraram níveis reduzidos de NGF quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,05$) e ao grupo H1N1 ($p \leq 0,01$). No estriado e BO, respectivamente, o grupo H1N1 ($p \leq 0,05$) e ($p \leq 0,05$), assim como o grupo PolyI: C ($p \leq 0,05$) e ($p \leq 0,01$) mostraram menores níveis de NGF em relação ao grupo controle.

Tais achados sugerem, ao menos em parte, que tanto à AIM (PolyI: C) como a vacinação contra influenza A (H1N1) durante a gestação foi capaz de alterar os fatores neurotróficos (BDNF e NGF) na vida tardia da prole, sugerindo que estes agentes pré-natais (PolyI: C e H1N1) podem possivelmente ter interferido em processos neuronais (angiogênese e neurogênese cerebral) nestes animais. Em contrapartida, no hipocampo, não houve diferença estatística nos níveis de NTs (BDNF e NGF) entre os ratos machos.

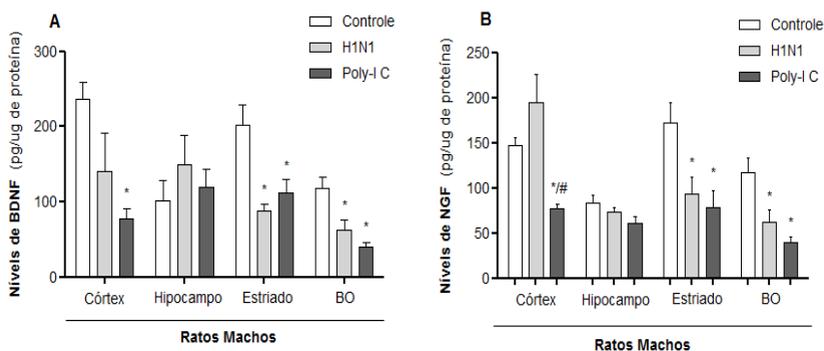


Figura 13: A figura 13 representa os níveis de neurotrofinas: BDNF (Figura 13A) e NGF (Figura 13B) nas estruturas cerebrais (córtex frontal, hipocampo, estriado e BO) dos animais machos, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 e PolyI: C durante a gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$, $n=4-6$. * diferente do grupo controle, # diferente do grupo H1N1, de acordo com ANOVA de uma via. Fonte: dados da autora, 2016.

A figura 14 representa os níveis cerebrais de BDNF (Figura 14A) e NGF (Figura 14B) nas ratas fêmeas, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 e PolyI: C durante a gestação. Na figura 14A, ANOVA de uma via indicou que houve diferença significativa nos níveis de BDNF entre os grupos de ratas fêmeas apenas no córtex frontal [$F(2,10) = 7,92$, $p \leq 0,01$]. Observou-se, então, que

houve um aumento nos níveis de BDNF nos animais do grupo H1N1 ($p \leq 0,01$) em relação ao grupo controle e, uma redução de BDNF no grupo PolyI: C ($p \leq 0,05$) comparado ao grupo H1N1, ambos no córtex frontal. ANOVA de uma via mostrou ainda que não houve diferença estatística nos níveis de BDNF entre os grupos de ratas fêmeas, nas demais estruturas cerebrais: hipocampo [$F(2,9) = 2,08$, $p=0,18$]; estriado [$F(2,11) = 0,25$, $p=0,78$] e BO [$F(2,9) = 0,54$, $p=0,59$]. Desta forma, nenhuma diferença significativa nos níveis de BDNF entre os grupos controle, H1N1 e PolyI: C foi observada nas três estruturas cerebrais avaliadas.

A figura 14B revela que ANOVA de uma via também não demonstrou diferença significativa entre os níveis de NGF para as ratas fêmeas, nas estruturas cerebrais avaliadas: córtex frontal [$F(2,9) = 0,36$, $p=0,70$]; hipocampo [$F(2,9) = 2,24$, $p=0,16$]; estriado [$F(2,10) = 1,73$, $p=0,22$] e BO [$F(2,9) = 1,00$, $p=0,40$]. Ressalta-se que nenhuma diferença nos níveis de NGF foi observada entre os grupos controle, H1N1 e PolyI: C nas ratas fêmeas, nas estruturas cerebrais analisadas.

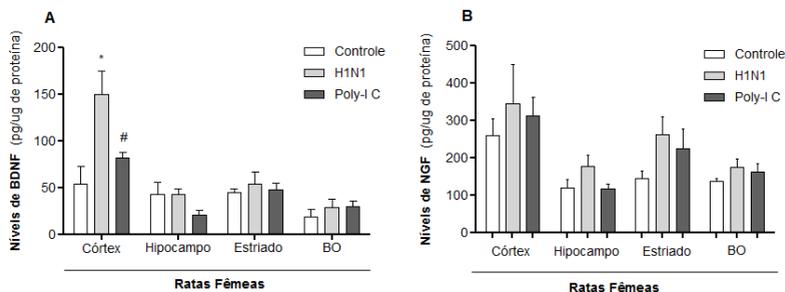


Figura 14: A figura 14 representa os níveis de neurotrofinas: BDNF (Figura 14A) e NGF (Figura 14B) nas estruturas cerebrais (córtex frontal, hipocampo, estriado e BO) de ratas fêmeas, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 e PolyI: C durante a gestação. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$, $n=4-6$. * diferente do grupo controle, # diferente do grupo H1N1, de acordo com ANOVA de uma via. Fonte: dados da autora, 2016.

Para avaliar os efeitos, gênero (machos e fêmeas), tratamento materno (salina, vacina H1N1 e PolyI: C), e a interação entre gênero e tratamento materno nos níveis cerebrais de NTs, BDNF e NGF, foi utilizado ANOVA de duas vias, sendo os resultados apresentados na figura 15. ANOVA de duas vias revelou interação significativa para os níveis de BDNF (Figura 15A) entre as variáveis: gênero e tratamento

materno entre ambos os gêneros nas estruturas cerebrais: córtex frontal [$F(2,19) = 9,03$, $p \leq 0,01$]; estriado [$F(2,21) = 8,14$, $p \leq 0,01$] e BO [$F(2,18) = 9,89$, $p \leq 0,01$]. Observou-se que as ratas fêmeas do grupo controle apresentaram níveis de BDNF significativamente menores quando comparado aos ratos machos no córtex frontal ($p \leq 0,01$), estriado ($p \leq 0,01$) e BO ($p \leq 0,01$). Este resultado indica, ao comparar os animais machos e fêmeas, cada qual com seu respectivo grupo, que houve diferença estatística apenas no grupo controle para as estruturas cerebrais já mencionadas e propõe, ao menos em parte, que os ratos machos controle apresentam níveis mais elevados de BDNF em relação às fêmeas. Nos demais grupos (H1N1 e PolyI: C) nenhuma diferença nos níveis de BDNF, entre os gêneros, foi encontrada nas estruturas cerebrais.

ANOVA de duas vias ainda apontou que houve interação para os níveis de NGF (Figura 15B) entre as variáveis: gênero e tratamento materno e entre os ratos machos e fêmeas nas estruturas cerebrais: estriado [$F(2,21)=5,21$, $p \leq 0,05$] e BO [$F(2,18)=6,45$, $p \leq 0,01$]. Desta forma, pode-se perceber um aumento nos níveis de NGF nas ratas fêmeas pertencentes ao grupo H1N1, no estriado ($p \leq 0,05$) e BO ($p \leq 0,01$), bem como nos animais do grupo PolyI: C ($p \leq 0,01$) apenas no BO, ambos comparados ao seu respectivo grupo de machos.

Já no córtex frontal, ANOVA de duas vias não revelou interação entre as variáveis: gênero (machos e fêmeas) e tratamento materno, para os níveis de NGF [$F(2,19) = 0,77$, $p=0,47$]. Por conseguinte, ao comparar os níveis de NGF no córtex entre os ratos machos e fêmeas, ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa [$F(5,19) = 4,09$, $p \leq 0,01$]. Diante disso, observou-se que as fêmeas do grupo PolyI: C ($p \leq 0,05$) apresentaram maiores níveis de NGF quando comparado aos machos no córtex frontal.

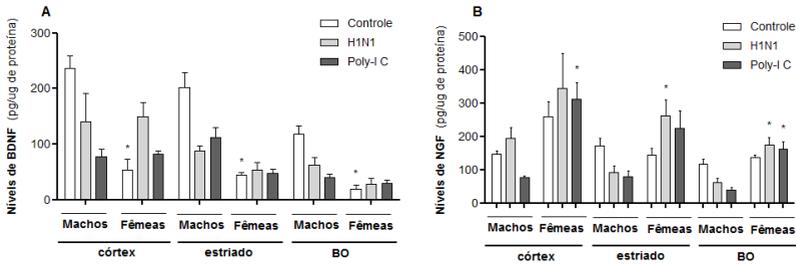


Figura 15: A figura 15 representa a interação entre gênero (machos e fêmeas) e tratamento materno (salina, vacina H1N1 e PolyI: C) nos níveis cerebrais (córtex, estriado e BO) de neurotrofinas BDNF (Figura 15A) e NGF (Figura 15B) na prole adulta. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$, $n=4-6$. * diferente do seu respectivo grupo, comparando machos e fêmeas, no mesmo parâmetro bioquímico, conforme ANOVA de duas vias. Fonte: dados da autora.

5 DISCUSSÃO

Com base nas observações de que a AIM pode desencadear transtornos neurodesenvolvimentais na prole adulta, modelos animais de estimulação imunológica materna, como a PolyI: C, têm sido utilizados (Piontkewitz et al., 2012). Diante disso, este estudo investigou os parâmetros comportamentais de déficit olfatório, ansiedade, atividade locomotora e comportamento tipo-depressivo (anedonia), além dos níveis de BDNF e NGF na prole adulta de ratas Wistar submetidas à vacinação contra influenza A (H1N1) e comparou esses parâmetros na prole de ratas induzidas a infecção com PolyI: C durante a fase gestacional, considerando os gêneros: machos e fêmeas.

Os déficits cognitivos estão bem documentados em transtornos psiquiátricos, particularmente na esquizofrenia e na depressão, uma vez que a atividade cognitiva se baseia nas percepções. Assim, pacientes esquizofrênicos podem manifestar alteração na sensibilidade ao odor, além de um déficit na identificação, reconhecimento e discriminação do odor. Já pacientes deprimidos apresentam, em especial, déficit nos aspectos hedônicos da percepção olfatória e, muitas vezes, demonstram alterações na sensibilidade ou identificação ao odor. Desta forma, anormalidades olfatórias podem ser um marcador de condições psiquiátricas, tendo um padrão específico para cada doença (Atanasova et al., 2008) e, inclusive, pesquisa aponta que a neurogênese reduzida no BO pode causar déficits na discriminação olfatória (Bath et al., 2008).

Sendo assim, neste estudo, no teste comportamental de discriminação olfatória, verificou-se que os ratos machos e fêmeas cujas mães foram expostas à AIM (PolyI: C) permaneceram um tempo similar no ambiente familiar e não familiar, sugerindo um possível prejuízo olfatório. De fato, a administração de PolyI: C durante a gestação tem se caracterizado como um modelo neurodesenvolvimental capaz de induzir transtornos, em especial, a esquizofrenia na prole adulta em roedores (Liu et al., 2013; Hadar et al., 2015). Em concordância ao presente achado, Liu et al. (2013) verificou uma discriminação olfatória comprometida na prole adulta de mães expostas à AIM por PolyI: C e reforçou que essa deficiência pode ser considerada um biomarcador para a esquizofrenia. Ainda, Baharnoori et al. (2012) observou em ratos neonatos, cujas mães foram expostas à AIM por LPS, uma deficiência no comportamento olfatório na busca de um novo ambiente e na aprendizagem associativa ao odor.

Apoiando os resultados da presente pesquisa, evidências sugerem que o processamento de informações olfativas encontra-se alterada em

pacientes esquizofrênicos (Atanasova et al., 2008; Nguyen et al., 2010). Ademais, o volume do BO apresenta-se reduzido nestes indivíduos (Nguyen et al., 2011), o que sugere que esta região pode ser uma das áreas cerebrais afetadas, levando a defeitos na discriminação do odor. Sabe-se que a informação olfativa é processada através do epitélio nasal olfatório ou BO e em várias regiões do córtex cerebral, portanto, tais déficits podem ser resultantes da ruptura de qualquer região ao longo da via SZV-OB (Malaspina et al., 1998).

Conforme verificado neste e em outros estudos, à AIM é capaz de alterar parâmetros comportamentais, sendo as funções olfativas vulneráveis à infecção pré-natal. Baseado nisso, a AIM pode causar prejuízos na neurogênese adulta por influenciar o funcionamento da via SZV-OB e, em consequência, desencadeia déficits nas funções olfativas (Liu et al., 2013). Constantemente, a neurogênese adulta normal nesta via contribui para os comportamentos olfativos e associações olfatórias de aprendizagem (Breton-Provencher e Saghatelian, 2012; Kageyama et al., 2012). Assim, déficits olfatórios em pacientes esquizofrênicos podem ser causados por defeitos na neurogênese (Liu et al., 2013).

Achados do atual estudo também mostraram que as ratas fêmeas do grupo controle não apresentaram diferença significativa para o tempo de permanência no ambiente familiar e não familiar. Tal achado indica um possível déficit olfatório nestas ratas, visto que permaneceram um tempo semelhante em ambos os ambientes. Na presente pesquisa, apesar das mães terem recebido o tratamento (solução salina) durante a gestação, alguns fatores como a manipulação das mães, a própria injeção, além do gênero dos animais devem ser considerado, uma vez que machos e fêmeas podem responder diferentemente ao mesmo estímulo materno, apesar de ser no grupo controle. Tudo isso poderia ter desencadeado uma resposta adversa na vida tardia da prole controle e, assim, interferir no desempenho comportamental (funções olfativas) em particular, nas fêmeas. Sendo assim, essas considerações poderiam, ao menos em parte, justificar o provável déficit olfatório encontrado nestas ratas controle quando comparadas aos machos, incluindo os possíveis erros experimentais.

Neste aspecto, estudo realizado por Klein e colegas (2012) refere que machos e fêmeas, inclusive, respondem de modo diferente às vacinas contra a gripe. As mulheres iniciam respostas imunes humorais mais elevadas, manifestando mais reações adversas às vacinas contra a gripe sazonal do que os homens. Modelos animais mostraram ainda que a imunidade elevada após a vacinação em fêmeas conduz a uma maior

proteção cruzada contra novos vírus de gripe em comparação aos machos. Em adição, os hormônios esteróides sexuais, incluindo estradiol e testosterona, bem como as particularidades genéticas entre os gêneros pode desempenhar importante papel na modulação das diferenças sexuais quanto às respostas imunes tanto à infecção pelo vírus da gripe como à vacinação contra influenza. Diante disso, Klein et al. (2012) enfatizam que mais pesquisas devem elucidar os caminhos e respostas celulares que diferem entre os gêneros e determinar a melhor forma de empregar esse conhecimento para informar às políticas públicas de saúde sobre a profilaxia e tratamentos terapêuticos de infecções por vírus influenza e a adequada vacinação para garantir uma maior proteção em ambos os gêneros.

Destaca-se que poucos estudos têm avaliado os efeitos da vacina contra influenza A na gestação sobre a prole adulta, em especial comparando os gêneros, sendo esta uma das pesquisas pioneiras neste aspecto. Neste estudo, a prole adulta (ratos machos e fêmeas) cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 e PolyI: C durante a gestação, também foi avaliada quanto aos parâmetros comportamentais de ansiedade (Labirinto em cruz elevada), atividade locomotora e comportamento tipo-depressivo (Splash teste). Como já mencionado, a infecção pré-natal pode aumentar o risco de transtornos neuropsiquiátricos como esquizofrenia, autismo, ansiedade e depressão na prole jovem-adulta. No entanto, evidências experimentais demonstram achados conflitantes da AIM em transtornos de humor e no comportamento semelhante à ansiedade, depressão e os efeitos no eixo HPA em animais adultos (Babri et al., 2014).

Para Yee et al. (2011) o modelo de AIM, inicialmente desenvolvido como um modelo neurodesenvolvimental para esquizofrenia, parece também ser relevante para o humor e / ou distúrbios afetivos, tais como depressão ou ansiedade. Em contrapartida, um grande estudo epidemiológico examinou a potencial relação entre infecção viral materna e depressão e não encontrou associação significativa (Pang et al., 2009). Já estudos realizados em camundongos demonstraram que a AIM via PolyI: C causou anormalidades comportamentais associadas ao humor e transtornos afetivos, incluindo diminuição da exploração ao campo aberto e menor tempo gasto no ambiente aberto no teste do labirinto em cruz elevada (Smith et al., 2007), além da diminuição da interação social (Smith et al., 2007; Bitanhirwe et al., 2010) e do consumo de sacarose (Bitanhirwe et al., 2010). Tais alterações são consistentes com o aumento do comportamento tipo-ansioso-depressivo na prole e, diante disso, Yee et

al. (2011) confirmou que as potenciais aplicações da AIM podem ser estendidas para além do modelo de esquizofrenia. No entanto, Markham e Koenig (2011) afirmam que não está claro se a AIM aumenta o risco de transtornos de humor na prole.

Com base nisso, no estudo atual, observou-se no teste labirinto em cruz elevada, relacionado ao nível de ansiedade dos animais, que os ratos dos três grupos avaliados apresentaram o mesmo comportamento, permanecendo mais tempo no braço fechado, independentemente do gênero. Tal resultado sugere um comportamento padrão de roedores, os quais demonstraram preferência pelo braço fechado, representando assim, um comportamento não-ansiosogênico (Pellow et al., 1985; Rodgers e Cole, 1994). De modo contrário a presente pesquisa, Yee et al. (2011) observou que a PolyI: C durante a gestação foi capaz de induzir um comportamento de ansiedade em ratos adultos. Já estudo realizado por Babri et al. (2014), o qual avaliou o efeito da infecção materna por LPS no comportamento tipo ansioso-depressivo em duas linhagens de camundongos (NMRI e C57BL/6), constatou que a AIM aumentou os níveis de comportamentos de ansiedade e depressão na prole de camundongos NMRI, conforme os testes labirinto em cruz elevada e nado forçado, respectivamente, porém não alterou o comportamento em camundongos C57BL/6.

Similarmente aos achados da presente pesquisa, Giovanoli et al. (2013) verificaram que a AIM por Poly I: C na metade da gravidez não afetou a ansiedade em camundongos C57BL/6 no labirinto em cruz elevada (Giovanoli et al., 2013). Do mesmo modo, para Schwendener et al. (2009), o nível de comportamento ansioso avaliado pelos testes labirinto em cruz elevada e campo aberto também não foi afetado na prole adulta de camundongos C57BL/6 proveniente de mães expostas à PolyI: C na fase gestacional.

Contudo, estudo conduzido por Schwendener et al. (2009) apontaram um aumento do comportamento relacionado ao medo na prole de fêmeas adulta, mas não nos animais machos (camundongos C57BL/6). Ainda, foi verificado que a PolyI: C alterou o comportamento pós-natal materno, em especial o cuidado das mães para com a prole pós-nascimento. Assim, Schwendener et al. (2009) sugerem que o comportamento de medo nas fêmeas está relacionado ao fato destas serem mais sensíveis às influências negativas no cuidado materno, o qual desencadeou um estresse pós-natal nestes animais em comparação aos machos. Consistente a estes achados, Weinstock (2007) especificamente observou que o comportamento de ansiedade, medo e

depressão apresenta-se mais intenso na vida tardia de ratas fêmeas estressadas logo após o nascimento que em machos. Já os animais machos cujas mães foram expostas a agentes estressores na fase gestacional apresentaram mais déficits no desempenho cognitivo quando comparado às fêmeas. De fato, estes achados indicam que os machos são mais vulneráveis ao estresse pré-natal, o que implica em déficits cognitivos na vida tardia, enquanto as fêmeas são mais propensas ao desenvolvimento de transtornos afetivos quando expostas ao estresse pós-natal ou ao estresse no decorrer da vida (Weinstock, 2007).

Em geral, Weinstock (2007) confirma que a presença de um agente estressor na fase gestacional é capaz de comprometer o desenvolvimento do sistema límbico e do eixo HPA fetal, resultando em comportamento ansiogênico e depressivo, além de déficits de aprendizagem e atenção na vida tardia da prole, no entanto, ressalta que tais características variam conforme gênero (sexo), intensidade e momento em que a mãe sofre o estresse pré-natal, bem como depende dos comportamentos avaliados. Sabe-se que o estresse materno aumenta os níveis de corticosterona no cérebro-fetal, diminui a testosterona no feto e a atividade da aromatase cerebral em homens e, ainda, altera a atividade das catecolaminas no cérebro das fêmeas. Assim, os déficits de aprendizagem, as reduções na neurogênese hipocampal, na potenciação de longa duração (LTP) e na densidade das espinhas dendríticas no córtex pré-frontal são mais facilmente observados em homens com ansiedade pré-natal, enquanto a ansiedade, a depressão e o aumento da resposta do eixo HPA para o estresse são mais prevalentes em mulheres. Neste sentido, os gêneros podem diferir quanto à sensibilidade das áreas cerebrais em desenvolvimento e aos hormônios do estresse (Weinstock, 2007; Schwendener et al., 2009), manifestando diferentes respostas mediante à exposição de uma mesma situação estressora.

Diante disso, nesta pesquisa também foi avaliado um parâmetro de comportamento tipo-depressivo através do splash teste, o qual reflete um índice de autocuidado (grooming) dos animais e, conseqüentemente, sintomas depressivos. Assim, os resultados apontam que os animais machos H1N1 e PolyI: C demonstraram menor preocupação com seu autocuidado, o que indica um comportamento tipo-depressivo. O efeito da AIM via PolyI: C no comportamento da prole adulta está em concordância aos achados de Babri et al. (2014), relatados acima. Entretanto, quando avaliados ratos machos e fêmeas, observou-se que as fêmeas do grupo controle apresentaram menor tempo total de limpeza, indicando um comportamento tipo-depressivo. Em síntese, neste estudo,

a vacinação materna contra influenza A não demonstrou efeitos protetores quanto ao comportamento tipo-depressivo na prole adulta, independentemente do gênero, diferindo de estudos que apontam a sua ação protetora nas funções cognitivas e na neurogênese (Slamberová et al., 2005; Xia et al., 2014b)

Outras pesquisas têm retratado o efeito da AIM nestes parâmetros comportamentais, do mesmo modo que no presente estudo, no qual a infecção materna alterou os padrões de depressão na vida tardia da prole. Entretanto, Shi et al. (2003) demonstraram que a exposição pré-natal ao vírus da gripe resultou em maiores níveis de ansiedade na prole adulta de camundongos C57BL/6 e BALB/c no teste campo aberto. Ademais, dois estudos recentes verificaram que a exposição pré-natal ao LPS elevou os níveis de ansiedade (Lin et al., 2012), conforme os testes de campo aberto e labirinto em cruz elevada e, aumentou os níveis de depressão, através do teste de nado forçado (Lin e Wang, 2014) na prole adulta de ratos Sprague-Dawley, diferentemente deste estudo. Além disso, Hava e colaboradores (2006) observaram que mesmo a AIM com LPS no final da gestação desencadeou um aumento na ansiedade em animais adultos (C57BL/6) no teste do labirinto em cruz elevada. Enayati et al. (2012) demonstraram que a exposição materna ao LPS em estágios tardios da gestação (15, 16 e 17 semanas) foi capaz de aumentar os níveis de ansiedade (labirinto em cruz elevada) e depressão (nado forçado) nos ratos machos na fase jovem (40 dias) e adulta (80 dias). Outra observação interessante foi que as fêmeas, quando comparadas aos machos, mostraram uma maior gravidade no comportamento tipo ansioso-depressivo com o aumento da idade (Salari et al., 2010; Enayati et al., 2012).

Diante disso, uma correlação negativa entre o nível de testosterona e o nível de ansiedade em machos roedores foi observada (Frye e Edinger, 2004) indicando, inclusive, que homens com histórico de estresse pré-natal apresentam níveis mais baixos de testosterona plasmática (Ward e Weisz, 1984). De fato, esta associação foi relatada em adolescentes do sexo masculino e feminino, os quais demonstraram altos níveis de ansiedade e depressão, distúrbios comportamentais e problemas de atenção relacionados aos baixos níveis de testosterona (Grander et al., 2003). Tais achados reforçam a importância em se considerar à questão hormonal nos transtornos neuropsiquiátricos, visto que podem estar diretamente relacionados às alterações comportamentais. Contudo, no presente estudo, não foi observada diferença significativa no comportamento tipo-ansioso-depressivo entre

os gêneros, ratos machos e fêmeas, com exceção das fêmeas do grupo controle que apontaram um comportamento-tipo-depressivo.

Ressalta-se ainda que a maioria das pesquisas pré-clínicas mencionadas acima analisaram os animais machos, sendo que as fêmeas são pouco estudadas. Diante disso, este estudo torna-se inovador ao comparar os efeitos da AIM e da vacinação contra influenza A durante a gestação na prole adulta e, em especial, em ambos os gêneros. Evidências têm mostrado que a vacinação contra a gripe na fase pré-natal pode ser considerada uma estratégia eficaz, melhorando ou evitando os efeitos deletérios causados pela AIM na vida pós-natal, particularmente, na função cognitiva (Kim et al., 2012; Xia et al., 2014b). Em síntese, o presente estudo não verificou melhor desempenho comportamental na prole adulta, em especial de machos, cujas mães receberam a vacina contra influenza A, visto que demonstraram um comportamento tipo-depressivo.

Pesquisa realizada por Kim et al. (2012) aplicou dois tipos de vacinas contra influenza A em animais gestantes: vírus da gripe pandêmica H1N1 de 2009 e vírus circulante da gripe H1N1 sazonal 2011 e observou efeito diferente na gestação dessas ratas. Foi observado que o vírus da gripe pandêmica matou cerca de 60% das ratas grávidas e causou aborto em até 40%, enquanto que o vírus da gripe H1N1 sazonal não causou mortes ou abortos. Como possível explicação, Kim et al. (2012) relacionou tal diferença com a hemaglutinina, a qual difere entre os tipos de vacinas influenza, causando vários graus de imunidade, o que pode, em consequência, causar reações adversas distintas. Levando em consideração o estudo de Kim e colegas (2012), essa particularidade da hemaglutinina, poderia ser um fator para explicar o achado acima relatado.

Está bem descrito que a Poly I:C, por seu um ativador imune pré-natal, pode desencadear transtornos neurodesenvolvimentais na prole jovem-adulta, inclusive sintomas característicos da esquizofrenia em modelos animais (Meyer e Feldon, 2012). No entanto, alguns sintomas da esquizofrenia, como delírios e alucinações não podem ser avaliados em roedores. Por conseguinte, mudanças na atividade locomotora, comportamentos relacionados às emoções (ansiedade, depressão) e às funções cognitivas são observadas no modelo animal de esquizofrenia. Assim, fenótipos comportamentais e estruturais são critérios úteis para modelos animais de transtornos psiquiátricos (Jaaro-Peled et al., 2010).

Estudos ilustram que o comprometimento comportamental e cognitivo na vida tardia da prole de mães expostas a AIM, seja via Poly I:C ou LPS, está relacionado à ativação de citocinas (Meyer et al., 2006;

Garay et al., 2013), as quais alteram processos neuroquímicos e causam alterações morfológicas. Como a maioria das citocinas pró-inflamatórias compromete a neurogênese e, sabendo-se que a AIM aumenta a liberação destas, em especial IL-1, IL-6 e TNF- α , é possível que a elevação destes marcadores na vida jovem-adulta da prole desencadeie prejuízos neurogênicos e, conseqüentemente, alterações comportamentais (Gonzalez-Perez et al., 2012). Outra provável causa de déficits na neurogênese é a desregulação dos sistemas de neurotransmissores, principalmente GABAérgico, glutamatérgico, dopaminérgico e serotoninérgico, os quais são interrompidos pela AIM (Boksa, 2010). Em resumo, estes sistemas desempenham papéis críticos para a regulação neurogênica no cérebro adulto, além de estarem diretamente relacionados à patogênese dos transtornos psiquiátricos. Assim, o comprometimento em algum destes sistemas afeta processos neuroquímicos e comportamentais, além de prejudicar negativamente a neurogênese (Balu e Lucki, 2009, Bovetti et al., 2011). No entanto, de que forma a desregulação dos neurotransmissores afeta a neurogênese na prole de mães expostas a AIM continua sendo uma incógnita, visto que os exatos mecanismos moleculares e celulares envolvidos nestes processos são pouco descritos (Reisinger et al., 2015; Zhang e Praag, 2015).

Com base nisso, o presente estudo também avaliou a atividade locomotora na prole adulta, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 e PolyI: C durante a gestação. Em geral, os resultados demonstraram uma hiperlocomoção apenas nos ratos machos PolyI: C. Porém, nenhuma diferença estatística foi observada na distância percorrida quando considerado o gênero dos animais. Resultado consistente ao desta pesquisa foi encontrado por Howland et al. (2012), o qual verificou que o tratamento pré-natal com PolyI: C aumentou significativamente a atividade locomotora na prole jovem-adulta. Em adição, Howland et al. (2012) ainda percebeu que o gênero da prole foi um determinante crítico das respostas locomotoras, uma vez que as fêmeas apresentaram níveis significativamente mais elevados de atividade locomotora do que os machos. Neste aspecto, ambos os estudos estão em divergência.

Li et al. (2014) constataram que a Poly I: C na prole adulta exibiu uma atividade hipolocomotora, sem sinais de ansiedade ou depressão, concluindo que o estado emocional da prole adulta não foi afetado pela exposição materna à PolyI: C, o que difere em parte, dos achados desta pesquisa. Já Moreno et al. (2011) verificaram que ratos nascidos de

mães infectadas pelo vírus influenza na gestação, apresentaram fortes déficits na atividade locomotora e exploratória, enquanto o comportamento semelhante à ansiedade permaneceu inalterado. Em sua pesquisa, Moreno et al. (2011) relacionam a hipolocomoção como uma habituação anormal a um ambiente novo na prole cujas mães receberam o vírus da gripe e sugerem que um subconjunto de pacientes esquizofrênicos exibe agitação psicomotora, como hiperatividade ou aumento dos movimentos estereotípicos (Powell e Miyakawa, 2006). Assim, estudos apresentam dados conflitantes, em que resposta locomotora à novidade mostrou-se maior (Rojas et al., 2007) e menor (Mukai et al., 2004) em diferentes modelos de esquizofrenia com ratos knockout.

Especulativamente, Moreno et al. (2011) associam essa diminuição da atividade locomotora na prole adulta a sintomas negativos de esquizofrenia, baseando-se em relatos anteriores (Shi et al., 2003; 2005, Meyer et al., 2008a,b, Lodge et al., 2009). Somado a isso, sabe-se que pacientes esquizofrênicos manifestam sintomas "positivos" (alucinações, delírios e distúrbios do pensamento), sintomas "negativos" (isolamento social e respostas emocionais anormais) e déficits cognitivos. Além destes sinais, os comportamentos de ansiedade e depressão têm ganhado atenção crescente na esquizofrenia, uma vez que há correlações significativas entre sintomas de ansiedade e sintomas positivos na esquizofrenia (Nestler et al., 2002; Muller et al., 2004). Diante disso, no atual estudo, a AIM por PolyI: C causou déficit olfatório e foi capaz de alterar o comportamento-tipo-depressivo e a atividade locomotora na prole adulta, sem alterar os padrões de ansiedade. Sabendo-se que a PolyI: C constitui um modelo neurodesenvolvimental principalmente de esquizofrenia e, considerando-se a hiperlocomoção um sintoma positivo deste transtorno, tal resultado poderia ser associado, ao menos em parte, a uma manifestação positiva da esquizofrenia na prole adulta cujas mães foram expostas à PolyI: C.

Desta forma, pode-se afirmar que a inflamação no cérebro fetal ou neonatal é capaz de alterar o desenvolvimento e às subsequentes funções cerebrais, as quais podem estar implicadas em transtornos neurodesenvolvimentais (Hagberg et al., 2012). De modo geral, conforme observado neste estudo, a exposição materna à PolyI: C induziu inúmeras alterações que podem ter afetado os processos neuronais em desenvolvimento, desencadeando os comportamentos aqui relatados na prole adulta (Li et al., 2012).

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

Tomados em conjunto os achados dos testes comportamentais deste estudo, destaca-se que a vacina contra influenza A durante a gestação influenciou mais diretamente neste parâmetro apenas por induzir um comportamento tipo-depressivo na prole adulta. Esses dados corroboram, em parte, a conclusão de Babri et al. (2014), a qual refere que o efeito pro-neurogênico induzido pela imunização não restabelece a função cerebral para os níveis normais, mas é capaz de melhorar a proliferação celular e aprendizagem espacial.

Além disso, diante das possíveis explicações já mencionadas para os resultados apresentados pela prole adulta do grupo controle (discriminação olfatória e splash test) e H1N1 (splash test), especulam-se outros vieses que possam ter influenciado neste estudo, tais como o desenho experimental, a espécie dos animais utilizada na pesquisa, o número da prole (machos e fêmeas) em cada grupo, bem como os testes comportamentais realizados, inclusive os protocolos de cada teste, visto que alguns resultados diferiram da literatura.

Sabe-se que os fatores neurotróficos são importantes moléculas sinalizadoras durante estágios do neurodesenvolvimento, incluindo proliferação, diferenciação e migração cerebral, além de suportarem a saúde neuronal e a manutenção sináptica até a idade adulta (Rybakowski et al., 2008). Dentre as NTs, o BDNF potencializa o desenvolvimento placentário e desempenha importante papel na diferenciação, proliferação e sobrevivência de citotrofoblastos na fase de desenvolvimento cerebral (Kawamura et al., 2009, 2011). Já o NGF está

associado com a atividade funcional das células que inclui os sistemas imune e endócrino e atua como um mediador inflamatório (Berry et al., 2012). Juntos, o BDNF e NGF estão envolvidos na regulação da angiogênese (Jianget al., 2011; Jadhao et al., 2012) atuando na desenvolvimento e manutenção das funções do SNC e SNP (Dhobale, 2014). Desse modo, alterações nos níveis de NTs podem produzir efeitos duradouros sobre os processos neurotróficos (número de neurônios e sinapses) que influenciam a maturação neuronal e a plasticidade na vida tardia (Vicario-Abejón et al., 2002). Além disso, fatores estressores durante a gestação, como a infecção materna, podem causar modificações nos níveis de NTs e predispor o aparecimento de transtornos psiquiátricos na prole adulta (Dammann et al., 2002; Shintani, 1999).

Sendo este um estudo em que as ratas gestantes foram expostas à vacinação contra influenza A ou receberam PolyI: C, tornou-se relevante investigar os níveis cerebrais de NTs na prole adulta, em ambos os gêneros. Assim, os resultados apontaram nos ratos machos que apenas a PolyI: C diminuiu os níveis de BDNF e NGF no córtex frontal. Em contrapartida, no estriado e BO, ambos H1N1 e PolyI: C reduziram os níveis de NTs nos machos. De modo geral, estes achados propõe, ao menos em parte, que tanto a AIM (PolyI: C) como a vacinação contra influenza A (H1N1) durante a gestação foi capaz de alterar os fatores neurotróficos na vida tardia da prole, interferindo possivelmente, nos processos neurogênicos, uma vez que a expressão de BDNF no hipocampo está correlacionada com a neurogênese (Xia et al., 2014b).

Ao associar os resultados comportamentais e as análises neuroquímicas, observou-se que a vacina contra influenza A (H1N1) na gestação apenas não apresentou efeitos protetores no comportamento tipo-depressivo na prole adulta. O fato dos níveis cerebrais de NTs, em especial o BDNF, estarem diminuídos na prole poderia contribuir para a compreensão desta alteração comportamental, uma vez que a redução das NTs poderia comprometer a angiogênese e neurogênese cerebral e, em consequência, influenciar na resposta comportamental dos animais H1N1.

Xia et al. (2014b) propôs que o estado imunológico materno alterado pela vacinação contra influenza A na fase pré-natal contribui para uma melhor resposta comportamental e induz à neurogênese na prole adulta, o que difere de alguns estudos clínicos preliminares (Rabin et al., 1989; Schlenker and Lyhs, 1991) e, em parte, do presente estudo experimental. Xia et al. (2014b) indicaram uma série de efeitos

benéficos tanto da vacinação contra influenza (H1N1), como da vacina influenza sazonal, após a imunização de animais no início da gravidez, verificando um aumento da proliferação celular, maior produção de neurônios e uma melhor capacidade espacial na prole adulta.

Outro achado interessante deste estudo foi que a vacina contra influenza A na gravidez aumentou os níveis de BDNF, porém apenas no córtex frontal de ratas fêmeas H1N1. Similarmente ao resultado observado para BDNF, a PolyI: C reduziu os níveis de NGF no córtex frontal de ratas fêmeas. Ao comparar os níveis de BDNF quanto ao gênero, percebeu-se que as fêmeas do grupo controle apresentaram níveis mais baixos de BDNF em relação aos machos no córtex frontal, estriado e BO. Em relação ao NGF, observou-se que as fêmeas do grupo PolyI: C apresentaram níveis aumentados de NGF quando comparado aos machos no córtex frontal. Já as ratas fêmeas H1N1 exibiram um aumento nos níveis de NGF no estriado e no BO, enquanto os animais PolyI: C mostraram maiores níveis de NGF apenas no BO, cada qual quando comparado ao seu respectivo grupo do sexo masculino. De modo geral, esses resultados indicam que os níveis de BDNF no córtex frontal das fêmeas podem ter sido influenciados pela vacina H1N1 durante a gestação, a qual parece ter exercido um efeito protetor na vida tardia da prole, ao menos neste parâmetro neuroquímico.

Está bem consolidado na literatura que a exposição pré-natal à infecção caracteriza-se como um fator de risco para transtornos neurodesenvolvimentais. No entanto, os reais mecanismos pelos quais a infecção materna atua no cérebro em desenvolvimento para induzir tais distúrbios precisam ser elucidados (Dammann et al., 2002). Estudos utilizando modelos experimentais de AIM, em especial LPS e a PolyI: C sugerem que as citocinas produzidas pela mãe atuam como prováveis mediadores do desenvolvimento anormal do cérebro, levando a mudanças comportamentais a longo prazo, bem como alterações neuroquímicas na prole adulta (Shi et al., 2003; Monji et al., 2009). Além disso, evidências indicam a presença de interações entre citocinas pró-inflamatórias e NTs no sistema nervoso, uma vez que a AIM altera ambos BDNF e NGF no cérebro em desenvolvimento e fetal, conforme pesquisas realizadas por Gilmore et al. (2003; 2005). Em síntese, tais achados também foram confirmados no presente estudo, em que a AIM alterou os níveis cerebrais de NTs na prole adulta.

Já os efeitos da vacinação contra influenza A durante a gestação na prole adulta foi pesquisado em poucos estudos. Xia et al. (2014a), por exemplo, verificou que a vacina contra a gripe (H1N1) no 1º trimestre

de gravidez contribuiu para a neurogênese hipocampal e melhorou a memória de trabalho, porém este achado foi observado nas gestantes (camundongos fêmeas C57BL/6J). Além disso, Xia et al. (2014b), já citado anteriormente, analisaram a prole adulta destas gestantes e verificaram uma ação protetora de ambas, vacina contra influenza (H1N1) e vacina contra influenza sazonal, na neurogênese e no comportamento da prole, sugerindo que os prováveis mecanismos que regulam o desenvolvimento do cérebro pós-natal podem ser influenciados por alterações nos níveis de citocinas e fatores de crescimento, corroborando achados da literatura. Estes dados obtidos por Xia et al. (2014b) diferem, ao menos em parte, dos resultados da presente pesquisa.

As mulheres grávidas, quando infectadas com vírus pandêmico da gripe, estão expostas à alta mortalidade, elevadas taxas de aborto e pneumonia grave. Na sequência do surto do H1N1 em 2009, estudos mostraram que as gestantes infectadas com o vírus apresentaram um maior risco maior de hospitalização em comparação à população em geral, indicando ainda que a infecção pré-natal está associada ao aumento da morbidade e mortalidade materna e neonatal (Fabiani et al., 2015; McMillan et al., 2015). No entanto, a gravidade da pandemia do vírus influenza H1N1 2009 comparado ao vírus da gripe sazonal H1N1 não é clara. Devido a necessidade em avaliar diferentes tipos de vírus influenza, Kim et al. (2012) observaram em ratas gestantes o efeito do vírus da gripe pandêmica H1N1 de 2009 e compararam ao vírus circulante da gripe H1N1 sazonal. Seus resultados mostraram que o vírus influenza H1N1 pandêmico de 2009 correspondeu a títulos virais mais elevados, aumentou os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6), de fator de estimulação de colônias de granulócitos, de proteína quimiotáxia de monócitos e KC (CXCL1) nos pulmões das ratas grávidas infectadas, quando comparado ao vírus da gripe H1N1 sazonal. Desta forma, seu estudo sugere uma maior patogênese pelo vírus pandêmico da influenza H1N1 2009, justificando que este induz uma maior replicação viral e elevação de citocinas pró-inflamatórias e, ainda, diminui os níveis de progesterona.

Além disso, pesquisas também revelam que a vacina contra a gripe sazonal, disponível desde os anos sessenta, mostrou um bom perfil de segurança na população em geral (OMS, 2005; 2014). No entanto, a maioria das informações sobre a segurança da vacinação em gestantes é proveniente de estudos de farmacovigilância pós-comercialização, sendo as mulheres grávidas excluídas dos ensaios clínicos conduzidos para obter a autorização para a comercialização. Similarmente, assim como

os medicamentos raramente são testados para teratogenicidade em ensaios clínicos controlados, com a vacina da influenza o mesmo procede. Consequentemente, isso pode causar preocupações com a qualidade dos dados disponíveis sobre quais recomendações são indicadas para a prática, visto que as informações sobre a segurança da vacina contra H1N1 durante a gravidez são limitadas, pois a gravidez caracteriza-se como um critério de exclusão para a participação deste grupo em ensaios clínicos com vacinas (Fabiani et al., 2015; McMillan et al., 2015).

Diante disso, a utilização da vacina contra a gripe durante a gravidez permanece limitada, devido preocupações com o seu efeito potencial sobre o desenvolvimento do feto e possíveis ações teratogênicas, visto que tanto pesquisas clínicas como pré-clínicas são pouco realizadas. Neste contexto, o presente estudo teve um caráter inovador e relevante, uma vez que investigou tanto os efeitos da AIM quanto da vacina contra influenza A na gestação, sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos na vida tardia da prole, em especial ao comparar os gêneros, sendo assim, uma pesquisa pioneira inclusive neste aspecto.

6 CONCLUSÃO

Este estudo investigou os parâmetros comportamentais de déficit olfatório, ansiedade, atividade locomotora e comportamento tipo-depressivo, além dos níveis de BDNF e NGF na prole adulta de ratas Wistar submetidas à vacinação contra influenza A (H1N1) e comparou tais parâmetros na prole de ratas induzidas a infecção com PolyI: C durante a fase gestacional, considerando o gênero: machos e fêmeas. Pode-se concluir que a AIM por PolyI: C foi capaz de induzir déficit olfatório, um comportamento tipo-depressivo e alterou a atividade locomotora na vida tardia da prole, independentemente do gênero, confirmando que a infecção pré-natal está implicada, de fato, nos transtornos neurodesenvolvimentais.

Em relação aos efeitos da vacina H1N1 na gestação sobre a prole adulta, ao associar os resultados comportamentais e níveis de NTs, observou-se que a vacina apenas alterou o comportamento tipo-depressivo nos ratos machos. Todavia, o fato dos níveis cerebrais de BDNF e NGF estarem diminuídos nestes animais poderia contribuir na compreensão deste achado comportamental, uma vez que a redução das NTs pode comprometer a angiogênese e neurogênese cerebral e, em consequência, influenciar na resposta comportamental dos animais H1N1. Verificou-se ainda que a vacina contra influenza A na gravidez aumentou os níveis de BDNF apenas no córtex frontal de ratas fêmeas, sugerindo que os níveis desta NT foram influenciados pela vacina H1N1 durante a gestação, a qual pode ter exercido um efeito protetor a longo prazo, embora somente neste parâmetro neuroquímico.

Diante disso, enfatiza-se a necessidade de novos estudos pré-clínicos avaliarem os efeitos potenciais da vacinação contra influenza A (H1N1) durante a gestação na vida tardia da prole adulta, visto que os possíveis vieses desta pesquisa podem ter contribuído para alguns resultados encontrados tanto no grupo controle como no grupo H1N1. No mais, conforme mencionado acima, outros parâmetros tanto comportamentais (inibição do reflexo de sobressalto, reconhecimento de objetos, nado forçado), como bioquímicos (níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias, fatores de crescimento e níveis hormonais) devem ser investigados, a fim de melhor correlacionar os aspectos celulares, moleculares e de comportamento da AIM e da vacina contra influenza A na gestação, bem como seu envolvimento com os transtornos psiquiátricos na vida tardia da prole.

REFÊRENCIAS

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by toll-like receptor 3. *Nature* 2011; 413: 732–738.

Anderson G, Maes M. Schizophrenia: linking prenatal infection to cytokines, the tryptophan catabolite (TRYCAT) pathway, NMDA receptor hypofunction, neurodevelopment and neuroprogression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013; 5;42:5-19.

Atanasova B, Graux J, El Hage W, Hommet C, Camus V, Belzung C. Olfaction: a potential cognitive marker of psychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev* 2008; 32 (7), 1315–1325.

Babri S, Doosti MH, Salari AA. Strain-dependent effects of prenatal maternal immune activation on anxiety- and depression-like behaviors in offspring. *Brain Behav Immun* 2014; 37:164-76.

Balu DT, Lucki I. Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci. Biobehav. Rev* 2009; 33 (3), 232–252.

Baharnoori M, Bhardwaj SK, Srivastava LK. Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: a prenatal infection model for developmental neuropsychiatric disorders. *Schizophr Bull* 2012; 38 (3), 444–456.

Bath KG, Mandairon N, Jing D, Rajagopal R, Kapoor R, Chen ZY, Khan T, Proenca CC, Kraemer R, Cleland TA, Hempstead BL, Chao MV, Lee FS. Variant brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) alters adult olfactory bulb neurogenesis and spontaneous olfactory discrimination. *J. Neurosci* 2008; 28 (10), 2383–2393.

Bednarczyk RA, Djaye-Gbewonyo D, Omer SB. Safety of influenza immunization during pregnancy for the fetus and the neonate. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 207(Suppl. 3):S38–46

Berry A, Bindocci E, Allewa E. NGF, brain and behavioral plasticity. *NeuralPlast* 2012; 784040.

Bitanirwe BK, Peleg-Raibstein D, Mouttet F, Feldon J, Meyer U. Late prenatal immune activation in mice leads to behavioral and neurochemical abnormalities relevant to the negative symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35:2462–78.

Boksa P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun* 2010; 24: 881–897.

Bovetti S, Gribaudo S, Puche AC, De Marchis S, Fasolo A. From progenitors to integrated neurons: role of neurotransmitters in adult olfactory neurogenesis. *J. Chem. Neuroanat* 2011; 42 (4), 304–316.

Brandon NJ, Sawa A: Linking neurodevelopmental and synaptic theories of mental illness through DISC1. *Nat Ver Neurosci* 2011; 12: 707–722.

Breton-Provencher V, Saghatelian A. Newborn neurons in the adult olfactory bulb: unique properties for specific odor behavior. *Behav. Brain Res* 2012; 227 (2), 480–489.

Brown AS: Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophr Bull* 2006; 32:200–202.

Cameron HA, McKay RD. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat. Neurosci* 1999; 2, 894–897.

Canevar L, Oliveira L, D'Altoe De Luca R, Correa PT, De BFD, Matos MP, Scaini G, Quevedo J, Streck EL, Zugno AI. A rodent model of schizophrenia reveals increase in creatine kinase activity with associated behavior changes. *Oxid Med Cell Longev* 2010; 3(6):421-7.

Chavant F, Ingrand I, Jonville-Bera AP, Plazanet C, Gras-Champel V, Lagarce L, et al. The PREGVAXGRIP study: a cohort study to assess foetal and neonatal consequences of in utero exposure to vaccination against A(H1N1)v2009 influenza. *Drug Saf* 2013;36(6):455–65.

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

Cui K, Ashdown H, Luheshi GN, Boksa P. Effects of prenatal immune activation on hippocampal neurogenesis in the rat. *Schizophr Res* 2009; 113 (2–3), 288–297.

Dammann O, Kuban KCK, Leviton A. Perinatal infection, fetal inflammatory response, white matter damage and cognitive limitation in children born preterm. *Mental Retardation and Developmental Disabilities* 2002; 8, 46–50.

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

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

Dhobale M. Neurotrophins: Role in adverse pregnancy outcome. *Int J Dev Neurosci* 2014; 37:8-14

Fabiani M, Bella A, Rota MC, Clagnan E, Gallo T, D'Amato M, Pezzotti P, Ferrara L, Demicheli V, Martinelli D, Prato R, Rizzo C. A/H1N1 pandemic influenza vaccination: A retrospective evaluation of adverse maternal, fetal and neonatal outcomes in cohort of pregnant women in Italy. *Vaccine*. 2015; 5;33(19):2240-7

Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Huang H, Oishi K, Mori S, Smee DF, Pearce DA, Winter C, Sohr R, Juckel G. Maternal infection leads to abnormal gene regulation and brain atrophy in mouse offspring: implications for genesis of neurodevelopmental disorders. *Schizophr Res* 2008; 99 (1–3), 56–70.

Frye CA, Edinger KL, Testosterone's metabolism in the hippocampus may mediate its anti-anxiety effects in male rats, *Pharmacol. Biochem. Behav* 2004; 78 473–481.

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

Gilmore, JH, Jarskog LF, Vadlamudi S. Maternal infection-regulated BDNF and NGF in fetal and neonatal brain and maternal-fetal unit of the rat. *J. Neuroimmunol* 2003; 138, 49–55.

Gilmore, JH, Jarskog LF, Vadlamudi S. Maternal poly I:C exposure during pregnancy

regulates TNF alpha, BDNF, and NGF expression in neonatal brain and the maternal-fetal unit of the rat. *J. Neuroimmunol* 2004; 159(1-2):106-12.

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

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

Gonzalez-Perez O, Gutierrez-Fernandez F, Lopez-Virgen V, Collas-Aguilar J, Quinones-Hinojosa A, Garcia-Verdugo JM. Immunological regulation of neurogenic niches in the adult brain. *Neuroscience* 2012; 226, 270–281.

Granger DA, Shirtcliff EA, Zahn-Waxler C, Usher B, Klimes-Dougan B, Hastings P. Salivary testosterone diurnal variation and psychopathology in adolescent males and females: individual differences and developmental effects. *Dev Psychopathol.* 2003; 15(2):431-49.

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

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

Helmig RB, Maimburg RD, Erikstrup C, Nielsen HS, Petersen OB, Nielsen LP, Hvidman L, Veirum JE, Henriksen TB, Storgaard M. Antibody response to influenza A(H1N1)pdm09 in vaccinated, serologically infected and unaffected pregnant women and their newborns. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2015; 94(8):833-9.

Howland JG, Cazakoff BN, Zhang Y. Altered object-in-place recognition memory, prepulse inhibition, and locomotor activity in the offspring of rats exposed to a viral mimetic during pregnancy. *Neuroscience* 2012; 10;201:184-98.

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

Jadhao CS, Bhatwadekar AD, Jiang Y, Boulton ME, Steinle JJ, Grant MB. Nerve growth factor promotes endothelial progenitor cell-mediated angiogenic responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 2012; 53, 2030–2037.

Jiang H, Liu Y, Zhang Y, Chen ZY. Association of plasma brain-derived neurotrophic factor and cardiovascular risk factors and prognosis in angina pectoris. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2011; 415, 99–103.

Jurgens, H.A., Amancherla, K., Johnson, R.W. Influenza infection induces neuroinflammation, alters hippocampal neuron morphology, and impairs cognition in adult mice. *J. Neurosci* 2012; 32, 3958–3968.

Kageyama R, Imayoshi I, Sakamoto M. The role of neurogenesis in olfaction-dependent behaviors. *Behav. Brain Res* 2012; 227 (2), 459–463.

Kawamura K, Kawamura N, Sato W, Fukuda J, Kumagai J, Tanaka T. Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival. *Endocrinology* 2009; 150, 3774–3782.

Kawamura K, Kawamura N, Kumazawa Y, Kumagai J, Fujimoto T, Tanaka T. Brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B signaling

regulates human trophoblast growth in an in vivo animal model of ectopic pregnancy. *Endocrinology* 2011; 152, 1090–1100.

Kim HM, Kang YM, Song BM, Kim HS, Seo SH. The 2009 pandemic H1N1 influenza virus is more pathogenic in pregnant mice than seasonal H1N1 influenza virus. *Viral Immunol* 2012; 25, 402–410.

Klein SL, Hodgson A, Robinson DP. Mechanisms of sex disparities in influenza pathogenesis. *J Leukoc Biol* 2012; 92(1):67-73.

Li WY, Chang YC, Lee LJ, Lee LJ. Prenatal infection affects the neuronal architecture and cognitive function in adult mice. *Dev Neurosci*. 2014;36(5):359-70.

Lin YL, Wang S. Prenatal lipopolysaccharide exposure increases depression-like behaviors and reduces hippocampal neurogenesis in adult rats. *Behav Brain Res*. 2014; 1;259:24-34.

Liu YH, Lai WS, Tsay HJ, Wang TW, Yu JY. Effects of maternal immune activation on adult neurogenesis in the subventricular zone-olfactory bulb pathway and olfactory discrimination. *Schizophr Res* 2013;151(1-3):1-11.

Lodge DJ, Behrens MM, Grace AA. A loss of parvalbumin-containing interneurons is associated with diminished oscillatory activity in an animal model of schizophrenia. *J Neurosci*. 2009; 29:2344–2354.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-7.

Majde JA. Viral double-stranded RNA, cytokines, and the flu. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20: 259–272.

Malaspina D, Perera GM, Lignelli A, Marshall RS, Esser PD, Storer S, Furman V, Wray AD, Coleman E, Gorman JM, Van Heertum RL. SPECT imaging of odor identification in schizophrenia. *Psychiatry Res* 1998; 82 (1), 53–61.

Markham JA, Koenig JJ. Prenatal stress: role in psychotic and depressive diseases. *Psychopharmacology (Berl)* 2011;214:89–106.

McCarthy EA, Pollock WE, Nolan T, Hay S, McDonald S. Improving influenza vaccination coverage in pregnancy in Melbourne 2010–2011. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 2012; 52:334–41.

McMillan M, Porritt K, Kralik D, Costi L, Marshall H. Influenza vaccination during pregnancy: A systematic review of fetal death, spontaneous abortion, and congenital malformation safety outcomes *M. Vaccine*. 2015; 27:33(18):2108-17

Meyer U, Feldon J, Schedlowski M, Yee BK. Towards an immunoprecipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005; 29:913–47.

Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, Yee BK, Feldon J. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci* 2006a; 26:4752–62.

Meyer U, Schwendener S, Feldon J, Yee BK. Prenatal and postnatal maternal contributions in the infection model of schizophrenia. *Exp Brain Res* 2006b; 173:243–57.

Meyer U, Nyffeler M, Schwendener S, Knuesel I, Yee BK, Feldon J. Relative prenatal and postnatal maternal contributions to schizophrenia-related neurochemical dysfunction after in utero immune challenge. *Neuropsychopharmacology* 2008a; 33 (2), 441–456.

Meyer U, Nyffeler M, Yee BK, Knuesel I, Feldon J. Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. *Brain Behav Immun* 2008b; 22 (4), 469–486.

Meyer U, Feldon J, Fatemi SH. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009; 33:1061–1079.

Meyer U, Feldon J. To poly(I:C) or not to poly(I:C): advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. *Neuropharmacology* 2012; 62: 1308–1321.

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

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

Muller JE, Koen L, Soraya S, Emsley RA, Stein DJ. Anxiety disorders and schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep*. 2004; 6:255–261.

Nestler EJ, Gould E, Manji H, Buncan M, Duman RS, Greshenfeld HK, Hen R, Koester S, Lederhendler I, Meaney M, Robbins T, Winsky L, Zalcman S. Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry* 2002; 52:503–528.

Nguyen AD, Shenton ME, Levitt JJ. Olfactory dysfunction in schizophrenia: a review of neuroanatomy and psychophysiological measurements. *Harv. Rev. Psychiatry* 2010; 18 (5), 279–292.

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

Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H. BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol. Histopathol* 2010; 25,237–258.

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

Pang D, Syed S, Fine P, Jones PB. No association between prenatal viral infection and depression in later life—a long-term cohort study of 6152 subjects. *Can J Psychiatry* 2009; 54:565–70.

Patterson, PH. Maternal effects on schizophrenia risk. *Science* 2007; 318: 576–577.

Pellow S, Chopin P, File SE. Are the anxiogenic effects of yohimbine mediated by its action at benzodiazepine receptors? *Neurosci Lett* 1985; 55: 5-9.

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

Prediger RDS, Batista LC, Takahashi RN. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiol Aging* 2005a; 26 (6):957-64.

Prediger RDS, Batista LC, Takahashi RN. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behav. Brain Res* 2005b; 159: 197-205.

Rabin BS, Cohen S, Ganguli R, Lysle DT, Cunnick JE. Bidirectional interaction between the central nervous system and the immune system. *Crit.Rev. Immunol* 1989; 9, 279–312

Rodgers RJ, Cole JC. The elevated plus maze: pharmacology, methodology and ethology. In s.j. Cooper (ed.), *ethology and psychopharmacology*. 1994; Chichester: wiley.

Rosa PB, Ribeiro CM, Bettio LE, Colla A, Lieberknecht V, Moretti M, Rodrigues AL. Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2014; S0091-3057:00277-00279. S

Reisinger S, Khan D, Kong E, Berger A, Pollak A, Pollak DD. The poly(i:c)induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacol Ther.* 2015; 149:213-26.

Ruedy J. Teratogenic risk of drugs used in early pregnancy. *Can Fam Phys.* 1984; 30:2133–6.

Rybakowski JK. BDNF gene: functional Val66Met polymorphism in mood disorders and schizophrenia. *Pharmacogenomics.* 2008; 9(11):1589–1593.

Saadani-Makki F, Kannan S, Lu X, Janisse J, Dawe E, Edwin S, Romero R, Chugani D. Intrauterine administration of endotoxin leads to motor deficits in a rabbit model: a link between prenatal infection and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199(651):e1–7.

Samuelsson, AM, Jennische E, Hansson HA, Holmgang A. Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 2006; 290 (5), R1345–R1356.

Schlenker G, Lyhs L. Interaction between the central nervous system and the immune system – review. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr* 1991; 104, 236–239.

Schwendener S, Meyer U, Feldon J. Deficient maternal care resulting from immunological stress during pregnancy is associated with a sex-dependent enhancement of conditioned fear in the offspring. *J. Neurodev. Disord* 2009; 1, 15–32.

Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, Patterson PH. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J Neurosci.* 2003; 23:297–302.

Shi L, Tu N, Patterson PH. Maternal influenza infection is likely to alter fetal brain development indirectly: the virus is not detected in the fetus. *Int J Dev Neurosci.* 2005; 23:299–305.

Shi L, Smith SE, Malkova N, Tse D, Su Y, Patterson PH. Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring. *Brain Behav Immun* 2009; 23 (1), 116–123.

Slamberová R, Pometlová M, Syllabová L, Mančušková M. Learning in the place navigation task, not the new learning task, is altered by prenatal methamphetamine exposure. *Brain Res. Dev. Brain Res* 2005; 157, 217–219.

Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci* 2007; 27:10695–702.

Soffié M, Lamberty Y. Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: possible interaction with olfactory sensitivity. *Behav. Process* 1988; 17: 181-90.

Spooren A, Kolmus K, Laureys G, Clinckers R, De Keyser J, Haegeman G, Gerlo S. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Res. Rev* 2011; 67 (1-2), 157-183.

Svedin P, Kjellmer I, Welin AK, Blad S, Mallard C. Maturation effects of lipopolysaccharide on white-matter injury in fetal sheep. *J Child Neurol* 2005; 20:960-4.

Vicario-Abejón C, Owens D, McKay R, Segal M. Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nat. Rev. Neurosci* 2002; 3, 965-974.

Vuillermot S, Weber L, Feldon J, Meyer U. A longitudinal examination of the neurodevelopmental impact of prenatal immune activation in mice reveals primary defects in dopaminergic development relevant to schizophrenia. *J Neurosci.* 2010; 30:1270-1287.

Wang TW, Zhang H, Gyetko MR, Parent JM. Hepatocyte growth factor acts as a mitogen and chemoattractant for postnatal subventricular zone-olfactory bulb neurogenesis. *Mol. Cell. Neurosci* 2011; 48 (1), 38-50.

Weinstock M. Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behaviour. *Neurochem Res.* 2007; 32:1730-40.

Ward IL, Weisz J. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. *Endocrinology* 1984; 114 1635-1644.

Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural/neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 2005; 52:90-110.

Winter C, Djodari-Irani A, Sohr R, Morgenstern R, Feldon J, Juckel G, Meyer U. Prenatal immune activation leads to multiple changes in basal neurotransmitter levels in the adult brain: implications for brain disorders of neurodevelopmental origin such as schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009;12:513-24.

World Health Organization. Influenza vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2005; 80(33):277–88.

World Health Organization. Latest updates on the SAGE on influenza and immunization. World Health Organization; 2012. [Acesso em 2014, outubro, 23]. Disponível em <http://www.who.int/influenza/vaccines/SAGEinformation/en/>

Wu JH, Han YT, Yu JY, Wang TW. Pheromones from males of different familiarity exert divergent effects on adult neurogenesis in the female Accessory Olfactory Bulb. *Dev. Neurobiol* 2013; 73 (8), 632–645.

Xia Y, Qi F, Zou J, Yao Z. Influenza A(H1N1) vaccination during early pregnancy transiently promotes hippocampal neurogenesis and working memory. Involvement of Th1/Th2 balance. *Brain Res* 2014a; 10;1592:34-43.

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

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

Zhang Z, van Praag H. Maternal immune activation differentially impacts mature and adult-born hippocampal neurons in male mice. *Brain Behav Immun*. 2015; 45:60-70.

ANEXO



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



CERTIFICADO

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

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

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

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

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

Principal Investigator: **Alexandra Ioppi Zugno**

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

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

Criciúma, 19 de abril de 2016.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA