

**LUTIANA ROQUE SIMÕES**

**ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA COMO FATOR DE RISCO  
PARA ALTERAÇÕES IMUNOQUÍMICAS E  
COMPORTAMENTAIS EM LONGO PRAZO NA PROLE**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde para obtenção do  
título de Doutora em Ciências da  
Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana  
Barichello

**CRICIÚMA  
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S593a Simões, Lutiana Roque.

Ativação imune materna como fator de risco para alterações imunoquímicas e comportamentais em longo prazo na prole / Lutiana Roque Simões. – 2017.

119 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientação: Tatiana Barichello.

1. Ativação imune materna. 2. Lipopolissacarídeos. 3. Comportamento - Modificação. 4. Cetamina. 5. Feto – Desenvolvimento. 6. Gravidez - Infecções. I. Título.

CDD 22. ed. 616.0795



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

---

## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Lutiana Roque Simões** sob o título “**ATIVACÃO IMUNE MATERNA COMO FATOR DE RISCO PARA ALTERAÇÕES IMUNOQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS EM LONGO PRAZO**”, para obtenção do grau de **DOUTORA 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 Tese.

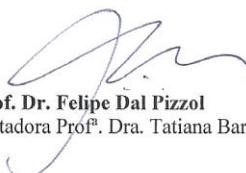
Criciúma, SC, 21 de junho de 2017.

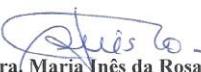
  
**Prof.ª Dra. JOSIANE BUDNI**  
Membro Relator – UNESC

  
**Prof. Dr. RICARDO ANDREZ MACHADO DE ÁVILA**  
Membro Interno – UNESC

  
**Prof.ª Dra. CRISTIANE DAMIANI TOMASI**  
Membro Externo – UNESC

  
**Prof.ª Dra. CLÁRISSA M. COMIM**  
Membro Externo – UNISUL

  
**Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol**  
Rep. da Orientadora Prof.ª. Dra. Tatiana Barichello

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



## **FOLHA INFORMATIVA**

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Microbiologia Experimental, Laboratório de Neurociências e Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense e Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu amor incondicional, por me sentir amparada e protegida. Por todos os momentos difíceis que me tornaram mais forte e por todos os momentos de alegria que me fizeram sorrir.

À minha querida Profa. Dra. Tatiana Barichello, orientadora desta tese, por toda dedicação, carinho, paciência e comprometimento, por me proporcionar participação do seu grupo de pesquisa há tantos anos e acima de tudo poder estar ao seu lado compartilhando sua experiência profissional e seus ensinamentos.

Agradeço a minha querida e amada amiga Jaqueline da Silva Generoso, companheira de todos os dias, pelo seu apoio e incentivo na realização deste trabalho, por me auxiliar nas dificuldades, por esclarecer minhas dúvidas, por me escutar, pelos nossos 11 anos de amizade e por estar ao meu lado na realização de mais uma conquista.

Agradeço aos meus colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia Experimental, Allan Collodel, Amanda Steckert, Caroline Serafim Dagostin, Cássia Pereira Rafael, Chayelle Raupp, Cristiano Faller, Diogo Domingui, Gustavo Sangiogo, Jéssica Goulart, Jhonata Pereira Muniz, Luciano Jornada, Silvio Renato Ribeiro Junior, pelo carinho, atenção e dedicação na realização dos experimentos e por fazerem do laboratório um ambiente muito mais divertido e produtivo. Sem essa equipe não seria possível à realização desse trabalho.

Agradeço a doutoranda Monique Michels que me ajudou inúmeras vezes no decorrer desse trabalho, as minhas queridas Bruna Pescador, Grazielle Milioli, Gislaine Réus e Silvia Simões pelo carinho e amizade de todos os dias.

Ao meu marido, Alexsandro Zanette Rosso, pelo carinho, atenção e amor, pelas palavras de incentivo nos momentos de desânimo, pelo abraço apertado que me conforta nos momentos difíceis, e por não medir esforços para que eu nunca desistisse de realizar meus sonhos.

À minha família pela confiança e por estarem sempre presentes em todos os momentos que precisei dividir minha ansiedade, angústia ou alegria.

Enfim, agradeço a todos aqueles que estiveram do meu lado sempre torcendo por mim, incentivando-me e confiando em meu potencial para que pudesse concluir este trabalho. A todos, muito obrigada!



## EPÍGRAFE

Não é sobre ter todas as pessoas do mundo pra si  
É sobre saber que em algum lugar, alguém zela por ti  
É sobre cantar e poder escutar mais do que a própria voz  
É sobre dançar na chuva de vida que cai sobre nós  
É saber se sentir infinito  
Em um universo tão vasto e bonito, é saber sonhar  
Então fazer valer a pena  
Cada verso daquele poema sobre acreditar  
Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu  
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu  
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações  
E assim ter amigos contigo em todas as situações  
A gente não pode ter tudo  
Qual seria a graça do mundo se fosse assim?  
Por isso eu prefiro sorrisos  
E os presentes que a vida trouxe para perto de mim  
Não é sobre tudo que o seu dinheiro é capaz de comprar  
E sim sobre cada momento, sorriso a se compartilhar  
Também não é sobre correr contra o tempo pra ter sempre mais  
Porque quando menos se espera, a vida já ficou pra trás  
Segura teu filho no colo  
Sorria e abraça os teus pais enquanto estão aqui  
Que a vida é trem bala, parceiro  
E a gente é só passageiro prestes a partir

*Trem Bala*  
*Ana Vilela*



## RESUMO

A infecção materna durante a gravidez resulta em alterações agudas ou duradouras no contexto do desenvolvimento, estrutura e função do sistema nervoso central (SNC) do feto. Em modelos experimentais a administração de lipopolissacarídeo (LPS) é bem caracterizado e amplamente aceito como uma infecção bacteriana, sendo esta uma proteína altamente imunogênica que provoca uma resposta inflamatória no hospedeiro. O objetivo do estudo foi investigar os efeitos da injeção de LPS no 15º dia gestacional em ratos Wistar, em seus fetos e também avaliar as alterações comportamentais na prole exposta a diferentes doses de cetamina (CET) na vida adulta. Foram utilizadas ratas Wistar prenhas no 15º dia gestacional e o LPS ou solução salina tamponada com fosfato (PBS) (grupo controle) foi administrado por via intraperitoneal. Seis, 12 e 24 h após a injeção, as ratas foram submetidas a cirurgia para retirada das estruturas avaliadas. Os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-18, MIP-3a, TNF- $\alpha$ , IL-7, IL-10, MIP-1a e EPO foram aumentados no cérebro dos fetos. No líquido amniótico os níveis de TBARS aumentaram em 12 e 24 h, grupamentos carbonil aumentaram em 12 h, a atividade da CAT aumentou somente em 12 h e a SOD aumentou em todos os tempos avaliados. No cérebro dos fetos os níveis de TBARS e grupamentos carbonil aumentaram somente em 24 h, a atividade da SOD e CAT somente em 12 h. Houve um aumento na expressão de metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMPs 2 e 9) no líquido amniótico e cérebro dos fetos que foram expostos à injeção de LPS. No hipocampo e córtex cerebral das ratas houve disfunção na integridade da barreira hematoencefálica (BHE) em 6, 12 e 24 h. Na barreira placentária (BP) a disfunção ocorreu em 6 h e em 6 e 24 h no cérebro dos fetos. Neste trabalho a prole adulta também foi avaliada, foram injetadas com LPS e PBS e divididas nos seguintes grupos: controle/salina, controle/CET 5 mg/kg, controle/CET 15 mg/kg, controle/CET 25 mg/kg, LPS/salina, LPS/CET 5 mg/kg, LPS/CET 15 mg/kg e LPS/CET 25 mg/kg. A CET foi administrada 1 vez ao dia durante 7 dias (53º ao 59º dia de vida). No teste comportamental de habituação ao campo aberto e reconhecimento de objetos novos, os animais do grupo controle expostos a 15 e 25 mg/kg de CET apresentaram dano de memória de habituação e reconhecimento e todos os animais do grupo LPS expostos ou não a CET apresentaram comprometimento de memória. Na atividade locomotora tanto os animais do grupo controle quanto LPS que receberam tratamento com



25 mg/kg de CET apresentaram hiperlocomoção em comparação com o grupo controle/salina. No teste de inibição de pré-pulso (IPP) do reflexo de sobressalto os animais do grupo controle/CET 25 mg/kg apresentaram IPP em 70 e 75 dB. Os animais LPS/CET 25 mg/kg apresentaram IPP em todas as intensidades analisadas. Houve um aumento dos níveis de BDNF e NGF no hipocampo de animais expostos ao LPS e que receberam 15 e 25 mg/kg de CET. Assim, a ativação imune materna (AIM) provocou alterações imunoquímicas e a CET intensificou déficits comportamentais em animais expostos ao LPS no período pré-natal.

**Palavras-chave:** ativação imune materna, lipopolissacarídeo, comportamento, cetamina.



## ABSTRACT

Maternal infection during pregnancy results in acute or long-lasting changes in the context of the development, structure and function of the fetal central nervous system (CNS). In experimental models the administration of lipopolysaccharide (LPS) is well characterized and widely accepted as a bacterial infection, being this a highly immunogenic protein that provokes an inflammatory response in the host. The objective of the study was to investigate the effects of LPS injection on the 15th day of pregnancy in Wistar rats and their fetuses, as well as to evaluate the behavioral damage in offspring exposed to different doses of ketamine (KET) in adult life. Pregnant Wistar rats were used on the 15th gestational day and LPS or phosphate buffered saline (PBS) (control group) was administered intraperitoneally. Six, 12 and 24 h after the injection, the rats underwent surgery to remove the fetuses. Levels of IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-18, MIP-3a, TNF- $\alpha$ , IL-7, IL-10, MIP-1a and EPO were increased in the fetal brain. In the amniotic fluid the TBARS levels increased in 12 and 24 h, the protein carbonyl increased in 12 h, the CAT activity increased only in 12 h and the SOD increased in all evaluated times. In the brains of fetuses, TBARS levels and carbonyl of proteins increased only in 24 h, SOD and CAT activity only in 12 h. There was an increase in the expression of matrix metalloproteinases 2 e 9 (MMPs 2 and 9) in the amniotic fluid and brains of the fetuses that were exposed to LPS injection. In the hippocampus and cerebral cortex of the rats, there was dysfunction in the integrity of the blood-brain barrier (BBB) at 6, 12 and 24 h. In the placental barrier (PB) the dysfunction occurred in 6 h and in 6 and 24 h in the brains of the fetuses. The adult offspring of rats injected with LPS or PBS were divided into the groups: control/saline, control/KET 5 mg/kg, control/KET 15 mg/kg, control/KET 25 mg/kg, LPS/saline, LPS/KET 5 mg/kg, LPS/KET 15 mg/kg and LPS/KET 25 mg/kg. KET was given once a day for 7 days (53rd to 59th day of life). In the behavioral test of habituation to the open field and recognition of new objects, the animals of the control group treated with 15 and 25 mg/kg of KET presented memory damage of habituation and recognition and all the animals of the LPS group treated or not with KET presented Memory impairment. In the locomotor activity, both control and LPS animals receiving treatment with 25 mg/kg KET showed hyperlocomotion compared to the control/saline group. In the pre-pulse inhibition test (PPI) of the startle reflex the animals in the



control group/KET 25 mg/kg had PPI at 70 and 75 dB. Animals injected with LPS/KET 25 mg/kg showed PPI in all intensities analyzed. There was an increase in the levels of BDNF and NGF in the hippocampus of animals injected with LPS and receiving 15 and 25 mg/kg KET. Thus, maternal immune activation (MIA) provoked immunochemical alterations and KET intensified behavioral deficits in animals exposed to LPS in the prenatal period.

**Key words:** Maternal immune activation, lipopolysaccharide, behavioral, ketamine



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Ativação do receptor TLR-4 por LPS .....	37
<b>Figura 2.</b> Representação do tempo de indução do LPS, morte dos animais e retirada das estruturas para as análises imunoquímicas. ....	60
<b>Figura 3.</b> Representação do tempo de indução do LPS, tempo de tratamento e a realização dos testes comportamentais. ....	61
<b>Figura 4.</b> Teste comportamental de Habituação ao campo aberto.....	66
<b>Figura 5.</b> Teste comportamental de reconhecimento de objetos novos..	67
<b>Figura 6.</b> Teste comportamental de atividade locomotora .....	67
<b>Figura 7.</b> Teste comportamental de IPP do reflexo de sobressalto.....	69
<b>Figura 8.</b> Níveis de IL no cérebro de fetos expostos a AIM.....	71
<b>Figura 9.</b> Níveis de citocinas no cérebro de fetos expostos a AIM. ....	73
<b>Figura 10.</b> Níveis de malondialdeído (MDA), grupamentos carbonil e atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no líquido amniótico de ratas Wistar prenhas.....	74
<b>Figura 11.</b> Níveis de malondialdeído (MDA), grupamentos carbonil e atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no cérebro de fetos .....	75
<b>Figura 12.</b> Avaliação da expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) 2 e 9 no líquido amniótico de ratas Wistar prenhas. ....	76
<b>Figura 13.</b> Avaliação da expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) 2 e 9 no cérebro de fetos expostos a AIM.....	77
<b>Figura 14.</b> Integridade da BHE no hipocampo, córtex cerebral e integridade da barreira placentária na placenta e no cérebro de fetos de ratas Wistar prenhas em 6, 12 e 24 h após injeção de LPS ou PBS no 15º dia de gestação. ....	78
<b>Figura 15.</b> Teste comportamental de habituação ao campo aberto com ratos Wistar submetidos à AIM no período pré-natal e exposto à administração de CET em diferentes doses 5, 15 e 25 mg/kg na vida adulta.....	79
<b>Figura 16.</b> Teste comportamental de reconhecimento de objetos com ratos Wistar submetidos à AIM no período pré-natal e exposto à administração de CET em diferentes doses 5, 15 e 25 mg/kg na vida adulta. ....	80
<b>Figura 17.</b> Teste comportamental de atividade com ratos Wistar submetidos à AIM no período pré-natal e exposto à administração de CET em diferentes doses 5, 15 e 25 mg/kg na vida adulta.....	81



<b>Figura 18.</b> Teste comportamental de IPP do reflexo de sobressalto com ratos Wistar submetidos à AIM no período pré-natal e exposto à administração de CET em diferentes doses 5, 15 e 25 mg/kg na vida adulta. ....	82
<b>Figura 19.</b> Efeitos da AIM nos níveis de BDNF e NGF no hipocampo e córtex pré-frontal da prole com 60 dias de vida, após administração de CET nas doses de 5, 15 e 25 mg/kg.. ....	83



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - serotonina

AIM - ativação imune materna

AMPA - ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (do inglês:  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)

AP-1 - proteína ativadora 1 (do inglês: activator protein 1)

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês: brain derived neurotrophic factor)

BHE - barreira hematoencefálica

BP - barreira placentaria

CAT - catalase

CET - cetamina

COX - ciclo-oxigenase

CREB - Ligação do elemento de resposta cAMP (do inglês: response element binding protein)

DISC - 1 - interrompidos na esquizofrenia 1 (do inglês: disrupted in schizophrenia 1)

DNA - ácido desoxirribonucleico (do inglês: deoxyribonucleic acid)

EPM - erro padrão da média

EPO - eritropoietina

ERK1/2 - quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (do inglês: extracellular-signal regulated kinases 1/2)

ERO - espécies reativas ao oxigênio

GABA - ácido gama-aminobutírico (do inglês:  $\gamma$ -aminobutyric acid)

GM-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (do inglês: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

GPx - glutationa peroxidase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

HIV - vírus da imunodeficiência humana (do inglês: human immunodeficiency virus)

IFN - interferon

IKK - complexo I $\kappa$ B quinase (do inglês: I $\kappa$ B kinase)

IL - interleucina

iNOS - óxido nítrico síntese induzível

IPP - inibição de pré-pulso

IRAK4 - receptor de interleucina-1 associado à quinase 4 (do inglês: interleukin-1 receptor associated kinase 4)

IRF-3 - fator regulador de interferon 3 (do inglês: interferon-regulatory factor-3)



I $\kappa$ B - proteína kappa B (do inglês: protein kappa B)  
JNK - quinase terminal c-jun (do inglês: cJun-N-terminal-kinase)  
LBP - proteína ligadora de LPS (do inglês: LPS-binding protein)  
LCR - líquido cefalorraquidiano  
LPS - lipopolissacarídeo  
LTP - potencialização hipocampal a longo prazo (do inglês: long-term potentiation)  
MAPKs - proteína quinase ativadas por mitógenos (do inglês: mitogen-activated protein kinase)  
MD-2 - proteína de diferenciação mielóide-2 (do inglês: myeloid differentiation factor 2)  
MEC - matriz extracelular  
MHCI - complexo principal de histocompatibilidade I (do inglês: major histocompatibility complex class I)  
MIP - proteína inflamatória derivada de macrófago (do inglês: macrophage inflammatory protein)  
MMPs - metaloproteinases de matriz  
mRNA - ácido ribonucleico mensageiro (do inglês: messenger ribonucleic acid)  
mTOR - proteína alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês: mammalian target of rapamycin)  
MyD88 - fator de diferenciação mielóide-88 (do inglês: myeloid differentiation primary response protein-88)  
NF- $\kappa$ B - fator de transcrição nuclear B (do inglês: nuclear factor kappa B)  
NGF - fator de crescimento do nervoso (do inglês: nerve growth factor)  
NMDA - N-metil-D-aspartato (do inglês: N-methyl-D-aspartate)  
NO - óxido nítrico  
NR1 - subunidade do receptor NMDA  
NLRP-3 - receptores NOD-like (NLR) pyrin domain-containing 3 (do inglês: receptor NOD-like (NLR) pyrin domain-containing 3)  
O<sub>2</sub> - ânion superóxido  
ONOO - peroxinitrito  
PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase (do inglês: phosphatidylinositol 3-kinase)  
p38 - proteína 38  
PBS - solução salina tamponada com fosfato (do inglês: phosphate-buffered saline)



Poly I:C - ácido poliribonucleotídico-poliribocitídico (do inglês: polyinosinic:polycytidylic acid)

SNC - sistema nervoso central

SNP - sistema nervoso periférico

SOD - superóxido dismutase

STAT- transdutor de sinal e ativador de transcrição (do inglês: signal transducer and activator of transcription)

TAB - proteína de ligação a TAK1 (do inglês: TAK1 binding protein)

TAK1 - quinase-1 ativada por fator de crescimento 1 (do inglês: transforming growth factor- $\beta$  activated kinase-1)

TBARS - Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês: thiobarbituric acid reactive substances)

TBK1 - TANK-ligação de quinase 1 (do inglês: TANK binding kinase 1)

TIR - receptor Toll de interleucina 1 (do inglês: Toll-Interleukin-1 receptor)

TIRAP - proteína adaptadora que contém o domínio TIR (do inglês: TIR domain-containing adaptor protein)

TrkB - Receptor Tirocina Quinase (do inglês:receptor tyrosine kinase)

TLR - receptores Toll-like (do inglês: Toll-like receptor)

TNF - fator de necrose tumoral (do inglês: tumor necrosis factor)

TRAF - fator associado ao fator de necrose tumoral 6 (do inglês: tumor necrosis factor receptor-associated factor)

TRAM - molécula adaptadora relacionada a TRIF (do inglês: TRIF-related adaptor molecule)

TRIF - indutor adaptador de interferon- $\beta$  contendo o domínio TIR (do inglês: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ )

VEFG - fator de crescimento endotelial vascular (do inglês: vascular endothelial growth factor)



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>33</b>
1.1 ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA .....	33
1.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA POR LIPOPOLISSACARÍDEO ....	35
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO .....	39
1.4 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E BARREIRA PLACENTÁRIA .....	41
1.5 METALOPROTEINASE DE MATRIZ 2 e 9.....	43
1.6 FATOR NEUTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO E FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO.....	46
1.7 ALTERAÇÕES DO NEURODESENVOLVIMENTO E AIM.....	48
1.8 ATIVAÇÃO IMUNE E ESQUIZOFRENIA .....	51
1.9 JUSTIFICATIVA.....	55
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>56</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	56
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>58</b>
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA .....	58
3.2 ANIMAIS.....	58
3.3 PREPARAÇÃO E EXPOSIÇÃO AO LPS .....	58
3.4 MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA .....	59
3.5 MODELO EXPERIMENTAL .....	59
<b>3.5.1 Protocolo experimental para as análises imunoquímicas</b> .....	<b>59</b>
<b>3.5.2 Protocolo experimental para os testes comportamentais</b> .....	<b>60</b>
3.6 IMUNOQUÍMICA.....	61
<b>3.6.1 Análise das citocinas</b> .....	<b>61</b>
<b>3.6.2 Avaliação dos níveis de TBARS, grupamentos carbonil de proteínas e atividade de SOD e CAT</b> .....	<b>62</b>
<b>3.6.3 Avaliação das MPPs 2 e 9</b> .....	<b>63</b>
<b>3.6.4 Integridade da BHE e BP</b> .....	<b>64</b>
<b>3.6.5 Avaliação dos níveis de BDNF e NGF</b> .....	<b>64</b>
3.7 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	65
<b>3.7.1 Habituação ao Campo Aberto</b> .....	<b>65</b>
<b>3.7.2 Reconhecimento de objetos novos</b> .....	<b>66</b>
<b>3.7.3 Atividade Locomotora</b> .....	<b>67</b>
<b>3.7.4 Inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto</b> .....	<b>68</b>
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	69
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>70</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>84</b>



<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>117</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA

O sistema imune é formado por células e moléculas efetoras que protegem o organismo de maneira eficaz contra doenças. Alguns patógenos e seus produtos são capazes de ativar o sistema imune, iniciando assim uma resposta imune que protege o hospedeiro contra danos (Murphy, 2016). Um caso específico é a ativação imune materna (AIM), onde as implicações da interação entre o sistema imunológico de gestantes e as infecções por diferentes agentes patogênicos como bactérias, vírus e outros organismos se estendem tanto à saúde materna, quanto à saúde do embrião, feto e neonato (Bonney, 2016).

A infecção materna durante a gravidez resulta em alterações agudas ou duradouras no contexto do desenvolvimento, estrutura e função do sistema nervoso central (SNC) do feto. Essas alterações aumentam o risco ao parto prematuro, atraso mental e distúrbios neurológicos (Oskvig et al., 2012). Recentes evidências em observações clínicas e modelos experimentais indicam uma etiologia multifatorial com interação entre o tempo, intensidade, natureza da exposição imunológica, fatores ambientais e predisposição genética, definindo alterações estruturais e funcionais em longo prazo no cérebro da prole exposta à AIM (Estes e Mcallister, 2016; Scola e Duong, 2017).

O desenvolvimento do cérebro é um processo altamente elaborado que ocorre predominantemente durante o período pré-natal, sendo que a produção de neurônios em seres humanos começa no 42º dia embrionário, pós-concepção (Bystron et al., 2008). À medida que são produzidos, os neurônios migram para diferentes áreas cerebrais onde começam a fazer conexões com outros neurônios estabelecendo redes neurais rudimentares (Knuesel et al., 2014). Considerando os processos altamente sofisticados de desenvolvimento cerebral, qualquer alteração, como a exposição materna a insultos infecciosos ou inflamatórios, pode potencialmente comprometer o desenvolvimento da arquitetura e função do cérebro fetal (Bale, 2011). Estes insultos à trajetória do desenvolvimento normal do cérebro durante o período pré-natal podem contribuir para uma sequência de eventos que podem tornar-se progressivamente ampliadas ao longo do tempo, levando a mudanças de longo prazo nas funções cerebrais e comportamentais que podem persistir até a idade adulta (Knuesel et al., 2014).

Existem crescentes evidências de que a etiologia de várias doenças neuropsiquiátricas tem sua origem no ambiente pré-natal, onde os insultos ao feto, durante momentos críticos do desenvolvimento, podem alterar o desenvolvimento cerebral do feto, agindo como fatores de vulnerabilidade para doenças na vida adulta, entre elas a esquizofrenia e o autismo (Brown et al., 2004; Atladottir et al., 2010). Além disso, a ativação imune pré-natal tem sido implicada em outros transtornos, incluindo a paralisia cerebral, epilepsia (Varon, 2009) e transtorno bipolar (Parboosing et al., 2013).

Estudos têm demonstrado que a exposição à infecção pré-natal, como gripe, rubéola, sarampo, herpes e infecções bacterianas, podem aumentar o risco da prole em desenvolver diferentes alterações neuropsiquiátricas (Ploeger et al., 2010; Jiang et al., 2016). Alguns estudos demonstraram um risco aumentado para o desenvolvimento de autismo (Zerbo et al., 2011), esquizofrenia (Konrath et al., 2016) e transtorno bipolar (Torrey et al., 1996) nos bebês nascidos durante os meses do inverno, possivelmente devido a elevada prevalência de gripe e doenças infecciosas (Davies et al., 2003). Estes achados epidemiológicos sugerem que a resposta da AIM pode ser uma via subjacente compartilhada e conferindo riscos a esses distúrbios psiquiátricos (Scola e Duong, 2017).

Os modelos experimentais são de grande importância para identificar mecanismos plausíveis de desenvolvimento através dos quais a exposição pré-natal à infecção no início da vida leva a alterações duradouras no desenvolvimento cerebral observadas na esquizofrenia (Boksa, 2010). A AIM em roedores está associada a uma gama de alterações no cérebro da prole adulta. Morfológicamente, tanto a infecção pré-natal por lipopolissacarídeo (LPS) ou ácido poliribonucleotídico-poliribocitídico (Poly I:C) têm sido associados à diminuição da substância branca (Makinodan et al., 2008), diminuição da neurogênese hipocampal (Cui et al., 2009) e aumento da ativação microglial no cérebro de ratos (Ling et al., 2004). O desenvolvimento de estudos com modelo animal permite abordar questões específicas sobre os efeitos da exposição à infecção precoce na vida, por exemplo, a temporização do período crítico para a ativação imune, a duração e a gravidade da resposta inflamatória e a trajetória de alterações no desenvolvimento neurológico até a vida adulta (Boksa, 2010).

## 1.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA POR LIPOPOLISSACARÍDEO

Em modelos experimentais a administração de LPS, um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, é bem caracterizado e amplamente aceito como uma endotoxina (Campagne et al., 1999). O LPS pode provocar uma resposta inflamatória no hospedeiro através de seu reconhecimento por diferentes sensores do sistema imune inato, principalmente através dos receptores *Toll-like* (TLR) (Hanke e Kielian, 2011). Existem 10 genes TLR expressos em humanos e 13 em roedores, cada um é responsável por reconhecer um grupo distinto de padrões moleculares. O TLR-4 é quem reconhece o LPS bacteriano (Weizman et al., 1994).

Para identificar o LPS, o ectodomínio de TLR-4 utiliza uma proteína acessória chamada de proteína de diferenciação mieloide-2 (MD-2), que inicialmente se liga ao TLR-4 dentro da célula e é necessária para o tráfego correto do TLR-4 para a superfície celular e para o reconhecimento do LPS. Além da MD-2, outras duas proteínas acessórias são ativadas para o reconhecimento de LPS por TLR-4 (Rahimifard et al., 2017), a proteína ligadora de LPS (LBP) e a CD14. Durante a infecção, o LPS pode se separar da membrana externa das bactérias e ser capturado pela LBP presente no sangue e no líquido extracelular dos tecidos. O LPS é então, transferido da proteína ligadora de LPS para uma segunda proteína, a CD14, que está presente na superfície de macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Murphy, 2016). O reconhecimento de LPS pelo heterotrímero TLR-4/MD-2/CD14 induz a ativação das vias dependentes e não dependentes do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) (Rahimifard et al., 2017).

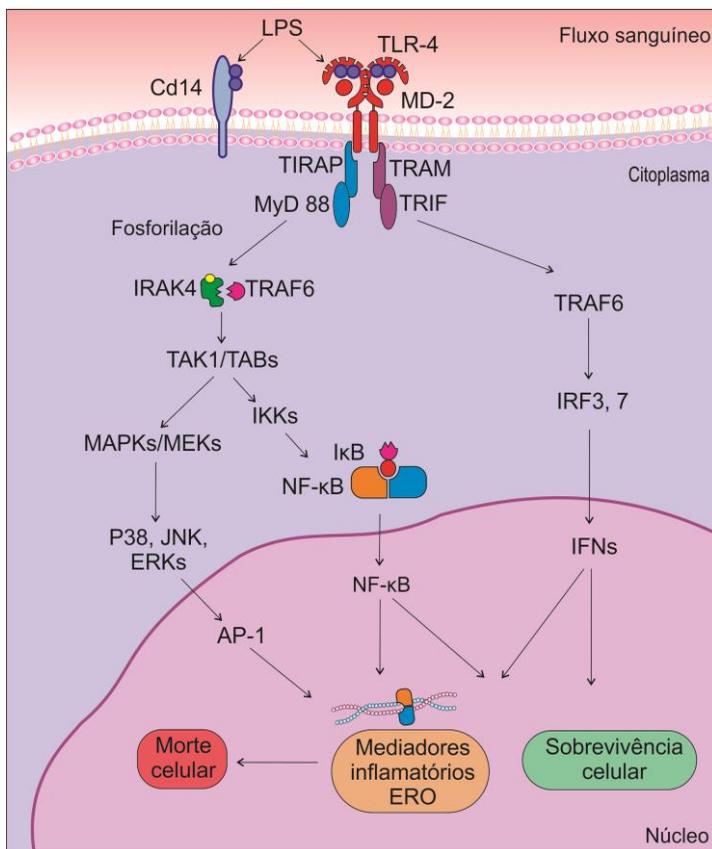
A primeira e mais importante via é a dependente de MyD88. Neste mecanismo, após estimulação, TLR-4 liga-se a MyD88 através do receptor *Toll* de interleucina 1 (TIR) e da proteína adaptadora que contém o domínio TIR (TIRAP) (Laird et al., 2009) levando ao recrutamento do receptor de interleucina-1 associado à quinase 4 (IRAK4). O IRAK4 ativado dissocia-se do MyD88 ligando-se e ativando o fator associado ao fator de necrose tumoral 6 (TRAF6). Esta ligação é então dissociada de TLR-4 e estimula o recrutamento de várias proteínas, incluindo a quinase-1 ativada por fator de crescimento 1 (TAK1) e a proteína de ligação a TAK1 (TAB) (Murphy, 2016).

Este processo leva a ativação de duas sub-vias: (1) A fosforilação de TAK1 induz a ativação do complexo I $\kappa$ B quinase (IKK) que, por sua vez, fosforila o inibidor da proteína kappa B (I $\kappa$ B). Isto leva à sua

degradação mediada pelo complexo de lipoproteína proteossomas e estimula a translocação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) para o núcleo celular (Kieser e Kagan, 2017). As ações do NF- $\kappa$ B incluem ligação ao DNA, ativando assim centenas de genes específicos que promovem a expressão gênica de mediadores inflamatórios (Rahimifard et al., 2017); (2) Alternativamente, o TRAF6 ativa as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) entre elas, a proteína quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2), p38 e quinase terminal c-jun (JNK) através de fosforilação, que por sua vez modula a ativação de vários fatores de transcrição, incluindo a proteína ativadora 1 (AP-1) (Murphy, 2016; Kieser e Kagan, 2017), (figura 1).

Após a estimulação por LPS, o TLR-4 recruta o indutor adaptador de interferon- $\beta$  contendo o domínio TIR (TRIF) através da molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM). A dimerização destas duas proteínas ativa a via TRAF6/TAK1/IKK descrita acima (Okun et al., 2009). A TANK-ligação de quinase 1 (TBK1) fosforila o fator regulador de interferon 3 (IRF-3), e esta fosforilação torna-o ativo. O IRF3 ativado pode ser translocado para o núcleo onde atua como um fator de transcrição. O interferon-1 $\beta$  (IFN-1 $\beta$ ) liga-se ao IRF3 e ativa o transdutor de sinal ativador de transcrição (STAT) (Murphy, 2016), que é uma família de fatores de transcrição que medeiam às funções antivirais do sistema imunológico através da sinalização dos IFNs (Roy et al., 2016).

A habilidade dos TLRs ativarem NF- $\kappa$ B é crucial para o papel de alertar o sistema imune para a presença de patógenos bacterianos. O NF- $\kappa$ B ativa subsequentemente mediadores pró-inflamatórios, que são altamente eficazes na ativação de óxido nítrico síntese induzível (iNOS), ciclo-oxigenase (COX) e estimulam a liberação de citocinas inflamatórias, tais como interleucina (IL) -1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Murphy, 2016).



**Figura 1.** Ativação do receptor TLR-4 por LPS. Após reconhecimento do LPS o receptor TLR4, MyD88 ou TRIF são recrutados por TIRAP e TRAM. Isso, por sua vez, leva a via de ativação por processos dependentes de MyD88, onde MyD88 associa-se com o complexo IRAKs/TRAF6 e TAK1/TABs, conduzindo à ativação de IKK. IKK ativado fosforila IκBα que estimula NF-κB que é então translocado para o núcleo celular onde estimula a transcrição de genes para produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e a produção de radicais livres. TAK1 também está associado com a via MAPK e estimula a ativação de p38, JNK e ERK1/2, levando a translocação nuclear de AP-1 e a transcrição de citocinas pró-inflamatórias que conduzem à morte celular. A via ativada independente de MyD88. Após a estimulação de TLR4 por LPS o TLR recruta TRIF através de TRAM. A dimerização destas duas proteínas ativa a via TRAF6-TAK1-IKK. Esta interação destrói IκBα e ativa NF-κB. Alternativamente, a quinase TBK1 fosforila o IRF3, e esta fosforilação torna-o ativo. A interação entre TRIF e TRAF3 induz a translocação nuclear de IRF3 e

IRF7 e a transcrição de IFNs. Abreviações: AP-1, proteína ativadora 1; ERK1/2, quinase regulada por sinal extracelular1/2; IFN, interferon; IKK, complexo I $\kappa$ B quinase; IRAK4, receptor de interleucina-1 associado à quinase 4; IRF 3,7, fator regulador de interferon 3,7; JNK, quinase terminal c-jun; LPS, lipopolissacarídeo; MAPK, proteína quinase ativadas por mitógenos; MyD88, fator de diferenciação mielóide-88; NF- $\kappa$ B, fator de transcrição nuclear B; p38, proteína 38; TABs, proteína de ligação a TAK1; TAK1, quinase-1 ativada por fator de crescimento 1; TIRAP, proteína adaptadora que contém o domínio TIR; TLR, receptores *Toll-like*; TRAF, fator associado ao fator de necrose tumoral 6; TRAM, molécula adaptadora relacionada a TRIF; TRIF, indutor adaptador de interferon- $\beta$  contendo o domínio TIR. Fonte: desenvolvida pelo autor, 2017.

Citocinas são pequenas proteínas inflamatórias de sinalização secretadas por diversas células como macrófagos, neutrófilos e leucócitos, geralmente em resposta a um estímulo ativador, e que induzem respostas por ligação a receptores específicos (Murphy, 2016). As citocinas e seus receptores podem ser agrupados pela estrutura em diferentes famílias entre elas a família IL-1, as hematopoiéticas, TNF e os IFNs. A família de IL-1 contém 11 membros, entre os principais estão, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18. A maioria dos membros dessa família são produzidas como pró-proteínas que são clivadas, para produzir as citocinas ativas, IL-1 $\beta$  e IL-18, que são liberadas pelos macrófagos em resposta a sinalização dos TLRs, são clivadas pela caspase 1 através dos receptores NOD-like (NLR) *pyrin domain-containing* 3 (NLRP-3) inflamassoma (Coll et al., 2015).

A superfamília de hematopoiética inclui fatores de crescimento e diferenciação, não relacionada ao sistema imune, como a eritropoietina (EPO) que estimula o crescimento das hemácias e o hormônio de crescimento. A IL-6 e o fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) que estimula a produção de novos monócitos e granulócitos na medula óssea também fazem parte dessa família. Os receptores de IFN compreendem uma pequena família de receptores de heterodímeros que reconhecem IFNs tipo I, bem como outras citocinas como a IL-4, que são produzidas pelas células T (Roy et al., 2016).

A família de TNF, na qual o TNF- $\alpha$  é o mais difundido, contém mais de 17 citocinas com importantes funções nas imunidades inata e adaptativa. Ao contrário da maioria das outras citocinas imunologicamente importantes, muitos membros da família de TNF são proteínas transmembranas, o que as confere propriedades distintas e limita o alcance de suas ações (Murphy, 2016).

As citocinas são também agrupadas em citocinas pró ou anti-inflamatórias. As pró-inflamatórias incluem IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , que estão envolvidas na ampliação das respostas inflamatórias. Em contraste, as citocinas anti-inflamatórias tais como IL-4, IL-10 e IL-13 diminuem a resposta inflamatória (Murphy, 2016). O equilíbrio entre essas citocinas regula uma ampla variedade de processos, como a regulação do sistema imune inato e adaptativo, proliferação, ativação e diferenciação celular (Rahimifard et al., 2017).

O LPS aumentou expressão de mRNA e de citocinas pró-inflamatórias no soro materno, no fluido amniótico e na placenta de ratas prenhas (Anderson et al., 1997; Oskvig et al., 2012; Rincon, 2012). Neste modelo de infecção pré-natal as citocinas geradas penetram a barreira placentária (BP) e ganham acesso ao feto (Maxeiner et al., 2014). No SNC, as citocinas regulam uma variedade de processos de desenvolvimento neurológico incluindo a diferenciação celular neuronal, conectividade e poda sináptica, plasticidade e sobrevivência neuronal (Estes e Mcallister, 2016). Durante o desenvolvimento pré-natal do cérebro, há expressão constitutiva de citocinas e seus receptores em células neuronais, sugerindo que essas moléculas desempenham um papel crucial na direção e modelagem do desenvolvimento cerebral (Knuesel et al., 2014).

A expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias e também moléculas anti-inflamatórias aumenta a produção de outras interleucinas, quimiocinas, prostaglandinas, metaloproteinases de matriz (MMPs), óxido nítrico (NO $^*$ ) e espécies reativas ao oxigênio (ERO) (Hirst et al., 2004). Em consequência à produção de citocinas, leucócitos polimorfonucleares são atraídos e ativados e, grandes quantidades de ERO são produzidas (Kastenbauer et al., 2002).

### 1.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Em condições normais, a produção de espécies reativas é balanceada pelo sistema de defesa antioxidante no organismo. Entretanto, quando a geração de espécies reativas excede a capacidade das defesas antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo, ocasionando um possível dano oxidativo em lipídios, proteínas e no DNA (Zhao et al., 2008).

O conceito para ERO é de moléculas derivadas da redução parcial do oxigênio molecular que reagem com moléculas orgânicas e são citotóxicas, podendo induzir a morte celular neuronal. Em baixas concentrações, essas moléculas atuam em processos celulares de defesa

contra agentes patogênicos e reposta mitogênica (Valko et al., 2007). O processo de estresse oxidativo é determinado pelo balanço entre a quantidade de espécies oxidantes geradas e a capacidade dos processos metabólicos de produzir antioxidantes (Barron et al., 2013). Diversos tipos celulares podem sofrer dano oxidativo, no entanto, o SNC é particularmente vulnerável aos efeitos deletérios do estresse oxidativo e isso ocorre devido a utilização de altas taxas de oxigênio quando comparado a outros órgãos, presença de ácidos graxos poli-insaturados, que podem ser alvos das ERO (De Menezes et al., 2009).

Os mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo envolvem a atividade de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. No grupo de defesas enzimáticas antioxidantes encontram-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). Enquanto que no grupo de antioxidantes não enzimáticos estão ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutatona, carotenóides, flavonóides e outros (Valko et al., 2007). A SOD, em condições normais, catalisa a reação de conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que é eliminado pela ação das enzimas CAT e GPx (De Menezes et al., 2009).

O NF- $\kappa$ B desempenha um papel essencial na expressão de genes envolvidos no desenvolvimento de células assessoras e populações de leucócitos, que levam à produção de citocinas, quimiocinas e outras moléculas pró-inflamatórias (Tato e Hunter, 2002). Consequentemente, os leucócitos polimorfonucleares são atraídos e ativados, liberando o NO $\cdot$ , radical ânion superóxido (O $_2^{\cdot-}$ ) e peróxido de hidrogênio (H $_2$ O $_2$ ). O $_2^{\cdot-}$  e NO $\cdot$  podem levar à formação de peroxinitrito (ONOO $\cdot$ ), que é um forte oxidante (Klein et al., 2006). Este oxidante exerce efeitos citotóxicos sobre as células endoteliais (Szabo, 2003), aumentando a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), peroxidação lipídica, quebras na cadeia de DNA, nitração de tirosina e produção de citocinas (Kastenbauer et al., 2002; Klein et al., 2006).

Assim, a passagem transplacentária de citocinas pró-inflamatórias e as espécies oxidativas maternas podem tornar o feto vulnerável a danos neurológicos (Richie e Josephson, 2015). Esta lesão neuronal pode ser atribuída principalmente à produção de metabólitos oxidativos neurotóxicos e moleculares, tais como o O $_2^{\cdot-}$  e H $_2$ O $_2$  (Mcintyre et al., 2012; Campbell et al., 2014). Deste modo, tem sido sugerido que o estresse oxidativo contribui para a fisiopatologia de transtornos neuropsiquiátricos como a esquizofrenia (Al-Amin et al., 2016). O dano oxidativo a lípidos, proteínas e DNA, como observado na esquizofrenia

é conhecido por afetar a função e a viabilidade celular, a qual pode, subsequentemente, representar o curso de deterioração da doença (Kastenbauer e Pfister, 2003).

Em um importante estudo verificou-se um aumento nos níveis de peroxidação lipídica e  $\text{NO}^{\bullet}$  em pacientes com esquizofrenia, ao passo que a atividade da superóxido dismutase (SOD) foi encontrada significativamente reduzida (Brouwer et al., 2010). Além disso, lesão mediada por ativação imune de aminoácidos excitatórios, tais como o glutamato, estão cada vez mais sendo implicadas no desenvolvimento de lesão neuronal (Al-Amin et al., 2016). As ERO têm sido implicadas como mediadores da disfunção da BHE (Klein et al., 2006), sugerindo que o aumento da permeabilidade BHE pode estar relacionado com a presença de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{NO}^{\bullet}$  (Mayhan, 2000).

#### 1.4 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E BARREIRA PLACENTÁRIA

A BHE e a BP são as duas barreiras que protegem o cérebro e o embrião, respectivamente, da migração de proteínas e substâncias tóxicas do sangue periférico. Ao mesmo tempo, essas barreiras permitem a migração de nutrientes essenciais que são úteis para o desenvolvimento durante a organogênese (Mishra et al., 2009). Estas barreiras também têm a propriedade de agir como um isolador para proteger o cérebro e a placenta de doenças infecciosas. No entanto, alguns vírus e bactérias tem a capacidade de causar dano e aumentar a permeabilidade facilitando a passagem de células imunes, toxinas e microorganismos (Greenwood, 1991; Dallasta et al., 1999) e os mecanismos pelos quais algumas substâncias violam estas barreiras têm sido amplamente estudados e ainda não foram completamente elucidados (Diamond e Klein, 2004).

A disfunção da BP pode permitir a transmissão *in-utero* de infecções. Por exemplo, a transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV) da mãe para a criança é relatada na taxa de 25 a 35% (Kwiek et al., 2006). A transmissão intrauterina do HIV-1 é presumivelmente devido a múltiplos fatores como baixa contagem de células linfócitos T CD4, carga viral elevada, anticorpos neutralizantes, fatores imunológicos maternos, fatores genéticos e quaisquer alterações morfológicas corrosivas na placenta intacta (Sperling et al., 1996). A membrana placentária, que existe na interface útero-placenta, separa o sangue fetal do sangue materno e consiste em endotélio vascular fetal, tecidos

conectivos, vilosidades coriônicas e trofoblásticas onde a ancoragem das vilosidades liga a placenta ao útero (Mofenson et al., 1999). A vilosidade coriônica contém macrófagos, células *Hofbauer* e vasos fetais. As vilosidades trofoblásticas e terminais têm receptores CD4 e permanecem em contato direto com o sangue materno (Chandwani et al., 1991).

A administração direta de LPS no feto pode diferir substancialmente da administração materna sistêmica, uma vez que a administração de LPS não entra no compartimento fetal quando administrado por via sistêmica materna, pois não atravessa a BP (Takahashi et al., 2014). Comparando o LPS a patógenos vivos, seu uso mimetiza a ativação imune que acompanha uma infecção bacteriana, conferindo controle sobre curso de tempo e da dose de exposição imunogênica. Isso pode permitir uma identificação mais precisa das janelas de vulnerabilidade (Harvey e Boksa, 2012).

Além das respostas inflamatórias no meio materno, alterações nos níveis de citocinas ou outros mediadores na placenta, também são possíveis indutores de infecção pré-natal. Estas alterações na placenta podem ter consequências prejudiciais no desenvolvimento do cérebro fetal, já que o aumento dos níveis de citocinas inflamatórias tais como TNF- $\alpha$ , tem sido implicado na disfunção do trofoblasto e apoptose da placenta (Del Zoppo et al., 2000).

Adicionalmente, a própria placenta reage fortemente à ativação imune tanto morfológicamente quanto imunologicamente contribuindo para o dano ao feto (Yamada et al., 2000; Dinarello, 2005). Dada a capacidade das citocinas em danificar os processos de desenvolvimento do SNC, a presença de moléculas inflamatórias no cérebro fetal pode afetar adversamente a sobrevivência de subpopulações neuronais (Martner et al., 2008). Acredita-se que a indução da resposta materna de citocinas e a cascata celular de eventos moleculares subsequentes são responsáveis pelo desenvolvimento alterado do cérebro e pelo aumento de risco para resultados de desenvolvimento anormais (Jauneikaite et al., 2012).

Embora existam evidências de que a AIM induz ao desequilíbrio de citocinas e mudanças comportamentais, pouco se sabe sobre como essas citocinas alteram o desenvolvimento cerebral. Uma explicação plausível é que a AIM leva à produção de citocinas inflamatórias que são muitas vezes prolongadas e sistêmicas no sangue materno. Estas citocinas maternas podem atingir o compartimento fetal atravessando a BP (Zaretsky et al., 2004). As citocinas resultantes na circulação fetal podem ativar a resposta imune fetal para produzir mais citocinas.

Acredita-se que a BHE do feto é mais frágil e imatura quando comparado com os adultos, tornando muito provável que citocinas geradas sistematicamente no feto ganhem acesso ao cérebro fetal (Saunders et al., 2012).

A BHE é uma estrutura especializada do SNC que controla e regula a homeostase do cérebro, medula espinhal e líquido cefalorraquidiano (LCR) com o restante dos sistemas. A barreira é formada pela presença das junções das células endoteliais que formam uma camada que reveste a superfície interior dos vasos sanguíneos e que controlam a abertura e fechamento coordenado das junções célula-célula (Munzel et al., 2008). Estas junções são compostas de diferentes complexos multiproteicos, como as junções apertadas e as junções endoteliais aderentes que são os principais reguladores da permeabilidade celular (Bazzoni e Dejana, 2004). Os agentes patogênicos só conseguem invadir o cérebro após atravessar a camada de células endoteliais da BHE e, para isso, devem apresentar estratégias para ultrapassar esta barreira (Doran et al., 2016).

O recrutamento e a interação dos periócitos com o endotélio é essencial para a formação, maturação e manutenção da BHE. Os periócitos comunicam-se diretamente com as células endoteliais através de invaginações em que um único periócito pode estar em contato com várias células endoteliais, permitindo uma camada adicional de comunicação e de estabilidade mecânica dos vasos (Armulik et al., 2005). Os periócitos são células cerebrais contráteis que regulam o fluxo sanguíneo capilar desempenhando um papel importante na manutenção da BHE com a auto-regulação e homeostase cerebral. Foi determinado em estudos *in vivo* que as interações de periócitos com células endoteliais são críticas para regular a BHE e que a ruptura dessas interações pode levar a disfunção desta barreira e a neuroinflamação (Daneman et al., 2010). Além disso, estudos *in vitro* demonstram que os periócitos expressam moléculas como o fator de crescimento endotelial vascular (VEFG) e as MMPs, que regulam a integridade da BHE (Thanabalasundaram et al., 2010).

## 1.5 METALOPROTEINASE DE MATRIZ 2 E 9

As MMPs funcionam no espaço extracelular como enzimas transmembranares ancoradas na membrana ou liberadas (McCawley e Matrisian, 2001). Consequentemente, os seus substratos são também proteínas extracelulares dentro da via secretora, presentes nas superfícies celulares ou dentro de compartimentos de tecidos celulares

(Overall e Blobel, 2007). São encontradas mais de 23 MMPs em mamíferos e a maior parte delas foi demonstrada *in vitro* por degradar ou clivar diferentes substratos de matriz extracelular (MEC) (Overall e Blobel, 2007). Um conceito predominante é que as MMPs são responsáveis pela degradação das proteínas da MEC (Page-Mccaw et al., 2007).

Estudos têm demonstrado que as MMPs atuam também sobre uma variedade de proteínas não matriciais, tais como citocinas, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos e proteínas de superfície, incluindo receptores, proteínas adesivas e de junção (Mcguire et al., 2003; Page-Mccaw et al., 2007; Van Lint e Libert, 2007). Cerca de 10% do genoma humano codifica proteínas com um peptídeo de sinal, levando a uma extensa matriz de substratos de MMPs extracelulares (Smigiel e Parks, 2017). Análises proteômicas imparciais indicam que, quando combinadas, várias MMPs podem potencialmente atuar em mais de 600 substratos (Morrison et al., 2009). Assim, não surpreende que as MMPs tenham evoluído para funcionar em uma variedade de processos fisiológicos e de diferentes doenças (Parks et al., 2004; Cauwe et al., 2007). Desta forma, as MMPs emergiram como enzimas efetoras críticas controlando uma gama de funções imunológicas, tais como na resposta inflamatória, no câncer, na remodelação tecidual e na isquemia cerebral (Parks et al., 2004; Page-Mccaw et al., 2007; Dufour e Overall, 2013).

As MMPs são frequentemente classificadas com base nos substratos que podem clivar ou degradar, como colágeno, elastina e componentes de membrana basal. Além disso, é descrito que muitos substratos de MMPs funcionam em algum aspecto da imunidade e da inflamação (Parks et al., 2004), para moldar a migração, ativação, proliferação e função dos leucócitos em resposta a uma lesão ou infecção. Recentes estudos demonstram que as MMPs não são apenas uma consequência a jusante de um processo inflamatório generalizado, mas são fatores críticos na regulação geral do padrão, tipo e duração das respostas imunes (Dufour e Overall, 2013; Smigiel e Parks, 2017).

Foi sugerido que a exposição pré-natal à infecção materna, pode levar à lesão cerebral fetal e que esta lesão pode resultar em uma cascata inflamatória fetal (Malaeb e Dammann, 2009). Isto é apoiado por evidências epidemiológicas ligando infecção materno-fetal e inflamação com lesão cerebral e encefalopatia neonatal ao nascimento (Blume et al., 2008) e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias em sangue fetal, líquido amniótico e em pacientes neonatos com lesão cerebral

(Dammann e O'shea, 2008). Além disso, a administração de uma endotoxina como o LPS em modelos animais está associada a um aumento da circulação e concentração de citocinas pró-inflamatórias e lesão da substância branca (Keogh et al., 2012). A presença de LPS ou TNF- $\alpha$  juntamente com outros mediadores inflamatórios pode estimular a produção de MMPs (Mancini e Di Battista, 2006), que foram mostradas por regularem processos imunitários específicos, como influxo e migração de leucócitos, atividade antimicrobiana, ativação de macrófagos e restauração das funções das barreiras de proteção como a BHE e BP (Smigielski e Parks, 2017). De fato, a expressão de MMP é baixa sob condições de estado imóvel, mas é marcadamente induzida durante processos inflamatórios incluindo infecção (Parks et al., 2004).

As MMPs 2 e 9, também conhecidas como gelatinase A e B, respectivamente, devido à sua capacidade de degradar a gelatina, desempenham um papel importante nos processos patológicos e fisiológicos no SNC, particularmente durante a mielinização, uma vez que a MMP 9 regula o crescimento de oligodendrócitos. MMP 9 segrega e expressa gelatinases associadas a células ativas no processo de crescimento (Dang et al., 2017). As MMPs 2 e 9 são normalmente encontrados como zimogênios latentes, que têm um local fisicamente escondido ativo, e, portanto, não podem acessar substratos. As gelatinases visam uma variedade de substratos, por exemplo, MMP 2 e 9 degradam a proteína básica de mielina (Roomi et al., 2017). O aumento na MMP 9 seguida pela MMP 2 foram relatados em pacientes em menos de 2 horas seguindo até vários anos após um acidente vascular cerebral. A uma forte relação entre o aumento de MMP 2 e o rompimento da BHE. Além disso, a administração de agentes que inibem as MMPs impede a abertura proteolítica da BHE e o aumento pós-isquêmico na permeabilidade capilar (Hung et al., 2008).

Foi demonstrado que a atividade de pró-MMP 9 e MMP 9 aumenta drasticamente após o acidente vascular cerebral isquêmico e está correlacionada espacial e temporalmente com a desagregação de BHE. A degradação da BHE é marcadamente atenuada após a inibição da MMP ou a depleção do gene MMP 9 (Rosenberg, 2017). As fontes celulares de produção de MMP são células gliais, células endoteliais, neurônios e neutrófilos pró-inflamatórios que desgranam MMPs após ativação (Hung et al., 2008).

## 1.6 FATOR NEUTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO E FATOR DE CRESCIMENTO DO NERVO

Sabe-se que durante a vida fetal ocorre o chamado período crítico do desenvolvimento, época de fragilidade na qual se formam os tecidos e os órgãos, em especial o cérebro (Kimura et al., 2016). A neurogênese, crescimento dos neurônios, existe em toda a área cerebral no decorrer dessa fase, predominantemente no giro denteado hipocampal. Assim, a evolução do hipocampo, por sua vez, influencia diretamente o aprendizado e a memória (Dhobale, 2014).

Adicionalmente, para que os neurônios se desenvolvam funcionalmente, faz-se necessário a presença de moléculas que estimulem e permitam este processo, sendo essas denominadas neurotrofinas. Na ausência dos fatores neurotróficos, as células neurais têm suas comunicações sinápticas e metabolismo diminuído (Lessmann et al., 2003). De fato, as neurotrofinas estão envolvidas na regeneração dos neurônios, na regulação da atividade das sinapses e, deste modo, mantêm a plasticidade cerebral (Kimura et al., 2016).

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 (Howerton e Bale, 2012). Diante disso, o fator neutrótico derivado do cérebro (BDNF), o fator de crescimento do nervo (NGF), e as neurotrofinas 3 e 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 sistema nervoso periférico (SNP) (Dhobale, 2014). Desse modo, alterações nos níveis das neurotrofinas podem produzir efeitos duradouros sobre processos neurotróficos que influenciam a maturação neuronal e a plasticidade na vida tardia. 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).

O BDNF é um membro das neurotrofinas e o mais difundido fator de crescimento no cérebro, exercendo efeitos na transmissão sináptica, estimulação neurogênica e está envolvido em processos de plasticidade sináptica hipocampal (Kimura et al., 2016). É amplamente expresso em

todo o SNC, principalmente no hipocampo que é descrito como um importante sítio de ação do BDNF (Binder e Scharfman, 2004), exercendo os seus efeitos pró-sobrevivência ligando-se ao seu receptor TrkB e ativando as vias de sinalização envolvendo a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/Akt, que conduz à ativação dos alvos pró-apoptóticos e da regulação da quinase por sinal extracelular, que resulta na fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta AMPc (CREB) que induz a transcrição de vários genes associados com a sobrevivência neuronal (Brunet et al., 2001; Arthur et al., 2004).

O efeito do BDNF vem sendo pesquisado em diversas doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas, pois desempenha um papel fundamental na plasticidade neuronal, memória e modula os principais processos dependentes de estímulo externo, como: aprendizado, experiências e memórias (Frey et al., 2006). Implicações sugerem que a neurogênese prejudicada das células estaminais neurais, pode estar relacionada com a diminuição dos níveis de BDNF e que ele pode ser um potencial motivo para a regulação da neurogênese na meningite bacteriana (Lian et al., 2016).

O NGF pertence à família de neurotrofinas e pode estimular o receptor TrkA e p75NTR. A estimulação destes receptores nos neurônios pode produzir efeitos opostos, nos quais a ativação de TrkA está associada à sobrevivência neuronal, enquanto que a ativação de p75NTR está implicada na apoptose neuronal (Frade et al., 1996; Nykjaer et al., 2004; Kimura et al., 2016).

Na última década, avanços foram feitos no sentido de uma melhor compreensão das ações do NGF no sistema nervoso. O NGF é uma molécula neurotrófica que possui subconjuntos simpáticos e específicos de neurônios sensoriais e está presente no cérebro (Kritas et al., 2014). O acúmulo de exsudados inflamatórios no cérebro é também mediada por NGF liberado a partir de células de tecidos residentes contendo a proteína armazenada (Ricci et al., 2010). É uma das primeiras neurotrofinas relacionadas ao desenvolvimento e manutenção de populações periféricas e neuronais centrais específicas (Kimura et al., 2016).

Esta neurotrofina medeia uma série de estados inflamatórios e autoimunes em conjunto com um acúmulo aumentado de mastócitos que parecem estar envolvidos em interações neuroimunes e inflamação tecidual (Ricci et al., 2010). O NGF pode desempenhar um papel importante na conversação entre células do sistema nervoso e do sistema imunitário, demonstrando a sua função não apenas no sistema nervoso.

Foi relatado que os mastócitos e o NGF têm capacidade para integrar respostas imunológicas neuro-endócrinas na fisiopatologia do SNC (Berry et al., 2012).

## 1.7 ALTERAÇÕES DO NEURODESENVOLVIMENTO E AIM

Evidências científicas suportam a hipótese de que as alterações nos níveis de expressão de citocinas durante o desenvolvimento precoce do cérebro estão associadas a transtornos psiquiátricos. Estudos epidemiológicos relataram que níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IL-8 no soro materno são associados a maiores probabilidades de psicose na prole (Brown et al., 2004), enquanto que os níveis mais elevados de citocinas anti-inflamatórias maternas, IL-4, IL-5 e IL-13, estão associados com probabilidade diminuída de psicose (Abelli et al., 2010). Foi observado que após injeção de LPS em ratas prenhas, houve restrição do crescimento fetal, o qual foi avaliado por peso do feto diminuído, um menor comprimento da cabeça-nádega e atraso na ossificação esquelética (Kirsten et al., 2010). Além disso, houve aumento da morte celular, diminuição da proteína básica de mielina, diminuição do número de oligodendrócitos imaturos e seus precursores, indicando lesões da substância branca em ratos adultos jovens expostos ao LPS (Wang et al., 2009).

Uma hipótese predominante é que os níveis alterados de expressão de moléculas inflamatórias no compartimento fetal em resposta à ativação imune podem interromper o desenvolvimento do cérebro e a conectividade neural, o que, por sua vez, pode ter efeitos em longo prazo sobre as funções mentais do indivíduo tardiamente na vida (Gavish et al., 1986; Knuesel et al., 2014).

A exposição de células cerebrais à citocinas pode alterar as funções de neurotransmissores como serotonina (5-HT), dopamina e glutamato, o que por sua vez pode desencadear comportamento doentio, compreendendo alterações de apetite, fadiga, emoção, cognição, aprendizagem e memória (Wodarz et al., 1998; Soreni et al., 1999). Assim, é provável que as alterações das citocinas no contexto da infecção materna conduzam a efeitos a longo prazo sobre a função cerebral que aumentariam o risco de desordens psiquiátricas (Estes e Mcallister, 2016).

Estudos têm demonstrado que a AIM é acompanhada de alterações nas citocinas cerebrais ao longo do desenvolvimento e na idade adulta da prole de uma maneira específica (Garay et al., 2013; Estes e

Mcallister, 2015). No córtex frontal e cingulado, as citocinas pró-inflamatórias são encontradas aumentadas no momento do nascimento e na prole adulta de camundongos expostos a AIM (Garay et al., 2013). Alterações na morfologia cerebral, como reduzida espessura cortical, diminuição do hipocampo, córtex pré-frontal e estriado, aumento dos ventrículos, bem como, redução dos neurônios de Purkinje no cerebelo, são comumente observados em descendência de adultos esquizofrênicos e autistas (Shi et al., 2009; Piontkewitz et al., 2011; Patrich et al., 2016).

Além disso, um estudo relatou redução da densidade de células dendríticas e proteínas sinápticas envolvidas na neurotransmissão de 5-HT e dopamina, dois dos principais neurotransmissores envolvidos no sistema de recompensa, prazer e emoção (Coiro et al., 2015), que em partes são, regulados por citocinas tais como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Luchicchi et al., 2016; Miller e Raison, 2016). Estas citocinas também demonstraram alteração na liberação de dopamina e 5-HT a partir de neurônios que podem estar na base das manifestações de perturbações psiquiátricas (Miller e Raison, 2016). A redução da neurotransmissão de 5-HT e dopamina são comumente observadas nos cérebros da prole adulta exposta a AIM (Baharnoori et al., 2013; Depino, 2015).

A sinalização do ácido gama-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor envolvido no controle da atividade de neurônios altamente excitados, é encontrada reduzida no córtex pré-frontal mediano e no giro dentado ventral da prole exposta a AIM (Richetto et al., 2014; Canetta et al., 2016). Estas anormalidades cerebrais observadas na prole adulta podem ser um produto da ativação da resposta inflamatória associada às citocinas maternas (Scola e Duong, 2017).

Recentes pesquisas com humanos apoiam fortemente o papel das alterações inflamatórias na fisiopatologia dos distúrbios psiquiátricos como, alterações nos níveis de citocinas no sangue de indivíduos com esquizofrenia (Miller et al., 2011; Fillman et al., 2016), transtorno bipolar (Modabbernia et al., 2013) e autismo (Masi et al., 2015). As alterações que são encontradas partilhadas entre os distúrbios psiquiátricos incluem níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-1 $\beta$  (Mousa e Bakhiet, 2013). Evidência de alterações nos níveis de citocinas também é demonstrada em estudos com tecidos cerebrais humanos *post-mortem* obtidos de indivíduos esquizofrênicos (Scola e Duong, 2017).

A ativação imunológica dentro do compartimento materno provavelmente influencia o desenvolvimento do SNC fetal por meio de

mediadores inflamatórios encontrados no sangue e líquido amniótico das mães de pacientes esquizofrênicos e autistas. A AIM de alguma forma induz alterações em múltiplas citocinas dentro do cérebro fetal em poucas horas (Meyer, 2014; Estes e Mcallister, 2015). Embora a AIM provoque inflamação na mãe, os perfis limitados de citocinas que foram avaliados no cérebro fetal não significam por si uma resposta inflamatória clássica (Harvey e Boksa, 2012; Estes e Mcallister, 2014).

Várias citocinas maternas já foram identificadas como mediadores críticos da AIM em fenótipos relacionados às doenças em descendentes. A injeção de uma única citocina inflamatória IL-6, IL-17 ou IL-2 é suficiente para induzir vários comportamentos semelhantes à esquizofrenia e autismo na prole (Meyer, 2014; Choi et al., 2016). No entanto, pouco se sabe sobre como essas citocinas maternas alteram o desenvolvimento cerebral. Uma possibilidade é que a AIM leva a mudanças duradouras na expressão de moléculas imunes conhecidas por regular a conectividade e função neural na prole (Estes e Mcallister, 2015). As alterações podem ser agudas, refletindo a natureza intensidade e duração da infecção, ou crônica por meio de mudanças epigenéticas que podem ser sinérgicas com outros fatores de risco em diferentes estágios de vida (Estes e Mcallister, 2016).

Na verdade, os níveis de citocinas são alterados ao longo do desenvolvimento e na idade adulta no cérebro da prole com AIM (Garay et al., 2013; Estes e Mcallister, 2015). Estas citocinas são susceptíveis de regular a expressão de outras classes de moléculas imunes nos neurônios, incluindo as moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHCI). No sistema imunológico, os níveis de MHCI são controlados por citocinas como um passo importante na resposta imune (Shatz, 2009). No cérebro saudável, o MHCI é encontrado nos neurônios, onde regula negativamente a formação de sinapses e a plasticidade sináptica necessária para a poda sináptica dependente da atividade (Glynn et al., 2011).

Alterações na sinaptogênese e poda sináptica estão associadas com uma série de distúrbios do neurodesenvolvimento e existe a hipótese de que elas podem desempenhar um papel central na etiologia da esquizofrenia e do autismo (Tang et al., 2014; Sekar et al., 2016). A AIM causa alterações nos níveis de MHCI nos neurônios da prole neonatal (Coiro et al., 2015) e o aumento de MHCI no nascimento é necessário para a indução de déficit neuronal em recém-nascidos após AIM (Elmer et al., 2013). O MHCI é uma das várias proteínas imunes presentes na sinapse capazes de mediar as respostas frente a uma

infecção enquanto simultaneamente regulam a plasticidade dependente da atividade e a formação do circuito. Essas proteínas versáteis - defesa imunológica e estrutura da sinapse - são provavelmente as moléculas responsáveis por mudanças no desenvolvimento do cérebro em resposta à infecção materna (Voineagu e Eapen, 2013).

Se as moléculas imunes atuam através de vias similares no cérebro e a mesma cascata intracelular está presente, o que permanece uma questão aberta, então é possível que a sinalização imune nos neurônios possa convergir sobre a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (Caccamo et al., 2014). No sistema imunológico, a mTOR atua como um centro regulador que integra vias de sinalização intracelular - incluindo citocinas, fatores tróficos e proteínas sinápticas - muitas das quais estão alteradas no cérebro da prole exposta a AIM, bem como indivíduos com esquizofrenia, autismo, transtorno bipolar e Alzheimer (Caccamo et al., 2014; Sahin e Sur, 2015).

O desequilíbrio da síntese de proteína através de alterações na via da mTOR tem sido implicada em várias formas monogênicas de autismo, assim como uma mutação no gene DISC-1 está relacionada com o desenvolvimento da esquizofrenia em modelos animais (Kim et al., 2009; Sahin e Sur, 2015). A hiper ou hipotativação da sinalização da mTOR transmite alterações específicas da mutação na morfologia neuronal e na plasticidade sináptica, assim como a síntese de muitas proteínas sinápticas e receptores de glutamato, que são características comuns em prole expostas a AIM (Santini e Klann, 2014).

## 1.8 ATIVAÇÃO IMUNE E ESQUIZOFRENIA

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico grave que afeta 1% população mundial e os pacientes vivem em média de 12 a 15 anos a menos de que o tempo médio de vida. O início da doença é geralmente no final da adolescência ou no início da idade adulta (Frohlich e Van Horn, 2014). Existem consistentes associações epidemiológicas entre a ativação imune materna e a esquizofrenia. Foram relatadas infecções com diversos agentes infecciosos maternos incluindo o vírus influenza, o *Toxoplasma gondii*, o vírus *Herpes simplex* tipo 2, e infecções bacterianas (Izadpanah et al., 2014). O aumento da expressão de citocinas, incluindo IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e níveis da proteína C reativa, durante a gravidez também está associado com um risco aumentado de esquizofrenia na prole (Sen et al., 2008).

A exposição pré-natal à infecção pode contribuir para alterações morfológicas do SNC, incluindo anormalidades ultrassonográficas como o alongamento do septo *cavum* pelúcido em pacientes com esquizofrenia e nos ventrículos intracranianos associados à exposição pré-natal ao citomegalovírus. Estudos revelaram diminuição volumétrica no córtex entorrinal e cingulado em adultos com esquizofrenia e que foi associada com a exposição fetal a elevados níveis de IL-8 (Torrey et al., 2012). A ativação glial a nível celular e molecular foi demonstrada, uma vez que achados revelaram alterações neuropatológicas na morfologia microglial e nos níveis de proteínas, incluindo o aumento da expressão dos marcadores microgliais CD68 e HLA-DR em pacientes com esquizofrenia em comparação com controles saudáveis (Schmidt-Kastner et al., 2012)

Os sistemas de neurotransmissores mais frequentemente implicados na patogênese da esquizofrenia são o dopaminérgico, glutamatérgico e o serotoninérgico (Steeds et al., 2015). A hipótese dopaminérgica responsável pelos sintomas positivos da esquizofrenia que incluem alucinações visuais, auditivas, delírios, discursos e comportamentos amplamente desorganizados ou catatônicos (Lau et al., 2013). Os indivíduos com esquizofrenia demonstraram ter uma função dopaminérgica anormal, com aumento da liberação de dopamina após administração de anfetaminas, elevação da dopamina sináptica e aumento da absorção do marcado de microglia 6-[(<sup>18</sup>F)]fluoro-L-dopa (Abi-Dargham et al., 2009; Howes et al., 2012). A teoria dopaminérgica fornece uma explicação para alguns dos sintomas delirantes positivos da psicose devido à transmissão dopaminérgica meso-límbica hiperativa (Kapur et al., 2005).

O sistema serotoninérgico pode estar envolvido na formação de sintomas psicóticos. O suporte vem da observação de que alucinógenos como o LSD e a psilocibina são agonistas dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Vollenweider e Geyer, 2001). Essas drogas induzem psicopatologias que incluem agitação, ansiedade, alucinações e ilusões visuais, que são semelhantes aos sintomas observados nos primeiros episódios psicóticos da doença (Fletcher e Honey, 2006). Além disso, estes fármacos interrompem a inibição de pré-pulso (IPP) através da estimulação direta dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Quednow et al., 2012), levam a alterações das redes cerebrais envolvidas durante o repouso e o desempenho da tarefa ativa (Carhart-Harris et al., 2013), e conduzem ao aumento da liberação de glutamato (Muschamp et al., 2004), semelhante aos efeitos observados em pacientes com psicose. É interessante notar que o

bloqueio dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> inibem os efeitos dos antagonistas dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), sugerindo que pelo menos alguns dos efeitos tipo psicose do antagonismo do receptor NMDA podem ser mediados através de mecanismos serotoninérgicos (Breese et al., 2002).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e é controlado pelos receptores NMDA, estes controlam a plasticidade sináptica e memória (Neill et al., 2010). Além do receptor NMDA, foram descritas outras duas classes de receptores de glutamato ionotrópico, o receptor ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazoleproprionico (AMPA) e o receptor de cainato. O aminoácido glicina é um co-agonista necessário para a ativação do NMDA (Thomas et al., 2017). Na maior parte das sinapses, o glutamato é o agonista liberado a partir do terminal pré-sináptico. Outros agonistas do local de ligação da glicina incluem D-serina e D-cicloserina. A ativação do local de ligação da glicina é necessária, mas não suficiente para a abertura do canal. É um local modulatório alostérico que regula o momento e a taxa de dessensibilização do canal (Frohlich e Van Horn, 2014).

Dessa forma, a hipótese glutamatérgica é associada com os sintomas negativos, que incluem o isolamento social, apatia, anedonia e alogia. Além disso, um potencial mecanismo molecular que influencia a cognição na esquizofrenia está relacionado com a via do metabolismo do glutamato (Jia et al., 2010). Os sintomas cognitivos envolvem distúrbios nas funções executivas, comprometimento da memória de trabalho e incapacidade de sustentar a atenção (Sen et al., 2008).

Antagonistas de NMDA têm a capacidade de mimetizar o comprometimento cognitivo e os sintomas negativos da esquizofrenia (Coyle e Tsai, 2004; Neill et al., 2010). A hipótese evoluiu a partir de estudos envolvendo antagonistas de receptores NMDA, como a cetamina (CET) administrada a indivíduos saudáveis. Estudos demonstraram que a administração de CET mimetiza sintomas positivos e negativos da esquizofrenia (Adler et al., 1999), além de demonstrar aumentar o glutamato, indicando que a hipofunção do receptor 4 de NMDA e a transmissão anormal de glutamato podem estar associadas com a esquizofrenia (Stone et al., 2012),

A CET é conhecida como um anestésico dissociativo (Corssen e Domino, 1966), com propriedades analgésicas, anestésicas e possíveis ações antidepressivas, ainda em investigação (Berman et al., 2000; Aroni et al., 2009; Niesters et al., 2012). A CET é utilizada internacionalmente como anestésico geral na medicina humana e

veterinária (Rowland et al., 2005). É reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como um medicamento essencial para qualquer sistema de saúde básica (Organização Mundial da Saúde, 2011).

Além dos fortes fatores de risco genético com estimativas de herdabilidade de 80%, fatores ambientais adversos durante o desenvolvimento e estágios peripuberais tem papéis fundamentais na etiologia da doença (Huang et al., 2008). Os medicamentos antipsicóticos são projetados para direcionar os sintomas positivos, entretanto, os sintomas negativos e cognitivos respondem mal ao tratamento (Buchanan et al., 1998). Problemas cognitivos, tais como déficits em áreas de funcionamento executivo, incluindo memória de trabalho e inibição, bem como memória e atenção, são uma característica central da esquizofrenia (Minzenberg et al., 2009).

Os déficits cognitivos relacionam-se a uma qualidade de vida mais debilitante. Intervenções como terapias psicológicas, tratamento comunitário, treinamento de habilidades, remediação cognitiva e emprego apoiado estão atualmente disponíveis para indivíduos com esquizofrenia, embora estudos tenham mostrado que isso tem um efeito limitado na melhoria da qualidade de vida, funcionamento social ou cognitivo (Pilling et al., 2002). Os pacientes com esquizofrenia são avaliados em um a dois desvios padrão abaixo dos escores de controles saudáveis em termos de função cognitiva (Uggerby et al., 2011), e os sintomas cognitivos estão presentes em um nível mais alto em parentes biológicos não afetados em relação à população em geral, indicando uma contribuição genética para o prejuízo (Lewis et al., 2003). Como tal, um foco-chave na literatura tem sido a de olhar para potenciais vias genéticas para obter uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares por trás da disfunção cognitiva na esquizofrenia (Jia et al., 2010).

Há evidências de que vários sistemas de neurotransmissores são afetados na prole adulta exposta à AIM. Alterações em sistemas dopaminérgicos têm sido amplamente relatadas, mas não são consistentes com relação a se eles relatam perda de neurônios dopaminérgicos, inervação dopaminérgica ao núcleo *accumbens*, estriado e córtex pré-frontal (Meyer et al., 2008; Romero et al., 2010) ou um aumento no número de neurônios dopaminérgicos e liberação de dopamina (Zuckerman et al., 2003). Alterações em sistemas glutamatérgicos também foram relatadas incluindo uma proporção aumentada de fluxo de receptor de AMPA para NMDA no hipocampo (Roumier et al., 2008), diminuição da expressão da subunidade do

receptor NMDA, NR1 (Meyer et al., 2008) e prejuízo da potencialização a longo prazo (LTP) hipocampal (Lante et al., 2008).

Estudos tem sugerido que a exposição ao LPS pré-natal ou Poly I:C resultam na diminuição da 5-HT em várias regiões do cérebro (Fatemi et al., 2008; Wang et al., 2009). Os estudos funcionais são geralmente consistentes com o aumento da liberação de dopamina no estriado (Zuckerman et al., 2003), diminuição da transmissão glutamatérgica mediada por NMDA (Roumier et al., 2008) e diminuição da transmissão GABAérgica no hipocampo (Ducharme et al., 2012). Dados estes encontrados em modelos animais e que são consistentes com anormalidades encontradas em pacientes adultos com esquizofrenia (Da Silveira et al., 2017).

## 1.9 JUSTIFICATIVA

Estudos epidemiológicos têm demonstrado evidências de que a infecção pré-natal está associada com um aumento no risco para o desenvolvimento de vários transtornos psiquiátricos e neurológicos, sendo mais proeminente esquizofrenia, autismo e paralisia cerebral. Embora essas associações forneçam evidências de que a infecção pré-natal pode contribuir para o desencadeamento destas doenças, elas não provam o nexo de causalidade. Modelos animais apontam evidências que uma infecção pré-natal pode realmente causar alterações transitórias ou permanentes nas funções do SNC e que mecanismos levariam a essas alterações.

Infecção com a consequente ativação imune materna é o foco do presente estudo utilizando modelo animal no intuito de compreender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no papel da resposta imune precoce na etiologia de alterações do desenvolvimento neurológico.

Neste estudo hipotetizou-se que a ativação imune no período gestacional pode resultar em alterações no perfil inflamatório e exacerbar sintomas semelhantes à esquizofrenia na vida adulta da prole.

## 2. OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da AIM em ratas Wistar prenhas e em seus fetos e avaliar os efeitos comportamentais da prole adulta de ratas Wistar induzidas ao LPS no período pré-natal.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-18, MIP-3a, TNF- $\alpha$ , IL-7, IL-10, MIP-1a e EPO em 6, 12 e 24 horas, no cérebro de fetos após indução de LPS nas ratas prenhas no 15º dia gestacional.
- Avaliar os níveis de TBARS e grupamentos carbonil no líquido amniótico de ratas Wistar prenhas no 15º dia de gestação e no cérebro de fetos em 6, 12 e 24 horas após indução de LPS no período pré-natal.
- Avaliar a atividade da SOD e CAT no líquido amniótico de ratas Wistar prenhas no 15º dia de gestação e no cérebro de fetos em 6, 12 e 24 horas após indução de LPS no período pré-natal.
- Avaliar a expressão da MPPs 2 e 9 através no líquido amniótico de ratas Wistar prenhas no 15º dia de gestação e no cérebro de fetos em 6, 12 e 24 horas após indução de LPS no período pré-natal.
- Avaliar a integridade da BHE no hipocampo, córtex cerebral de ratas Wistar prenhas no 15º dia de gestação em 6, 12 e 24 horas após indução de LPS no período pré-natal.
- Avaliar a integridade da BP na placenta e cérebro de fetos em 6, 12 e 24 horas após indução de LPS no período pré-natal.
- Avaliar a memória de habituação e reconhecimento de objetos novos na vida adulta da prole de ratas prenha submetidas a injeção de LPS no 15º dia de gestação, e submetidas ao modelo animal de esquizofrenia induzido por CET.
- Avaliar a atividade locomotora na vida adulta da prole de ratas prenha expostas ao LPS no 15º dia de gestação, e submetidas ao modelo animal de esquizofrenia induzido por CET.
- Avaliar a inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto na vida adulta da prole de ratas prenha expostas ao LPS no 15º dia de gestação, e submetidas ao modelo animal de esquizofrenia induzido por CET.

- Avaliar os níveis de BDNF e NGF no hipocampo e córtex cerebral da prole adulta de ratas prenhas expostas ao LPS e submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por CET.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Experimental, Laboratório de Neurociências e Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), SC, Brasil e no Centro de Psiquiatria Translacional, The University of Texas Medical School at Houston (UTHealth), TX, USA.

#### 3.2 ANIMAIS

Foram incluídos no estudo um total de 466 ratos Wistar. Desses, 178 eram fêmeas prenhas (com peso corporal de 250 a 300 g) e seus respectivos fetos e 288 machos adultos da prole dessas ratas para os testes comportamentais, todos provenientes do Biotério da UNESC, onde permaneceram alojados em local fresco e arejado em um ciclo de 12 h claro/escuro, a uma temperatura de 23 °C +/- 1 °C, com alimento e água sempre disponíveis.

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais da UNESC, protocolos de aprovação 114/2013-2 e 066/2016-1 em anexo.

#### 3.3 PREPARAÇÃO E EXPOSIÇÃO AO LPS

Esfregaços vaginais diários foram coletados para monitorar o ciclo estral das fêmeas, que passaram por um período de 24 horas de acasalamento. A presença de espermatozóide tomada na manhã seguinte representou o zero (0) dia de gestação. O peso das ratas foi obtido para confirmar a gravidez.

No 15º dia gestacional as ratas receberam uma injeção intraperitoneal (i.p) de LPS (*Escherichia coli* 05: B55) (LPS; 0,25 mg/kg; Sigma, St. Louis, MO), diluído em 1 mg/ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS), e o mesmo volume equivalente de PBS foi injetado nos animais do grupo controle (Oskvig et al., 2012). Os animais foram monitorados diariamente após a injeção de LPS para verificação de sinais de hemorragia vaginal, perda de peso ou comportamento doentio, como, aumento da temperatura e imobilidade.

### 3.4 MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA

Um modelo consistente na literatura utilizado em modelo animal de esquizofrenia é o de cloridrato de CET. Esse é um anestésico dissociativo que afeta a atividade glutamatérgica através do bloqueio do receptor NMDA e é amplamente aceito para mimetizar uma condição humana de psicopatologia associada com o grupo de alterações da esquizofrenia (Steeds et al., 2015).

A CET (Vetaset®) foi administrada na vida adulta dos animais durante sete dias precedentes aos testes comportamentais, uma vez ao dia, nas doses de 5, 15 e 25 mg/kg via i.p, preparada em solução salina estéril no volume de 1 ml/kg de peso corporal (Zugno et al., 2013). No último dia de tratamento a CET foi administrada 30 minutos antes dos testes comportamentais. As doses foram administradas conforme o respectivo peso de cada animal.

### 3.5 MODELO EXPERIMENTAL

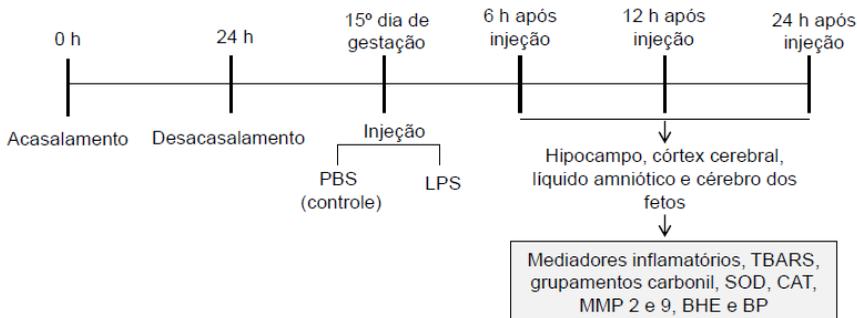
#### 3.5.1 Protocolo experimental para as análises imunoquímicas

Ratas Wistar prenhas no 15º dia de gestação foram divididas em dois grupos experimentais: grupo LPS e grupo controle. As ratas foram anestesiadas com cloridrato de CET (6,6 mg/kg) e cloridrato de xilazina (0,3 mg/kg) e submetidas a uma incisão abdominal para a retirada dos fetos em 6, 12 e 24 h após a administração de LPS (Oskvig et al., 2012).

Após a remoção dos fetos, os mesmos foram decapitados e os cérebros retirados para as análises dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-18, MIP-3a, TNF- $\alpha$ , IL-7, IL-10, MIP-1a e EPO. Cada tempo de morte teve ambos os grupos experimentais com um número de 12 ratas para cada tempo (6 animais LPS e 6 animais controle), totalizando 36 ratas.

Para outro desenho experimental novas ratas prenhas foram utilizadas, divididas nos mesmos tempos acima descritos. O líquido amniótico e o cérebro dos fetos foram removidos para dosagens dos níveis de medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), grupamentos carbonil, atividade da atividade da SOD, catalase (CAT) e expressão da MMPs 2 e 9 em 6, 12 e 24 h após a injeção. Com um número de 12 ratas para cada tempo de investigação, totalizando 36 ratas.

Para avaliação da BHE e BP ratas prenhas foram mortas também nos mesmos tempos e grupos acima descritos, com um número de 12 ratas por tempo, totalizando 36 ratas. As ratas foram decapitadas e o hipocampo e córtex cerebral removidos para avaliação da integridade da BHE. A placenta e o cérebro dos fetos foram retirados após incisão abdominal para a avaliação da integridade da BP (figura 2).



**Figura 2.** Representação do tempo de indução do LPS, morte dos animais e retirada das estruturas para as análises imunoquímicas.

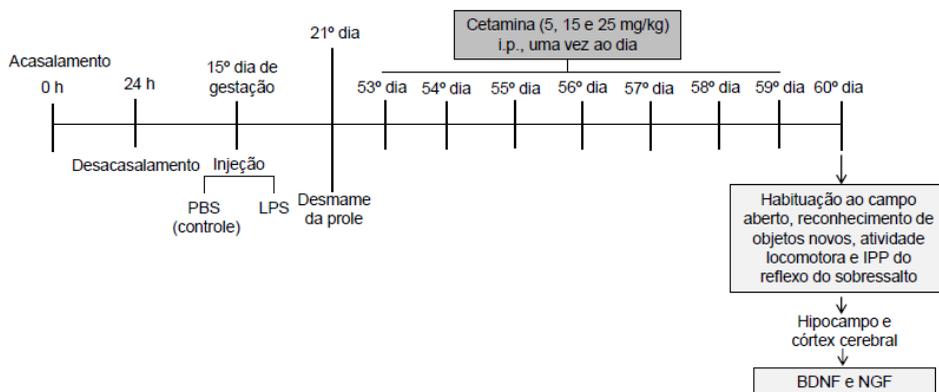
### 3.5.2 Protocolo experimental para os testes comportamentais

Para os testes comportamentais foram utilizadas 35 ratas prenhas no 15º dia de gestação para o grupo LPS e 35 ratas prenhas para o grupo controle (PBS), (o número de ratas por grupo para a realização do experimento foi uma estimativa de acordo com a média encontrada na literatura de que cada ninhada tem de 4 a 5 ratos machos). Após a injeção de LPS ou PBS, por via i.p, as ratas retornaram para suas caixas moradias onde permaneceram até o nascimento das ninhadas (entre o 21º a 22º dia de gestação). Após o nascimento as ratas permaneceram com os filhotes até o desmame, realizado no 21º dia pós-natal, quando os ratos machos foram separados e isolados das fêmeas e permaneceram até o 53º dia pós-nascimento. Todos os ratos machos das ninhadas foram utilizados para os testes comportamentais.

Ao completarem 53 dias de vida, a prole proveniente das ratas foi submetida ao modelo animal experimental de esquizofrenia e subdivididas em oito grupos experimentais, os animais provenientes das ratas controle foram divididos em: controle/salina, controle/CET 5

mg/kg, controle/CET 15 mg/kg, controle/CET 25 mg/kg. Os animais provenientes das ratas LPS foram divididos em: LPS/salina, LPS/CET 5 mg/kg, LPS/CET 15 mg/kg e LPS/CET 25 mg/kg (n = 12 animais por grupo). Após sete dias de tratamento (53<sup>o</sup> ao 59<sup>o</sup>), os animais realizaram os testes comportamentais de habituação ao campo aberto e reconhecimento de objetos novos (n = 96 para a realização dos dois testes), atividade locomotora (n = 96 animais) e teste de IPP do reflexo de sobressalto (n = 96 animais). Totalizando 288 animais para a realização dos quatro testes comportamentais.

Após os testes comportamentais os animais foram mortos por decapitação e seis animais por grupo foram escolhidos aleatoriamente e o hipocampo e córtex cerebral foram removidos para as dosagens de BDNF e NGF (figura 3).



**Figura 3.** Representação do tempo de indução do LPS, tempo de tratamento e a realização dos testes comportamentais.

### 3.6 IMUNOQUÍMICA

#### 3.6.1 Análise das citocinas

Os níveis de citocinas foram avaliados utilizando kits de imune ensaio fluorescente multiplex (Bio-Plex Pro™ Rat Cytokine 24-Plex Assay). A plataforma xMAP baseou-se nas regras utilizadas na fluorescência e nos pares de anticorpos. Trata-se de reagentes sensíveis, específicos e amplamente utilizados, obtidos por numerosos fabricantes e os dados recolhidos utilizando kit multiplex xMAP são amplamente referenciados

na literatura em estudos nos quais múltiplas proteínas são analisadas simultaneamente. Os extratos celulares totais do cérebro foram homogeneizados em tampão de diluição de lise de acordo com as instruções do fabricante, seguido de centrifugação a 4 °C durante 10 min a 10.000 rpm. Inicialmente, alíquota de 50 µl da amostra foi transferida para os poços da placa que foi lavada 2 vezes e adicionado 100 µl de tampão de ensaio a cada poço. Após, foram adicionados 50 µl de padrão ou controle em cada poço. A placa foi incubada em um agitador de placas (850 rpm) no escuro à temperatura ambiente (TA) durante 60 min. A placa foi então colocada no separador magnético e incubada durante 60 s. O sobrenadante foi cuidadosamente removido de cada poço por inversão manual. As placas foram lavadas 3 vezes e adicionado 100 µl de tampão de bloqueio em cada poço para assegurar a ausência de quaisquer anticorpos indesejáveis ou não especificamente ligados. Após este protocolo, foi adicionado 25 µl de um anticorpo de detecção a cada poço. A incubação foi novamente conduzida no escuro e a TA em um agitador de placas (850 rpm) durante 30 min, e a lavagem foi realizada como anteriormente descrito. Finalmente, foram adicionados 50 µl de estreptavidina a cada poço. A placa foi incubada em um agitador de placas (850 rpm) no escuro a TA durante 10 min. O sobrenadante foi cuidadosamente removido por inversão manual, e a lavagem foi realizada como anteriormente descrito. Adicionou-se 125 µl de tampão de lavagem a cada poço e colocou-se a placa sobre um agitador durante aproximadamente 30 s para se conseguir uma agitação leve das amostras. As amostras foram feitas em duplicata utilizando um sistema Bio-Plex (Bio-Plex 200 Systems, BioRad, Hercules, CA) e a análise dos dados foi conduzida no Bio-Plex Manager 4.0 utilizando um modelo de regressão logística de 5 parâmetros.

### **3.6.2 Avaliação dos níveis de TBARS, grupamentos carbonil de proteínas e atividade de SOD e CAT**

*Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):* Como índice de peroxidação lipídica foi medido níveis de TBARS durante uma reação ácida aquecida como previamente descrito (Draper e Hadley, 1990). Brevemente, as amostras obtidas foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético 10% e 1ml de ácido tiobarbitúrico, fervidas por 15 minutos e após a quantidade de TBARS foi determinada pela absorbância em 535 nm.

*Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonila:* O dano oxidativo em proteínas foi determinado pela medida de grupos carbonila conforme previamente descrito (Levine et al., 1990). Brevemente, as amostras obtidas foram precipitadas e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilhidrazina. Os grupos carbonila foram medidos pela absorbância em 370 nm.

*Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT):* a atividade da CAT foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio em 240 nm conforme previamente descrito (Aebi, 1984; Bannister e Calabrese, 1987). A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente, conforme previamente descrito (Lissi et al., 1995).

### **3.6.3 Avaliação das MPPs 2 e 9**

Para executar as o Western blotting, as amostras foram primeiro homogeneizadas em tampão Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% (p/v) de SDS, 10% (v/v) de glicerol). As concentrações de proteínas foram analisadas pelo método de Lowry (1951), e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína, foi utilizado 30 µg para a eletroforese em gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando gel 10-15%. As proteínas separadas foram, em seguida, transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando tampão contendo Tris 20 mmol/L, glicina 150 mmol/L, metanol 20% (v/v), SDS 0,02% (p/v) (pH 8,2) em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada. A carga de proteína e a eficiência da transferência foram verificadas com coloração Ponceau S. Após, os sítios de proteínas inespecíficos foram bloqueados por uma hora de incubação com solução bloqueadora (5% albumina) em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20. Posteriormente, as membranas foram incubadas durante a noite a 4 °C com o anticorpo para MMP-2 (Abcam - 86607) e MMP-9 (Abcam - 137867). Após a incubação, o anticorpo primário foi removido e as membranas foram lavadas quatro vezes durante 15 min. Após a lavagem, os anticorpos secundários conjugados com peroxidase (diluição 1:2500) foram aplicados à membrana e uma incubação por 2 h à temperatura ambiente foi realizada e as membranas foram lavadas novamente. As bandas imunorreativas foram detectadas através de fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS - Bio-Rad) utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West

Pico (Carr et al.). A quantificação das bandas foi avaliada utilizando-se o Software Image Lab (Bio-Rad). Seguidamente, a membrana foi submetida ao processo de *'stripping'* e incubada com um anticorpo contra  $\beta$ -Actina (sigma - A2228) na presença de 5% de leite. Após a lavagem, os anticorpos secundários conjugados com peroxidase (diluição 1:10000) foram aplicados à membrana e uma incubação por 1 hora à temperatura ambiente foi realizada e as membranas lavadas novamente. Finalmente, as bandas imunorreativas foram detectadas através de fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS-Bio-Rad) utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Carr et al.). A densitometria das bandas foi avaliada utilizando-se o Software Image Lab (Bio-Rad). SeeBlue® Plus2 Prestained Standard (Invitrogen) foi utilizado como um marcador de peso molecular para certificar-se de que as faixas corretas foram analisadas para MMP-2 e MMP-9.

### **3.6.4 Integridade da BHE e BP**

A integridade da BHE e da BP foi avaliada através de extravasamento do corante azul de Evans (Smith e Hall, 1996) em 6, 12 e 24 h após indução do LPS em ratas prenhas no 15º dia de gestação. O corante azul de *Evan's* a 2% foi dissolvido em solução salina de cloreto de sódio a 0,85% e injetado 1 ml via intravenosa de azul de Evans, 1 h antes dos animais serem mortos (Weiss et al., 2009). Os animais foram anestesiados e decapitados, o hipocampo e córtex cerebral foram removidos e uma incisão abdominal foi realizada para a retirada da placenta e dos fetos (Weiss et al., 2009). Em seguida as amostras foram homogeneizadas em ácido tricloroacético (TCA) 50% (pH 7,4) e centrifugadas em 10.000 rpm a 4 °C durante 20 minutos, o corante extraído foi diluído com etanol (1:3), e determinada a sua fluorescência (excitação em 620 nm e emissão a 680 nm) com um espectrofotômetro de luminescência (Hitachi 650-40, Tóquio, Japão). O teor de azul de *Evan's* no tecido foi quantificado a partir de uma linha padrão linear derivada de quantidades conhecidas do corante e expressa por grama de tecido (Smith e Hall, 1996).

### **3.6.5 Avaliação dos níveis de BDNF e NGF**

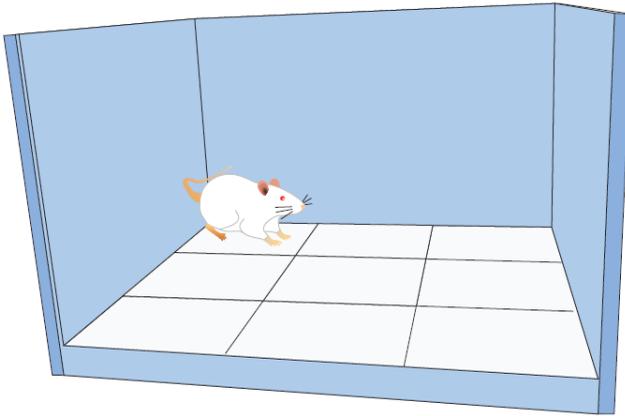
Os níveis de BDNF e NGF foram medidos por ensaio imunoenzimático, utilizando-se kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante (NGF e BDNF de Chemicon, EUA).

Resumidamente, fatias de cérebro foram homogeneizadas em 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 24 h com as amostras diluídas 1:2 em diluente de amostra. Então, as placas foram lavadas quatro vezes com diluentes amostras. Anticorpo monoclonal de coelho anti-BDNF e anticorpo monoclonal de coelho anti-NGF diluído 1:1000 em diluente de amostra foram incubadas por 3 h em temperatura ambiente. Após a lavagem, uma segunda incubação com anti-coelho conjugado 1:1000 do anticorpo peroxidase diluída para 1 h em temperatura ambiente foi realizado. Após a adição de estreptavidina-enzima-substrato, e a quantidade de BDNF e NGF foi determinada para absorbância de 450 nm. A curva padrão demonstrou uma relação direta entre a densidade óptica (DO) e concentração de BDNF e NGF. A proteína total foi medida pelo método de Lowry (1951) usando soro albumina bovina como padrão (Lowry et al., 1951).

### 3.7 TESTES COMPORTAMENTAIS

#### 3.7.1 Habituação ao Campo Aberto

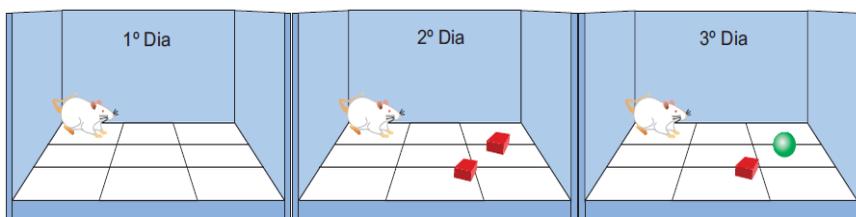
O teste comportamental de habituação ao campo aberto foi realizado em um aparato com 40 x 60 cm rodeado por paredes de 50 cm de altura sendo 3 paredes de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto foi dividido em 9 retângulos iguais por linhas pretas (figura 4). Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante traseiro esquerdo, e deixados explorar o campo por 5 min (sessão de treino). Imediatamente após isso, os animais foram levados de volta para a sua gaiola, e 24 h mais tarde foram novamente submetidos a uma sessão de campo aberto semelhante (sessão de teste). Cruzamento das linhas pretas e levantamentos realizados em ambas as sessões foram contados. A diminuição do número de cruzamentos e levantamentos entre as duas sessões foi tomado como uma medida da retenção de habituação (Vianna et al., 2000).



**Figura 4.** Teste comportamental de Habituação ao campo aberto. Fonte Laboratório de Microbiologia Experimental/UNESC. Figura desenvolvida por Allan Collodel, 2017.

### **3.7.2 Reconhecimento de objetos novos**

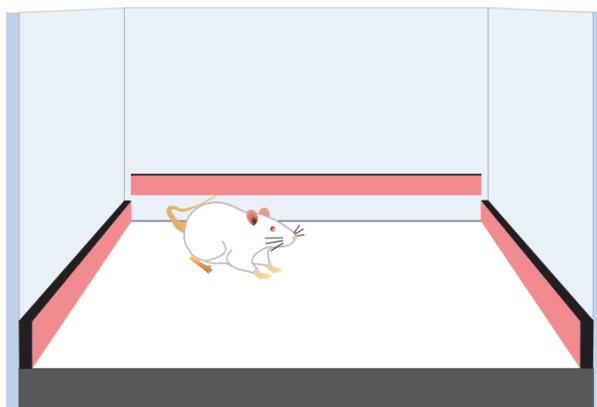
No primeiro dia foi realizado o treino, onde o animal é colocado cuidadosamente no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, no qual explorará o ambiente por 5 minutos (figura 5). O primeiro dia serve como habituação do animal. No segundo dia o animal foi recolocado no aparato, no qual estavam dois objetos iguais, o objeto A e objeto B (forma, tamanho e cor), contou-se o tempo que o animal explorou cada objeto (A e B) (De Lima et al., 2005). No dia seguinte (24 h após) o mesmo procedimento é realizado, porém é trocado o objeto B pelo objeto C (diferente do objeto A), conta-se o tempo de exploração de cada objeto. Este teste avalia a memória de longa duração.



**Figura 5.** Teste comportamental de reconhecimento de objetos novos. Fonte Laboratório de Microbiologia Experimental/UNESC. Figura desenvolvida por Allan Collodel, 2017.

### 3.7.3 Atividade Locomotora

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), que monitora a distância percorrida (cm) pelo animal, dividindo o tempo total de avaliação em blocos de 5 minutos (figura 6) (De Oliveira et al., 2009; Canever et al., 2010).

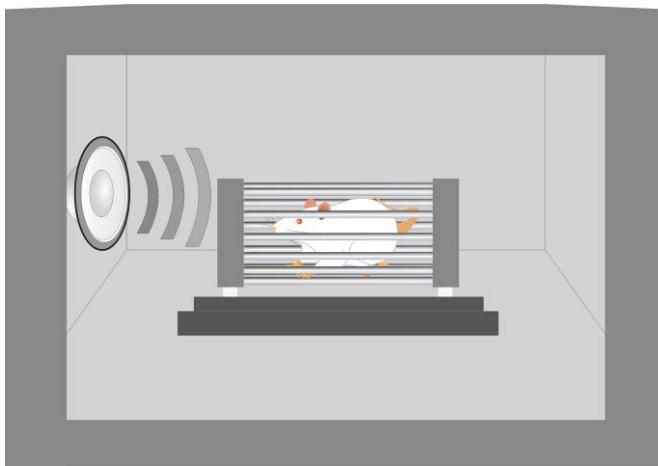


**Figura 6.** Teste comportamental de atividade locomotora. Fonte Laboratório de Microbiologia Experimental/UNESC. Figura desenvolvida por Allan Collodel, 2017.

### 3.7.4 Inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto

A quantificação da IPP do reflexo de sobressalto foi realizada com base no protocolo descrito por Levin et al. (2011). Foi utilizada uma caixa de medida de sobressalto com vedação sonora (Insight) (figura 7). O protocolo foi composto por 60 testes pseudo-randomizados, divididos em seis categorias distintas, apresentados com um intervalo de 20 segundos: 1) 20 apresentações de pulso sozinho (P), com uma intensidade de 120 dB por 50 ms; 2) 8 apresentações de cada intensidade de pré-pulso (PP) sozinho, intensidades de 65, 70 e 75 dB, com 3000 Hz de frequência por 20 ms; 3) 10 apresentações de cada intensidade de PP + P, com um intervalo de 50 ms (Levin et al., 2011).

A integridade do filtro sensório-motor de humanos e de modelos animais é verificado através do teste de IPP do reflexo de sobressalto (SS). O reflexo SS é uma resposta motora estereotipada frente a estímulos repentinos e intensos (Swerdlow e Geyer, 1998). No fenômeno de IPP, a diminuição da resposta ao pulso (P), estímulo repentino e intenso, ocorre quando esse é precedido de um PP, estímulo menos intenso. Assim, o IPP reflete a ação protetora do filtro sensório-motor contra interferências: o estímulo mais fraco não só desencadeia o seu processamento, como também é capaz de suprimir o processamento de um estímulo mais forte subsequente (Graham, 1975). O resultado indica a porcentagem de IPP, avaliando assim as funções sensório-motoras dos animais (Hoffman e Ison, 1980; Weiss e Feldon, 2001).



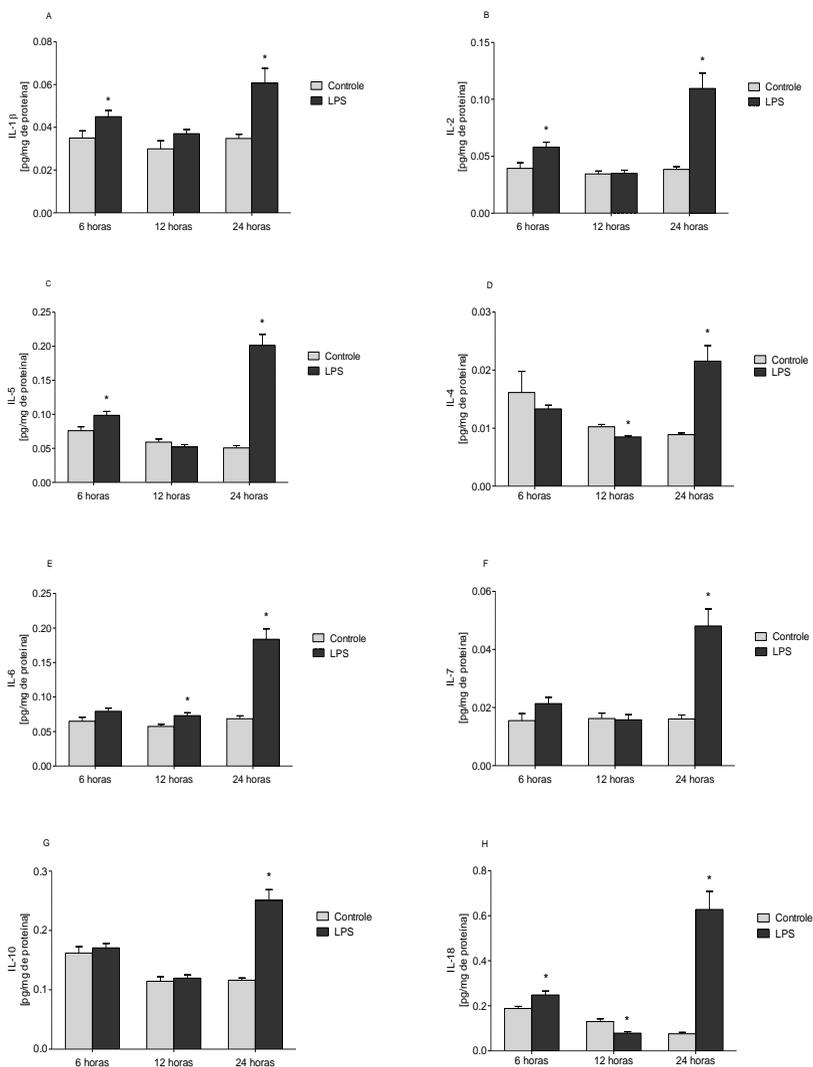
**Figura 7.** Teste comportamental de IPP do reflexo de sobressalto. Fonte Laboratório de Microbiologia Experimental/UNESC. Figura desenvolvida por Allan Collodel, 2017.

### 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises de citocinas, TBARS, grupamentos carbonil, atividade da SOD e CAT, MMPS 2 e 9, BHE e BP os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e as comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o teste *t* de Student independente. Para os testes comportamentais de habituação ao campo aberto, atividade locomotora, IPP e níveis de BDNF e NGF os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM e analisados por teste de variância (ANOVA) de duas vias, seguido de teste *post hoc* Tukey. Para as comparações entre as sessões treino e teste na tarefa de habituação ao campo aberto foi utilizado o teste *t* para amostras pareadas. Para o teste comportamental de reconhecimento de objetos novos os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil e as comparações foram realizadas utilizando o teste U de Mann-Whitney. As comparações intra-grupo foram realizadas utilizando o teste de Wilcoxon. Em todas as comparações,  $p < 0,05$  foi considerado significativamente estatístico. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 20.0.

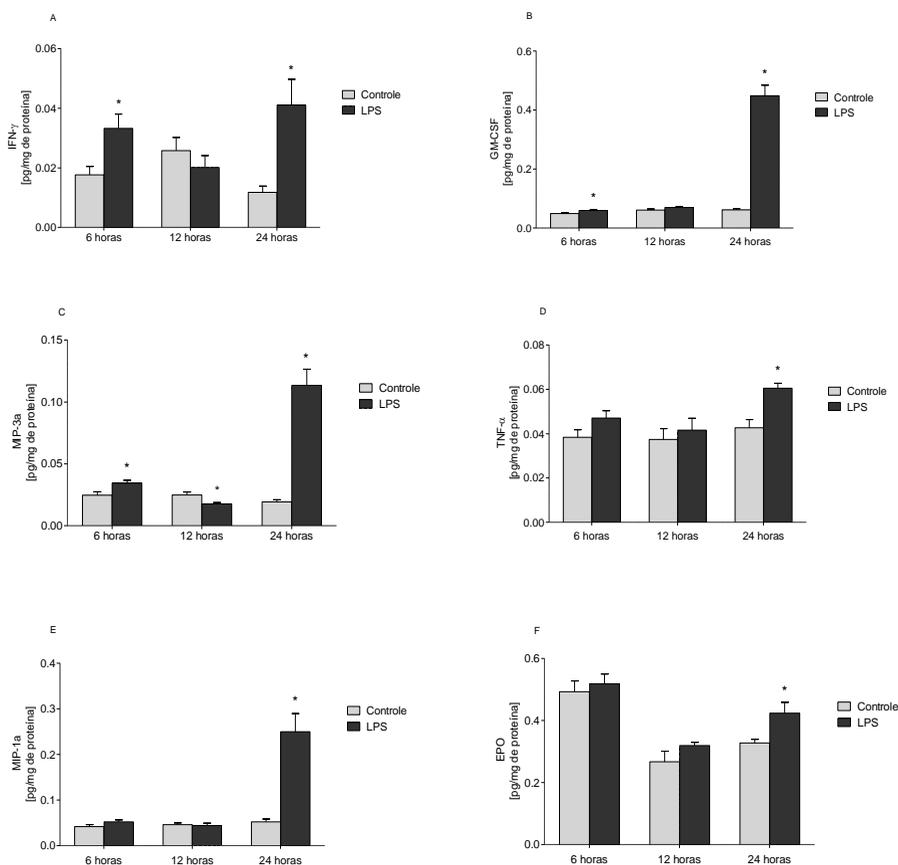
#### 4. RESULTADOS

Na figura 8, demonstra-se os níveis de IL no cérebro de fetos expostos a AIM no 15º dia de gestação. Os animais foram avaliados em 6, 12 e 24 h após injeção de LPS ou PBS nas ratas prenhas. Em 6 e 24 h houve um aumento de IL-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , respectivamente, figura 8A), IL-2 ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , respectivamente, figura 8B) e IL-5 ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente, figura 8C). Os níveis de IL-4 diminuíram em 12 h ( $p < 0,01$ ) e aumentaram em 24 h ( $p < 0,001$ ) no grupo LPS (figura 8D). Os níveis de IL-6 foram aumentados em 12 h ( $p < 0,05$ ) e 24 h ( $p < 0,001$ ) após a injeção de LPS (figura 8E). Os níveis de IL-7 ( $p < 0,001$ , figura 8F) e IL-10 ( $p < 0,001$ , figura 8G) apresentaram aumento apenas em 24 h nos grupos LPS quando comparados ao grupo controle. Houve um aumento dos níveis de IL-18 (figura 8H) em 6 ( $p < 0,05$ ) e 24 h ( $p < 0,001$ ) e uma diminuição em 12 h no grupo LPS ( $p < 0,01$ ).



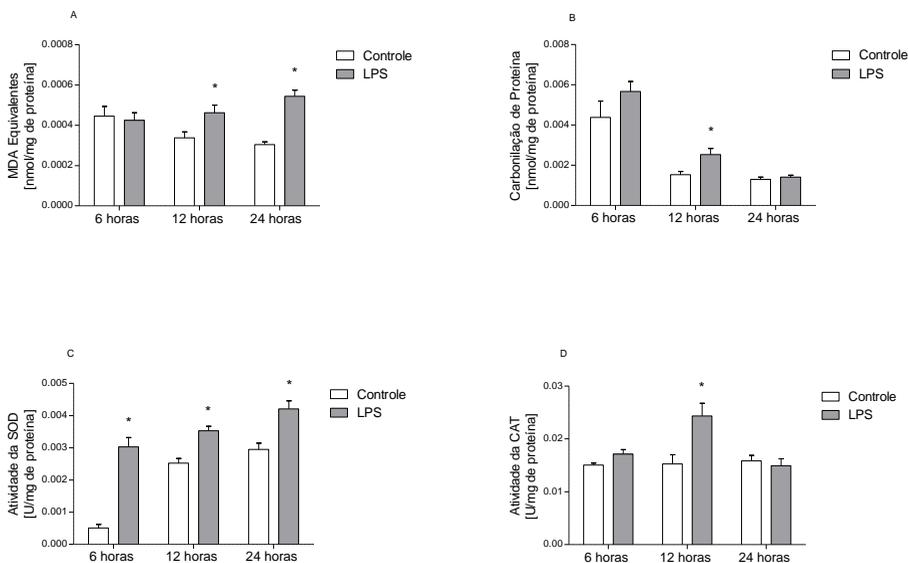
**Figura 8.** Níveis de IL no cérebro de fetos expostos a AIM. As ILs foram avaliadas em 6, 12 e 24 h após injeção de LPS ou PBS no 15º dia de gestação. IL-1 $\beta$  (A), IL-2 (B), IL-5 (C), IL-4 (D), IL-6 (E), IL-7 (F), IL-10 (G) e IL-18 (H). Os valores foram expressos com a média  $\pm$  EPM ( $n=6$ ) e os grupos foram comparados utilizando teste  $t$  de Student pareado. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle.

Na figura 9, avaliou-se os níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF, MIP-1a, MIP-3a, e EPO no cérebro de fetos expostos a AIM no 15º dia de gestação. Os animais foram avaliados em 6, 12 e 24 h após injeção de LPS ou PBS nas ratas prenhas (figura 9). Em 6 e 24 h houve um aumento de IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , respectivamente, figura 9A) e GM-CSF ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente, figura 9B) no grupo LPS quando comparado ao grupo controle. Houve um aumento dos níveis de MIP-3a (figura 9C) em 6 ( $p < 0,05$ ) e 24 h ( $p < 0,001$ ) e uma diminuição em 12 h no grupo LPS ( $p < 0,05$ ). Na figura 9D, os níveis de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ), MIP-1a ( $p < 0,001$ , figura 9E) e EPO ( $p < 0,01$ , figura 9F) apresentaram aumento apenas em 24 h nos grupos LPS quando comparados ao grupo controle.



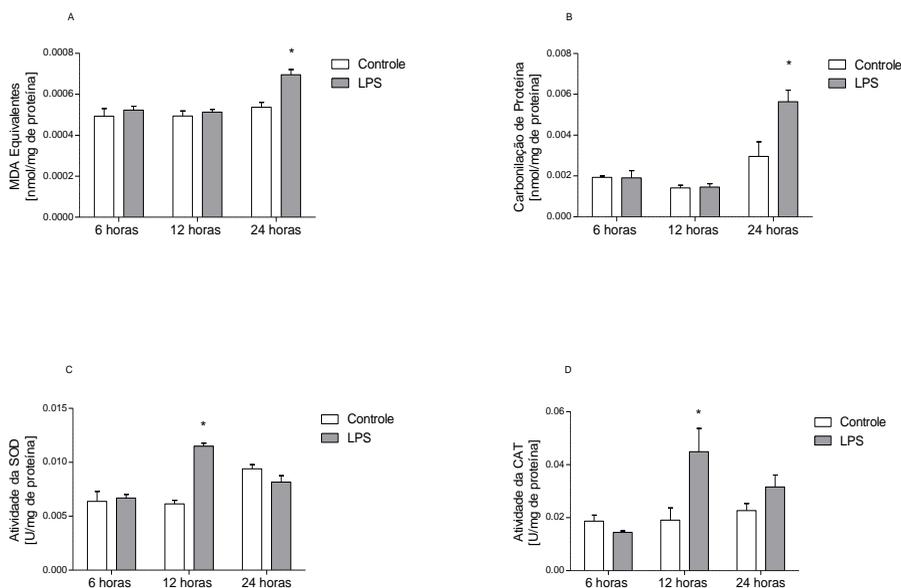
**Figura 9.** Níveis de citocinas no cérebro de fetos expostos a AIM. As citocinas foram avaliadas em 6, 12 e 24 h após injeção de LPS ou PBS no 15º dia de gestação. IFN- $\gamma$  (A), GM-CSF (B), MIP-3 $\alpha$  (C), TNF- $\alpha$  (D), MIP-1 $\alpha$  (E) e EPO (F). Os valores foram expressos com a média  $\pm$  EPM (n=6) e os grupos foram comparados utilizando teste t de Student pareado. \*p<0,05 quando comparado ao grupo controle.

A figura 10 demonstra os níveis de TBARS, grupamentos carbonil e atividade da SOD e CAT no líquido amniótico de ratas Wistar prenhas submetidas à injeção de LPS ou PBS no 15º dia de gestação. Os níveis de TBARS foram aumentados em 12 e 24 h após a injeção de LPS quando comparado com o grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente, figura 10A). Os níveis de grupamentos carbonil aumentaram apenas em 12 h após a injeção de LPS ( $p < 0,05$ , figura 10B). A atividade da SOD foi aumentada em 6, 12 e 24 h no grupo LPS quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,01$ , respectivamente, figura 10C) e a atividade da CAT foi aumentada apenas em 12 h no grupo LPS ( $p < 0,05$ , figura 10D) quando comparada com o grupo controle.



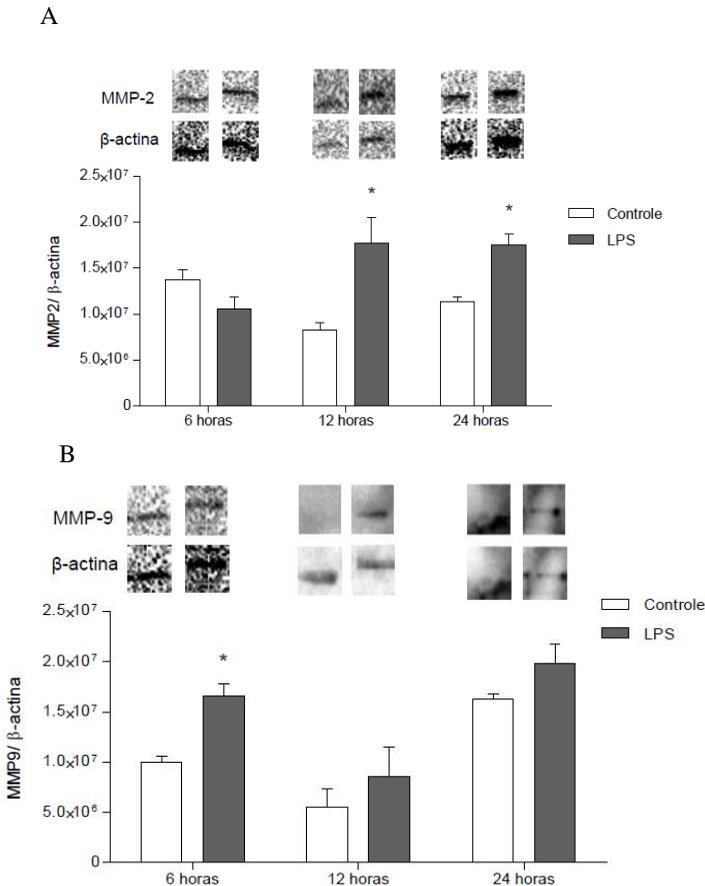
**Figura 10.** Níveis de malondialdeído (MDA), grupamentos carbonil e atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no líquido amniótico de ratas Wistar prenhas no 15º dia de gestação em 6, 12 e 24 após a injeção de LPS ou PBS. Os níveis de MDA (A), grupamentos carbonil (B), SOD (C) e CAT (D) foram expressos como média  $\pm$  EPM (n=6) e os grupos foram comparados utilizando teste *t* de Student pareado. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle.

A figura 11 ilustra os níveis de TBARS, grupamentos carbonil e atividade da SOD e CAT no cérebro de fetos submetidos à AIM no 15º dia de gestação. Os níveis de TBARS (figura 11A) e grupamentos carbonil (figura 11B) foram aumentados em 24 h no grupo LPS ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente). A atividade da SOD (figura 11C) e CAT (figura 11D) foram aumentadas em 12 h no grupo LPS ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente).



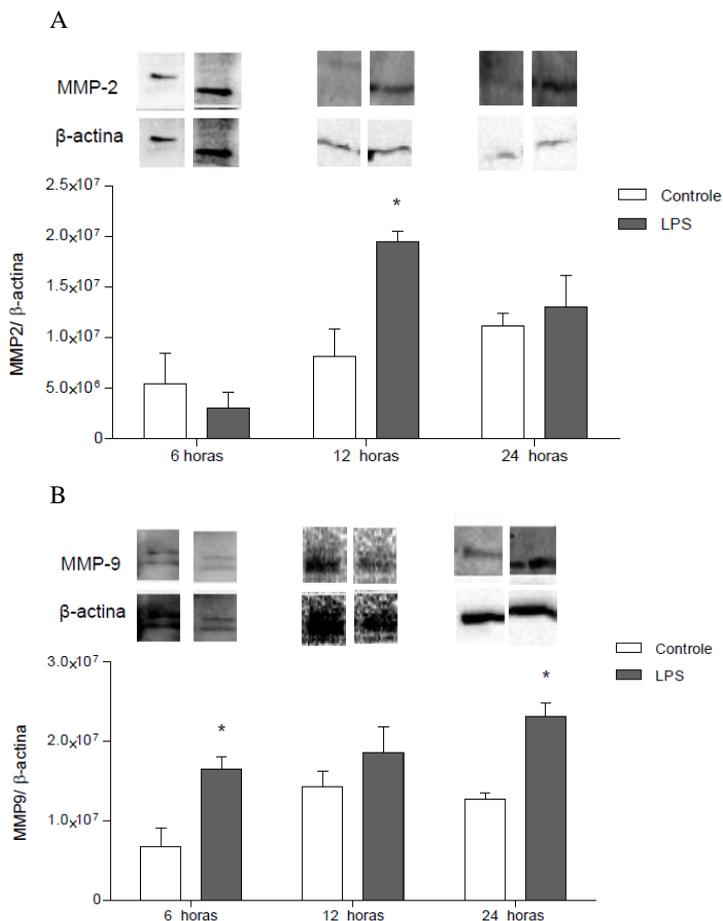
**Figura 11.** Níveis de malondialdeído (MDA), grupamentos carbonil e atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no cérebro de fetos expostos a AIM. MDA (A), grupamentos carbonil (B), SOD (C) e CAT (D) foram avaliados em 6, 12 e 24 h após injeção de LPS ou PBS no 15º dia de gestação. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM (n=6) e os grupos foram comparados utilizando teste *t* de Student pareado. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle.

Na figura 12, avaliou-se a expressão de MMPs 2 e 9 no líquido amniótico de ratas Wistar prenhas submetidas à injeção de LPS ou PBS no 15º dia de gestação. A MMP 2 foi aumentada em 12 e 24 h ( $p<0,05$ ,  $p<0,05$ , respectivamente, figura 12A). No entanto, a expressão de MMP 9 foi aumentada apenas em 6 h no grupo LPS quando comparado ao grupo controle ( $p<0,01$ , figura 12B).



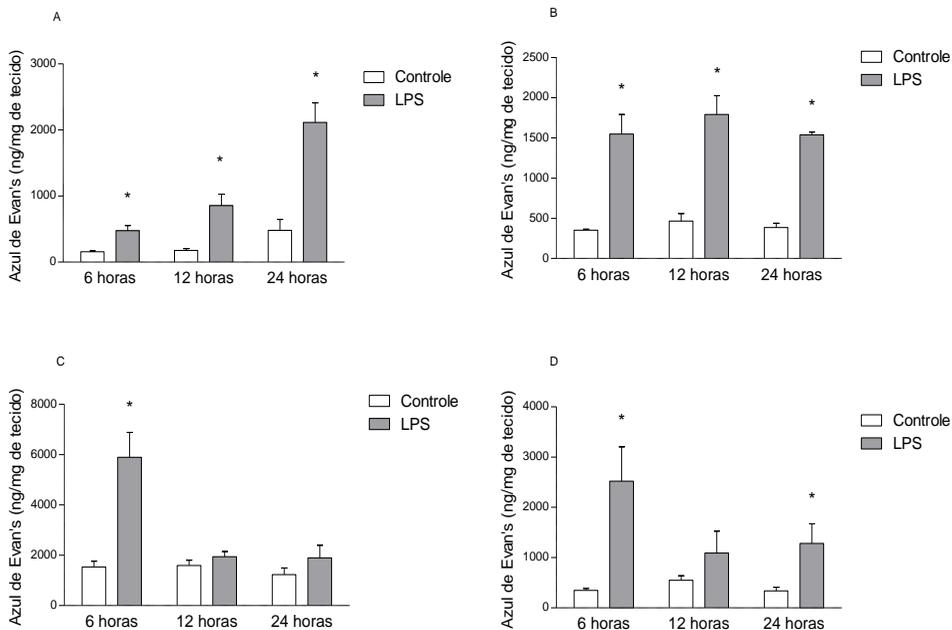
**Figura 12.** Avaliação da expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) 2 e 9 no líquido amniótico (A e B) de ratas Wistar prenhas. Os dados foram avaliados em 6, 12 e 24 h após injeção de LPS ou PBS no 15º dia de gestação. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=6$ ) e os grupos foram comparados utilizando teste *t* de Student pareado. \* $p<0,05$  quando comparado ao grupo controle.

A figura 13 demonstra a expressão de MMPs 2 e 9 no cérebro de fetos submetidos à AIM no 15º dia de gestação. MMP 2 foi aumentada somente em 12 h ( $p < 0,01$ , figura 13A) e a expressão de MMP 9 foi aumentada em 6 e 24 h ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente, figura 13B) nos grupos LPS.



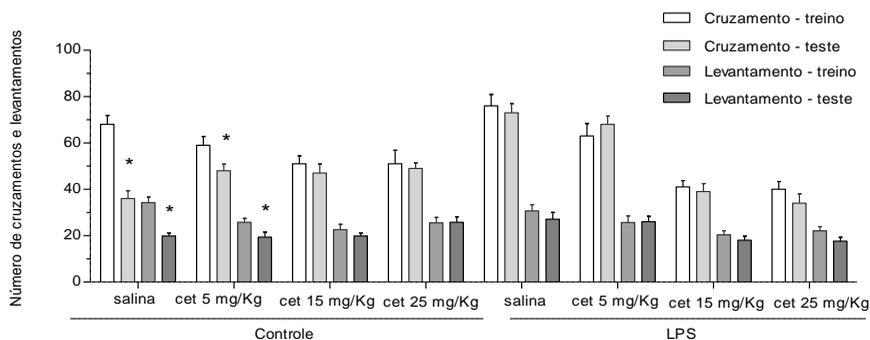
**Figura 13.** Avaliação da expressão de metaloproteínas de matriz (MMPs) 2 e 9 no cérebro de fetos (A e B) expostos a AIM. Os dados foram avaliados em 6, 12 e 24 h após injeção de LPS ou PBS no 15º dia de gestação. Os dados foram relatados como média ± EPM (n=6) e os grupos foram comparados utilizando teste *t* de Student pareado. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle.

A integridade de BHE foi avaliada no hipocampo e córtex cerebral e a integridade de BP na placenta e no cérebro de fetos de ratas Wistar prenhas após injeção de LPS ou PBS no 15º dia de gestação, figura 14. Houve dano na integridade da BHE no hipocampo em 6 ( $p<0,05$ ), 12 ( $p<0,01$ ) e 24 h ( $p<0,05$ ) (figura 14A) e no córtex cerebral em 6 ( $p<0,05$ ), 12 ( $p<0,01$ ) e 24 h ( $p<0,01$ ) (figura 14B). O dano na integridade da BP na placenta ocorreu em 6 h no grupo LPS quando comparado com o grupo controle ( $p<0,01$ , figura 14C). Enquanto no cérebro dos fetos houve disfunção em 6 e 24 h após a infecção de LPS ( $p<0,05$ ,  $p<0,05$ , respectivamente, figura 14D).



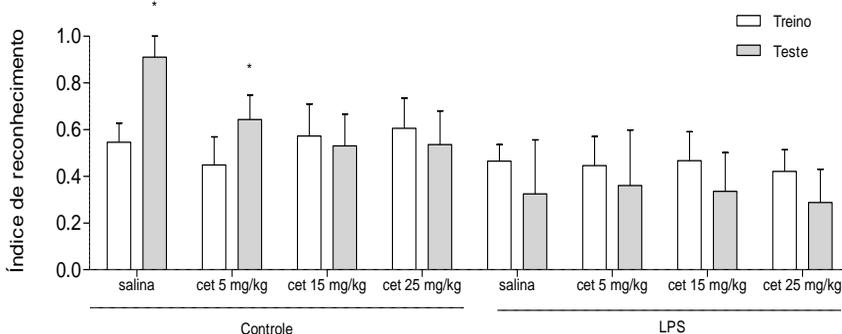
**Figura 14.** Integridade da BHE no hipocampo (A), córtex cerebral (B) e integridade da barreira placentária na placenta (C) e no cérebro de fetos (D) de ratas Wistar prenhas em 6, 12 e 24 h após injeção de LPS ou PBS no 15º dia de gestação. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=6$ ) e os grupos foram comparados utilizando teste  $t$  de Student pareado. \* $p<0,05$  quando comparado ao grupo controle.

Sessenta dias após o nascimento, já em vida adulta, a prole de ratas exposta e não expostas a AIM no período gestacional foi submetida aos testes comportamentais. No teste de habituação ao campo aberto (figura 15), avaliou-se os efeitos do LPS no período pré-natal e da administração de CET na idade adulta. A administração de LPS durante o período pré-natal não teve efeito no número de cruzamentos ( $p=0,36$ ) e de levantamentos ( $p=0,11$ ). No entanto, a administração de CET apresentou efeito no número de cruzamentos e levantamentos ( $p<0,001$ ). A ANOVA de duas vias não mostrou interação entre LPS e CET no número de cruzamento ( $p=0,08$ ) e levantamentos ( $p=0,92$ ). Na sessão teste, houve uma redução significativa no número de cruzamentos e levantamentos nos grupos controle/salina e controle/CET 5 mg/kg quando comparado com a sessão treino ( $p<0,05$ ), demonstrando memória de habituação nesses grupos. Entretanto, os grupos controle que receberam as doses de CET 15 e 25 mg/kg não apresentaram diferenças no número de cruzamentos e levantamentos entre as sessões treino e teste, demonstrando prejuízo de memória. Nos animais dos grupos LPS que receberam tratamento com salina e CET em todas as doses, não houve diferença entre as sessões treino e teste, demonstrando comprometimento da memória de habituação nesses grupos.



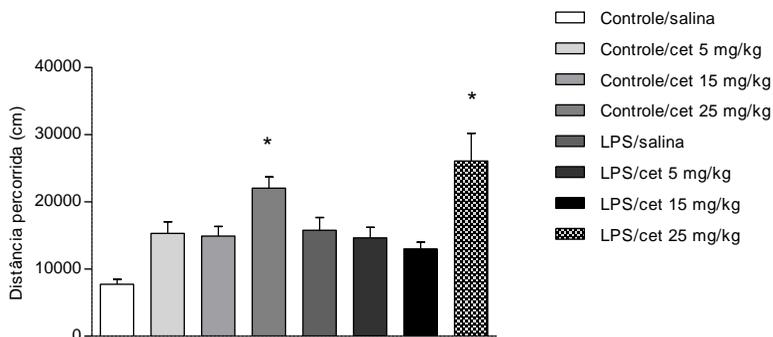
**Figura 15.** Teste comportamental de habituação ao campo aberto com ratos Wistar submetidos à AIM no período pré-natal e exposto à administração de CET em diferentes doses, 5, 15 e 25 mg/kg na vida adulta. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e relatados por ANOVA de duas vias seguido de testes *post hoc* de Tukey ( $n=12$ ). Para as comparações entre as sessões treino e teste na tarefa de habituação ao campo aberto foi utilizado o teste *t* de Student para amostras pareadas. \* $p<0,05$  quando comparado com a sessão treino.

No teste de reconhecimento de objetos, figura 16, observou-se uma diferença significativa na exploração dos novos objetos nos grupos controle/salina ( $p < 0,01$ ) e controle/CET 5 mg/Kg ( $p < 0,05$ ) entre as sessões treino e teste, demonstrando memória de reconhecimento nesses grupos. No entanto, os grupos controle que receberam as doses de CET 15 e 25 mg/kg não apresentaram diferença no índice de reconhecimento de novos objetos. Nos ratos dos grupos LPS que receberam tratamento com salina e CET em todas as doses, não houve diferença entre as sessões treino e teste, demonstrando prejuízo de memória de reconhecimento nesses grupos.



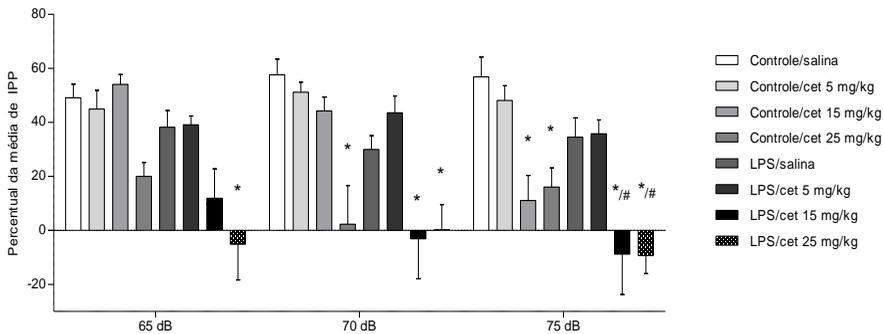
**Figura 16.** Teste comportamental de reconhecimento de objetos com ratos Wistar submetidos à AIM no período pré-natal e exposto à administração de CET em diferentes doses 5, 15 e 25 mg/kg na vida adulta. Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil e as comparações foram realizadas utilizando um teste U de Mann-Whitney. As comparações intra-grupo foram realizadas utilizando os testes de Wilcoxon ( $n=12$ ). \* $p < 0,05$  quando comparado com a sessão treino.

A figura 17 demonstra que a administração de LPS durante o período pré-natal não teve efeitos sobre a atividade locomotora ( $p=0,15$ ). No entanto, a administração da dose de CET 25 mg/kg aumentou a distância percorrida pelos ratos tanto no grupo controle quanto nos animais que receberam injeção de LPS no período pré-natal ( $p < 0,001$ ). A ANOVA de duas vias não mostrou diferença na interação de CET versus LPS ( $p=0,125$ ).



**Figura 17.** Teste de atividade locomotora com ratos Wistar submetidos à AIM no período pré-natal e exposto à administração de CET em diferentes doses 5, 15 e 25 mg/kg na vida adulta. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e avaliados por ANOVA de duas vias seguido de testes *post hoc* de Tukey (n=12) \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle/salina.

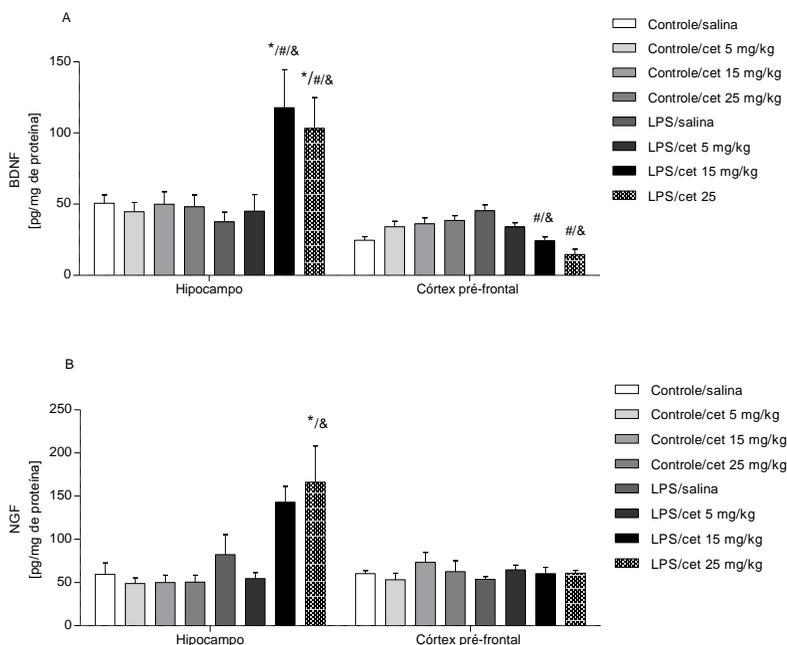
No teste comportamental de IPP do reflexo de sobressalto, observou-se que a administração de LPS e CET tiveram efeito na IPP ( $p < 0,001$ ). Houve uma interação entre LPS e CET em 65 ( $p < 0,05$ ) e 70 dB ( $p < 0,05$ ). Entretanto, não houve interação em 75 dB ( $p = 0,87$ ). O grupo LPS mais CET 25 mg/kg mostrou uma diminuição da IPP na intensidade de 65 dB quando comparado ao grupo controle/salina. O grupo LPS 15 mg/kg e o grupo controle e LPS que receberam CET 25 mg/kg diminuíram a IPP na intensidade de 70 dB quando comparado ao grupo controle/salina. Nos grupos controle expostos a CET 15 e 25 mg/kg houve uma diminuição do IPP em comparação com o grupo controle/salina na intensidade de 75 dB. Nos grupos LPS que receberam CET 15 e 25 mg/kg houve uma diminuição do IPP comparado com os grupos controle/salina e LPS/salina, figura 18.



**Figura 18.** Teste comportamental de IPP do reflexo de sobressalto com ratos Wistar submetidos à AIM no período pré-natal e exposto à administração de CET em diferentes doses 5, 15 e 25 mg/kg na vida adulta. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM e avaliados por ANOVA de duas vias seguido de testes *post hoc* de Tukey ( $n=12$ ). \* $p<0,05$  quando comparados ao grupo controle/salina. # $p<0,05$  quando comparado com o grupo LPS/salina.

Na figura 19, observou-se o efeito do LPS no hipocampo ( $p<0,01$ ), da CET ( $p<0,01$ ), bem como o efeito na interação de LPS versus CET ( $p<0,01$ ) nos níveis de BDNF. As doses de CET 15 e 25 mg/kg aumentaram os níveis de BDNF no grupo LPS quando comparado com controle/salina, LPS/salina e seus respectivos controles de dose de CET. No córtex pré-frontal não houve efeito para LPS ( $p=0,12$ ) e CET ( $p=0,07$ ), mas houve interação para LPS versus CET ( $p<0,001$ ). No grupo LPS/CET 15 mg/kg e LPS/CET 25 mg/kg houve uma diminuição dos níveis de BDNF em comparação com grupo LPS/salina e controle/CET 15 e 25 mg/kg (figura 19A).

No hipocampo a ANOVA de duas vias mostrou efeitos para LPS ( $p<0,01$ ), mas não para CET ( $p=0,06$ ) e houve interação entre LPS versus CET ( $p<0,05$ ). No LPS/CET 25 mg/kg os níveis de NGF foram aumentados em comparação com controle/salina e controle/CET 25 mg/kg. No córtex pré-frontal não houve efeito para LPS ( $p=0,63$ ) e CET ( $p=0,57$ ) e a ANOVA de duas vias não mostrou interação para CET versus LPS ( $p=0,39$ ), figura 19B.



**Figura 19.** Efeitos da AIM nos níveis de BDNF e NGF no hipocampo e córtex pré-frontal da prole com 60 dias de vida, após administração de CET nas doses de 5, 15 e 25 mg/kg. O BDNF (A) e o NGF (B) foram expressos como média  $\pm$  EPM e avaliados por ANOVA de duas vias seguido do teste de *post-hoc* de Tukey ( $n = 12$ ). \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle/salina. # $p < 0,05$  quando comparado com o grupo LPS/salina. &  $p < 0,05$  quando comparado com os grupos controle/CET 15 mg/kg e 25 mg/kg.

## 5. DISCUSSÃO

A exposição pré-natal ao LPS provoca lesões comportamentais e neuroquímicas tanto à mãe quanto na prole durante a gestação (Wang et al., 2006; Fortier et al., 2007; Romero et al., 2007; Kirsten et al., 2010). Foi sugerido que os efeitos da exposição materna ao LPS no cérebro fetal em desenvolvimento são mediados pela indução de citocinas na circulação ou na placenta materna (Ashdown et al., 2006). Vários pesquisadores relataram que o LPS também afeta a atividade do SNC levando ao comportamento doentio em roedores, como diminuição na atividade exploratória, no comportamento social, digestivo, sexual, anedonia, na aprendizagem e funções cognitivas (Larson e Dunn, 2001; Kirsten et al., 2010; Zhu et al., 2014). O LPS no período pré-natal pode também induzir aborto espontâneo e reabsorção embrionária (Parent e Meaney, 2008).

No presente estudo foi demonstrado os efeitos da AIM com o modelo de LPS onde a endotoxina bacteriana foi administrada em ratas prenhas no 15º dia gestacional, o que se aproxima do segundo trimestre da gestação humana (Meyer et al., 2009). Foram avaliados níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias, parâmetros de estresse oxidativo, expressão de MMPs 2 e 9, integridade da BHE e BP. Além disso, foi avaliado memória de habituação e reconhecimento de objetos novos, atividade locomotora e IPP do reflexo de sobressalto na prole de AIM exposta ao modelo animal de esquizofrenia por CET na vida adulta.

O sistema imune inato é responsável por muitos dos sintomas de doenças relacionadas à inflamação ou infecção sistêmica (Rivest, 2003). A administração de LPS durante o período gestacional é capaz de influenciar a resposta inflamatória de células no cérebro dos fetos (Kirsten et al., 2010). Esta resposta inflamatória foi igualmente observada no presente estudo, em que os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-18, MIP-3a, TNF- $\alpha$ , IL-7, IL-10, MIP-1a e EPO encontraram-se alterados no cérebro dos fetos em 6, 12 e 24 h após a injeção de LPS.

Esses resultados vão de encontro aos observados em estudo de Oskvig et al. (2013) onde se verificou o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro materno, no líquido amniótico e no cérebro fetal após o tratamento materno com LPS no 15º dia gestacional. Além disso, os autores também observaram que o perfil da indução inflamatória era idêntico nestes três compartimentos com a única diferença sendo a

magnitude de indução. A maior resposta inflamatória esteve presente no soro materno seguido de diminuição progressiva da magnitude no líquido amniótico e no cérebro fetal. As sucessivas reduções de magnitude de citocinas do soro ao cérebro podem ser indicativas da presença de barreiras protetoras materno-fetal que filtram a passagem completa de citocinas, de modo que uma fração de citocinas está passando do soro para líquido amniótico e para cérebro, as citocinas aumentadas no cérebro fetal não são derivadas do feto, mas provavelmente transferidas para o cérebro fetal a partir do soro materno, do líquido amniótico e da placenta. A falta de resposta imune fetal pode ser explicada pela imaturidade da célula imune do cérebro e da célula microglial no início da gestação (Oskvig et al., 2012).

O modelo de AIM foi estabelecido para testar a hipótese de que a ativação do sistema imunológico materno, especificamente as citocinas pró-inflamatórias, altera permanentemente o desenvolvimento do cérebro fetal e aumenta o risco de distúrbios do neurodesenvolvimento (Meyer et al., 2005). Os mecanismos a jusante pelos quais as citocinas pró-inflamatórias no ambiente fetal perturbam o desenvolvimento cerebral permanecem desconhecidos. Entretanto, o bloqueio das ações de citocinas específicas tais como a IL-6 ou a IL-1 $\beta$  impedem alterações comportamentais e fisiológicas induzidas pela AIM nos descendentes de roedores (Girard et al., 2010).

O desenvolvimento do feto depende da transferência placentária de nutrientes, incluindo o oxigênio e a glicose, através da membrana epitelial transportadora para a circulação capilar fetal (Desforgues e Sibley, 2010). A natureza do insulto transmitido ao feto pela AIM pode estar associada com hipóxia, oxidação, estresse e morte celular. A atividade histopatológica e a atividade de estresse oxidativo (Paintlia et al., 2008) na placenta após AIM podem interromper a transferência materno-placentária de nutrientes para o feto levando à hipóxia fetal transitória. Carpentier et al. (2011) mostraram evidências consistentes de redução de oxigênio para o cérebro fetal após a administração materna de LPS no 12º dia gestacional em ratos (Carpentier et al., 2011).

No presente estudo foi demonstrado aumento no dano a lipídios, grupamentos carbonil e aumento da SOD e CAT no líquido amniótico e cérebro dos fetos horas após a injeção de LPS. Níveis de grupamentos carbonil também foram encontrados aumentados em pacientes com esquizofrenia (Young et al., 2007). A regulação de genes associados com estresse celular, hipóxia e genes pró-apoptóticos sugerem um cenário plausível em que o LPS materno resulta em privação de

oxigênio ao feto, levando a uma ameaça transitória para a viabilidade celular (Oskvig et al., 2012).

As citocinas são elementos essenciais para respostas apropriadas nos SNC e periférico. Alguns fatores de transcrição, tais como NF- $\kappa$ B, controlam a produção de citocinas e regulam a expressão de mediadores oxidativos, como COX e NO $\cdot$  (Leza et al., 2015). Embora o estresse oxidativo possa ser gerado por danos celulares induzidos pela inflamação, pode também ser produzido por outros estímulos, como o metabolismo da dopamina, disfunção mitocondrial e tabagismo envolvidos na esquizofrenia (Bitanirwe e Woo, 2011; Nathan e Cunningham-Bussel, 2013; Zugno et al., 2013). Zugno et al. (2014) demonstraram um aumento no dano lipídico e nos níveis de grupamentos carbonil no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal e um aumento da atividade da SOD no córtex pré-frontal em ratos adultos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por CET (25 mg/kg) (Zugno et al., 2014a).

Estudo de Zhao et al. (2008) mostrou que a exposição materna a duas doses de LPS no 8 $^{\circ}$  dia gestacional resultou em peroxidação lipídica e depleção de glutatona no fígado materno e na placenta, e aumentou a produção de NO $\cdot$  no soro materno e no líquido amniótico de ratas prenhas. Além disso, a exposição materna ao LPS induziu o início da produção de nitração de proteína como uma imunoreatividade generalizada por nitrotirosina na placenta de ratas prenhas (Zhao et al., 2008). Demonstrou-se que os ERO estão envolvidas na morte fetal induzida por LPS, restrição de crescimento fetal e parto prematuro (Xu et al., 2007).

A resposta imune materna, a produção de citocinas e quimiocinas e a migração de leucócitos representam a primeira linha de defesa à infecção materna. NO $\cdot$ , O $_2^{\cdot-}$  e H $_2$ O $_2$  podem levar à formação de ONOO, que é um forte oxidante que exerce efeitos citotóxicos sobre as células endoteliais (Klein et al., 2006), aumenta a permeabilidade da BHE (Mayhan, 2000), induz a peroxidação lipídica, danos mitocondriais e ativação das MMPs (Leppert et al., 2001). As MMPs agem sobre as MEC, aumentando a permeabilidade da BHE, degradando as proteínas da mielina e aumentando o fluxo de leucócitos do sangue para o líquido da coluna vertebral (Hsieh et al., 2010).

As citocinas induzem a produção de MMPs através de proto-oncogenes da família *c-fos* e *c-fun* que se ligam a vários elementos promotores de genes, tais como a proteína ativadora-14 (Leppert et al., 2001). A resposta inflamatória gerada por LPS induz a expressão de

MMPs 2 e 9. Além disso, também demonstrou-se que a MMPs 2 e 9 induzem a degradação da BHE através da sua afinidade com o substrato para uma variedade de componentes presentes na MEC (Roomi et al., 2017). Estes achados estão de acordo com os resultados do presente estudo que demonstra um aumento das MMPs 2 e 9 no líquido amniótico e no cérebro de fetos ao mesmo tempo em que houve quebra da BHE no hipocampo e córtex de ratas prenhas, bem como a quebra da BP na placenta e no cérebro dos fetos após injeção de LPS no 15º gestacional de ratas.

A BP e a BHE selecionam a entrada de sangue periférico ao feto e ao cérebro, respectivamente. Sabe-se que os patógenos maternos transmitidos pelo sangue que chegam à circulação útero-placentária e aos espaços intervilares podem atingir o feto através dos capilares vilosos. A migração do corante azul de *Evan's* no sangue periférico é possível devido à ruptura de junções apertadas de células endoteliais de placenta e capilares vilosos (Yarlagadda et al., 2015). Singh et al. (2012) verificaram que a livre migração do corante na presença de HIV-1 do útero para o embrião e do sangue para o cérebro indicou que Nef é realmente responsável pela quebra da BP, bem como pelo aumento da permeabilidade da placenta e da BHE. Além disso, observou-se também que a proteína Nef de HIV recombinante injetada por via intravenosa em ratas prenhas no 14º dia de gestação, estava presente em vestígios no útero, placenta, membrana amniótica, líquido amniótico e embrião. Isto demonstra claramente que Nef aumenta a permeabilidade placentária possivelmente rompendo as junções apertadas de células endoteliais de capilares vilosos e facilita a migração de substâncias para o interior da placenta (Singh et al., 2012).

A própria BHE segrega citocinas, prostaglandinas, ERO (Fabry et al., 1993) e, devido à sua natureza, essas substâncias podem ser enviadas ao SNC ou para o sangue (Verma et al., 2006). A neuroinflamação está associada a uma maior permeabilidade da BHE a uma lesão cerebral (Candelario-Jalil et al., 2007).

Estudos ilustram que o comprometimento comportamental e cognitivo na vida tardia da prole de mães expostas a AIM, seja por LPS ou Poly I:C, está relacionado à ativação de citocinas (Meyer et al., 2008; Garay et al., 2013), as quais alteram processos neuroquímicos e causam mudanças 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 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , 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 fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos (Balu e Lucki, 2009). Assim, o comprometimento em algum destes sistemas afeta os processos neuroquímicos e comportamentais, além de prejudicar negativamente a neurogênese (Bovetti et al., 2011).

Os indivíduos com esquizofrenia apresentam alterações cognitivas antes e imediatamente após um surto psicótico e podem representar um marcador de traço para o início do transtorno (Zaytseva et al., 2015). Estudos da literatura relacionaram alterações cognitivas com disfunções dos receptores NMDA. Uma redução das subunidades de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR1s) em ratos geneticamente modificados diminuiu funções sociais e cognitivas (Zugno et al., 2014b). Além disso, a administração crônica de CET tem sido associada a uma diminuição da memória mesmo após o término do tratamento (Chatterjee et al., 2011).

Estes dados corroboram com os resultados encontrados neste estudo, em que animais submetidos a AIM e expostos à CET na vida adulta demonstraram déficits de memória de trabalho, habituação e reconhecimento. Comprometimento cognitivo, como déficits de atenção, função executiva, memória de trabalho (curto prazo) e na memória de longo prazo, são sintomas centrais em pacientes com esquizofrenia (Elissalde et al., 2011). Entre elas, o comprometimento da aprendizagem e da memória são conhecidos como sendo particularmente severos e são sugeridos como principais determinantes em pacientes esquizofrênicos com alterações no funcionamento social e ocupacional (Chatterjee et al., 2011).

A lesão de memória episódica está presente na maioria dos pacientes com esquizofrenia, juntamente com disfunção executiva (Lesh et al., 2011) e representa uma marca registrada do comprometimento cognitivo. A memória episódica envolve as regiões pré-frontal, medial temporal e parietal cuja alteração está implicada na fisiopatologia da esquizofrenia, com déficits ocorrendo durante as fases de codificação e recuperação, tanto em tarefas visuais como verbais (Francis et al., 2016).

Devido a uma forte relação entre os desafios do LPS pré-natal e a manifestação de distúrbios neuropsiquiátricos, como a esquizofrenia (Zhu et al., 2014), o autismo (Pang et al., 2016) e a ansiedade (Walker et al., 2009), buscou-se avaliar alterações comportamentais e identificar consequências neuropsiquiátricas na fase pré-natal de exposição ao LPS e na vida adulta ratos.

Os resultados do presente estudo demonstraram que a CET (25 mg/kg) aumentou a atividade locomotora na prole de ratos que não foram expostos ao LPS. A hiperlocomoção é um sintoma positivo característico da esquizofrenia (Zugno et al., 2013). Similares a esses resultados, demonstrou-se que os ratos adultos expostos ao modelo farmacológico induzido por CET 25 mg/kg durante sete dias apresentaram um aumento na distância percorrida no teste de atividade locomotora (Canever et al., 2010; Ghedim et al., 2012).

A injeção de LPS no período pré-natal não alterou a atividade locomotora na vida adulta, contudo, a administração de CET na dose de 25 mg/kg durante 7 dias induziu hiperlocomoção. Zhu et al. (2014) injetaram LPS intra-hipocampo em ratos no 7º dia pós-natal e, semelhante aos resultados encontrados, não observaram diferença na atividade locomotora na idade adulta (Zhu et al., 2014).

Outros estudos mostram que a exposição pré-natal ao LPS foi capaz de reduzir a atividade locomotora em roedores (Kirsten et al., 2010; Enayati et al., 2012; Al-Amin et al., 2016). A injeção de LPS em roedores no período pré-natal pode ser responsável pela redução induzida por CET na atividade locomotora na vida adulta. Anteriormente, foi demonstrado que a injeção de LPS em 3 e 7 dias pós-natal leva a alterações nos receptores de neurotransmissores monoaminérgicos (dopamina e 5-HT) e receptores canabinóides no cérebro de ratos adultos (Zavitsanou et al., 2013). Além disso, Tishkina et al. (2016) mostraram que filhotes machos de ratas que receberam LPS (50 µg/kg) exibiram sintomas semelhantes à ansiedade no 32º dia pós-natal, mas não a 101º dia pós-natal. A ativação imunológica durante o desenvolvimento, incluindo os estágios pré e pós-natal, pode contribuir para a manifestação de sintomas esquizofrênicos no início da idade adulta (Tishkina et al., 2016).

Meyer et al. (2009) sugerem que alterações nos sistemas de neurotransmissores, incluindo glutamato, GABA, 5-HT e dopamina nos circuitos neuronais, podem ser responsáveis por mudanças comportamentais após a AIM (Meyer et al., 2009). De fato, mudanças dinâmicas no sistema dopaminérgico nas áreas estriatal e do

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 et al., 2009). É sabido que essa região cerebral está envolvida nas respostas comportamentais, contudo, anormalidades induzidas pela AIM também envolvem áreas estriadais e límbicas (Piontkewitz et al., 2012).

O teste de IPP do reflexo de sobressalto é uma medida comumente usada como estímulo sensorio-motor e é determinada pela medição da capacidade de um pré-estímulo fraco reduzir a resposta de sobressalto a um estímulo acústico alto (Braff et al., 2001). Indivíduos com esquizofrenia mostraram-se consistentemente com déficits de IPP, mostrando uma inibição reduzida de sobressalto na presença do PP (Braff et al., 2001; Ludewig et al., 2003; Meincke et al., 2004). Esse déficit é considerado como subjacente aos déficits de atenção sustentada e à incapacidade de filtrar automaticamente, ou portar, pensamentos irrelevantes e estímulos sensoriais que ocorrem na esquizofrenia (Braff et al., 2001).

A IPP está relacionada a sintomas de esquizofrenia, tais como distúrbio de pensamento e distração. Em estudo foi demonstrado que 25 mg/kg de CET alteraram este parâmetro (Zugno et al., 2017). Uma provável explicação para estes efeitos é sugerida por evidências em que a CET, um antagonista de receptores NMDA, leva à perda de IPP provavelmente devido a alterações nas estruturas do sistema límbico, como a amígdala e o hipocampo. Acredita-se que estes receptores são expressos em interneurônios GABAérgicos, e o bloqueio destes receptores desencadeia uma interrupção da inibição da atividade neuronal nestas regiões (Neill et al., 2010).

Estes dados estão de acordo com os resultados encontrados nesse estudo, em que os animais que não receberam LPS no período gestacional e foram expostos a CET 25 mg/kg durante 7 dias, demonstraram déficits de IPP nas intensidades de 70 e 75 dB e os animais que receberam CET 15 mg/kg durante os 7 dias demonstram déficits de IPP somente no maior estímulo de 75 dB.

No presente estudo foi demonstrado ainda que animais expostos ao LPS no período pré-natal, não revelaram alterações na IPP. Contudo, a administração de LPS e CET mostraram efeito na IPP. Os animais expostos ao LPS que receberam CET 25 mg/kg mostraram uma

diminuição da IPP na intensidade de 65, 70 e 75 dB, e os animais expostos ao LPS que receberam CET 15 mg/kg mostraram uma diminuição da IPP na intensidade de 70 e 75. Semelhante a esses achados, um estudo de Dickerson e Bilkey (2013) demonstrou que animais expostos a AIM não apresentaram resultados com diferença significativa no IPP em comparação com o grupo controle, contudo houve uma redução significativa na sincronia de longo alcance no grupo de AIM comparado com o grupo controle. A presença de sincronia de longo alcance reduzida nos animais de AIM sugere, no entanto, que os processos de sincronia podem ser mais sensíveis à ativação imune do que a IPP (Dickerson e Bilkey, 2013).

Sabe-se que os fatores neurotróficos são importantes moléculas sinalizadoras durante estágios do neurodesenvolvimento, incluindo proliferação, diferenciação e migração cerebral, além de manterem a saúde neuronal e a manutenção sináptica até a idade adulta (Rybakowski, 2008). Dentre as neurotrofinas, 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., 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 (Jiang et al., 2011; Jadhao et al., 2012), atuando no desenvolvimento e manutenção das funções do SNC e SNP (Dhobale, 2014). Desse modo, alterações nos níveis de neurotrofinas podem produzir efeitos duradouros sobre os processos neurotróficos que influenciam a maturação neuronal e a plasticidade na vida tardia (Vicario-Abejon et al., 2002). Além disso, fatores estressores durante a gestação, como a infecção materna, podem causar modificações nos níveis de neurotrofinas e predispor o aparecimento de transtornos psiquiátricos na prole adulta (Malaeb e Dammann, 2009).

Sendo este um estudo em que ratas prenhas foram expostas a AIM por LPS, tornou-se relevante investigar os níveis cerebrais de neurotrofinas na prole adulta. Os resultados encontrados mostram que a AIM durante a gestação influencia o desenvolvimento do sistema imunológico da prole, um efeito que persiste até a idade adulta. Especificamente, a prole de ratas expostas ao LPS e induzidas ao modelo de CET nas doses de 15 e 25 mg/kg tiveram aumento dos níveis de BDNF e NGF no hipocampo.

De modo geral, estes achados propõem, ao menos em parte, que a AIM foi capaz de alterar os fatores neurotróficos na vida tardia da prole

após exposição, interferindo possivelmente, nos processos neurogênicos, uma vez que a expressão de BDNF no hipocampo está correlacionada com a neurogênese (Xia et al., 2014).

Está bem consolidado na literatura que a exposição pré-natal à infecção se caracteriza 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 Poly I:C sugerem que as citocinas produzidas pela mãe atuam como prováveis mediadores do desenvolvimento anormal do cérebro, levando a mudanças comportamentais em longo prazo, bem como alterações neuroquímicas na prole adulta (Monji et al., 2009). Além disso, evidências indicam a presença de interações entre citocinas pró-inflamatórias e neurotrofinas no SNC, uma vez que a AIM altera ambos BDNF e NGF no cérebro em desenvolvimento (Gilmore et al., 2003; 2005). Em síntese, tais achados também foram confirmados no presente estudo, onde a AIM alterou os níveis cerebrais de neurotrofinas na prole adulta no hipocampo.

Embora a base neuroquímica que medeia as alterações comportamentais não seja totalmente elucidadas, é possível que AIM resulte em uma transmissão dopaminérgica e glutamatérgica prejudicada (Da Silveira et al., 2017). Nesse sentido, a hiperlocomoção e IPP estão associadas a um aumento do sistema dopaminérgico e glutamatérgico, respectivamente. Foi demonstrado que a CET administrada de forma crônica mimetiza os principais déficits comportamentais da esquizofrenia, incluindo os sintomas positivos, negativos e cognitivos. Contudo, mais pesquisas são necessárias para especificar as semelhanças e distinções entre os mecanismos neurobiológicos subjacentes às consequências cognitivas e comportamentais da AIM.

## 6. CONCLUSÃO

No presente estudo conclui-se que a AIM levou ao aumento da permeabilidade da BHE e BP, circulação de mediadores inflamatórios no cérebro dos fetos, tais como citocinas e ERO. E esta resposta imune no período pré-natal pode ser responsável pelas alterações comportamentais na vida adulta da prole induzida pela AIM. O presente estudo demonstrou que animais expostos a AIM no período pré-natal apresentaram comprometimento de memória quando administrado baixas doses de CET na vida adulta. Além disso, animais expostos a altas doses de CET apresentaram hiperlocomoção, bem como, comprometimento da IPP.

É importante considerar que, embora muitos estudos demonstrem que a infecção pré-natal aumente o risco de transtornos psiquiátricos, são necessárias mais pesquisas para determinar se a AIM provoca alterações persistentes no cérebro e nas citocinas periféricas durante o desenvolvimento pós-natal ou na prole adulta.

## REFERÊNCIAS

- Abelli M, Chelli B, Costa B, Lari L, Cardini A, Gesi C, Muti M, Lucacchini A, Martini C, Cassano GB, Pini S. Reductions in platelet 18-kDa translocator protein density are associated with adult separation anxiety in patients with bipolar disorder. *Neuropsychobiology*. 2010;62(2):98-103.
- Abi-Dargham A, van de Giessen E, Slifstein M, Kegeles LS, Laruelle M. Baseline and amphetamine-stimulated dopamine activity are related in drug-naïve schizophrenic subjects. *Biol Psychiatry*. 2009;65(12):1091-3.
- Adler CM, Malhotra AK, Elman I, Goldberg T, Egan M, Pickar D, Breier A. Comparison of ketamine-induced thought disorder in healthy volunteers and thought disorder in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1999;156(10):1646-9.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
- Al-Amin MM, Sultana R, Sultana S, Rahman MM, Reza HM. Astaxanthin ameliorates prenatal LPS-exposed behavioral deficits and oxidative stress in adult offspring. *BMC Neurosci*. 2016;17(11):016-0245.
- Anderson V, Bond L, Catroppa C, Grimwood K, Keir E, Nolan T. Childhood bacterial meningitis: impact of age at illness and acute medical complications on long term outcome. *J Int Neuropsychol Soc*. 1997;3(2):147-58.
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*. 2005;97(6):512-23.
- Aroni F, Iacovidou N, Dontas I, Pourzitaki C, Xanthos T. Pharmacological aspects and potential new clinical applications of ketamine: reevaluation of an old drug. *J Clin Pharmacol*. 2009;49(8):957-64.
- Arthur JS, Fong AL, Dwyer JM, Davare M, Reese E, Obrietan K, Impey S. Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins. *J Neurosci*. 2004;24(18):4324-32.
- Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2006;11(1):47-55.
- Atladdottir HO, Thorsen P, Ostergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M, Parner ET. Maternal infection requiring hospitalization

- during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*. 2010;40(12):1423-30.
- Bahamoori M, Bhardwaj SK, Srivastava LK. Effect of maternal lipopolysaccharide administration on the development of dopaminergic receptors and transporter in the rat offspring. *PLoS One*. 2013;8(1):17.
- Bale TL. Sex differences in prenatal epigenetic programming of stress pathways. *Stress*. 2011;14(4):348-56.
- Balu DT, Lucki I. Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;33(3):232-52.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 1987;32:279-312.
- Barron AM, Garcia-Segura LM, Caruso D, Jayaraman A, Lee JW, Melcangi RC, Pike CJ. Ligand for translocator protein reverses pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2013;33(20):8891-7.
- Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*. 2004;84(3):869-901.
- Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*. 2000;47(4):351-4.
- Berry A, Bindocci E, Alleva E. NGF, brain and behavioral plasticity. *Neural Plast*. 2012;784040(10):16.
- Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*. 2004;22(3):123-31.
- Bitanhirwe BK, Woo TU. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(3):878-93.
- Blume HK, Li CI, Loch CM, Koepsell TD. Intrapartum fever and chorioamnionitis as risks for encephalopathy in term newborns: a case-control study. *Dev Med Child Neurol*. 2008;50(1):19-24.
- Boksa P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun*. 2010;24(6):881-97.
- Bonney EA. Immune Regulation in Pregnancy: A Matter of Perspective? *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2016;43(4):679-98.
- 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):304-16.

Braff DL, Geyer MA, Light GA, Sprock J, Perry W, Cadenhead KS, Swerdlow NR. Impact of prepulse characteristics on the detection of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2001;49(1-2):171-8.

Breese GR, Knapp DJ, Moy SS. Integrative role for serotonergic and glutamatergic receptor mechanisms in the action of NMDA antagonists: potential relationships to antipsychotic drug actions on NMDA antagonist responsiveness. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002;26(4):441-55.

Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(3):467-92.

Brown AS, Hooton J, Schaefer CA, Zhang H, Petkova E, Babulas V, Perrin M, Gorman JM, Susser ES. Elevated maternal interleukin-8 levels and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am J Psychiatry.* 2004;161(5):889-95.

Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol.* 2001;11(3):297-305.

Buchanan RW, Breier A, Kirkpatrick B, Ball P, Carpenter WT, Jr. Positive and negative symptom response to clozapine in schizophrenic patients with and without the deficit syndrome. *Am J Psychiatry.* 1998;155(6):751-60.

Bystron I, Blakemore C, Rakic P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(2):110-22.

Caccamo A, De Pinto V, Messina A, Branca C, Oddo S. Genetic reduction of mammalian target of rapamycin ameliorates Alzheimer's disease-like cognitive and pathological deficits by restoring hippocampal gene expression signature. *J Neurosci.* 2014;34(23):7988-98.

Campagne G, Schuchat A, Djibo S, Ousseini A, Cisse L, Chippaux JP. Epidemiology of bacterial meningitis in Niamey, Niger, 1981-96. *Bull World Health Organ.* 1999;77(6):499-508.

Campbell BM, Charych E, Lee AW, Moller T. Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines. *Front Neurosci.* 2014;8:12.

Candelario-Jalil E, Taheri S, Yang Y, Sood R, Grossetete M, Estrada EY, Fiebich BL, Rosenberg GA. Cyclooxygenase inhibition limits blood-brain barrier disruption following intracerebral injection of tumor

- necrosis factor-alpha in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;323(2):488-98.
- Canetta S, Bolkan S, Padilla-Coreano N, Song LJ, Sahn R, Harrison NL, Gordon JA, Brown A, Kellendonk C. Maternal immune activation leads to selective functional deficits in offspring parvalbumin interneurons. *Mol Psychiatry.* 2016;21(7):956-68.
- Canever 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.
- Carhart-Harris RL, Leech R, Erritzoe D, Williams TM, Stone JM, Evans J, Sharp DJ, Feilding A, Wise RG, Nutt DJ. Functional connectivity measures after psilocybin inform a novel hypothesis of early psychosis. *Schizophr Bull.* 2013;39(6):1343-51.
- Carpentier PA, Dingman AL, Palmer TD. Placental TNF-alpha signaling in illness-induced complications of pregnancy. *Am J Pathol.* 2011;178(6):2802-10.
- Carr LA, Rowell PP, Pierce WM, Jr. Effects of subchronic nicotine administration on central dopaminergic mechanisms in the rat. *Neurochem Res.* 1989;14(6):511-5.
- Cauwe B, Van den Steen PE, Opdenakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2007;42(3):113-85.
- Chandwani S, Greco MA, Mittal K, Antoine C, Krasinski K, Borkowsky W. Pathology and human immunodeficiency virus expression in placentas of seropositive women. *J Infect Dis.* 1991;163(5):1134-8.
- Chatterjee M, Ganguly S, Srivastava M, Palit G. Effect of 'chronic' versus 'acute' ketamine administration and its 'withdrawal' effect on behavioural alterations in mice: implications for experimental psychosis. *Behav Brain Res.* 2011;216(1):247-54.
- Choi GB, Yim YS, Wong H, Kim S, Kim H, Kim SV, Hoeffler CA, Littman DR, Huh JR. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science.* 2016;351(6276):933-9.
- Coiro P, Padmashri R, Suresh A, Spartz E, Pendyala G, Chou S, Jung Y, Meays B, Roy S, Gautam N, Alnouti Y, Li M, Dunaevsky A. Impaired synaptic development in a maternal immune activation mouse model of neurodevelopmental disorders. *Brain Behav Immun.* 2015;50:249-58.

- Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, Higgins SC, Munoz-Planillo R, Inerra MC, Vetter I, Dungan LS, Monks BG, Stutz A, Croker DE, Butler MS, Haneklaus M, Sutton CE, Nunez G, Latz E, Kastner DL, Mills KH, Masters SL, Schroder K, Cooper MA, O'Neill LA. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med.* 2015;21(3):248-55.
- Coyle JT, Tsai G. The NMDA receptor glycine modulatory site: a therapeutic target for improving cognition and reducing negative symptoms in schizophrenia. *Psychopharmacology.* 2004;174(1):32-8.
- 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):288-97.
- da Silveira VT, Medeiros DC, Ropke J, Guidine PA, Rezende GH, Moraes MF, Mendes EM, Macedo D, Moreira FA, de Oliveira AC. Effects of early or late prenatal immune activation in mice on behavioral and neuroanatomical abnormalities relevant to schizophrenia in the adulthood. *Int J Dev Neurosci.* 2017;58:1-8.
- Dallasta LM, Pizarov LA, Esplen JE, Werley JV, Moses AV, Nelson JA, Achim CL. Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am J Pathol.* 1999;155(6):1915-27.
- Dammann O, Kuban KC, Leviton A. Perinatal infection, fetal inflammatory response, white matter damage, and cognitive limitations in children born preterm. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002;8(1):46-50.
- Dammann O, O'Shea TM. Cytokines and perinatal brain damage. *Clin Perinatol.* 2008;35(4):643-63.
- Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature.* 2010;468(7323):562-6.
- Dang B, Duan X, Wang Z, He W, Chen G. A therapeutic target of cerebral hemorrhagic stroke: matrix metalloproteinase-9. *Curr Drug Targets.* 2017;27(10):1389450118666170427151657.
- Davies G, Welham J, Chant D, Torrey EF, McGrath J. A systematic review and meta-analysis of Northern Hemisphere season of birth studies in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2003;29(3):587-93.
- de Lima MN, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schroder N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res.* 2005;156(1):139-43.

- de Menezes CC, Dorneles AG, Sperotto RL, Duarte MM, Schetinger MR, Loro VL. Oxidative stress in cerebrospinal fluid of patients with aseptic and bacterial meningitis. *Neurochem Res.* 2009;34(7):1255-60.
- 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.
- del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol.* 2000;10(1):95-112.
- Depino AM. Early prenatal exposure to LPS results in anxiety- and depression-related behaviors in adulthood. *Neuroscience.* 2015;299:56-65.
- Desforges M, Sibley CP. Placental nutrient supply and fetal growth. *Int J Dev Biol.* 2010;54(2-3):377-90.
- Dhobale M. Neurotrophins: Role in adverse pregnancy outcome. *Int J Dev Neurosci.* 2014;37:8-14.
- Diamond MS, Klein RS. West Nile virus: crossing the blood-brain barrier: *Nat Med.* 2004 Dec;10(12):1294-5.; 2004.
- Dickerson DD, Bilkey DK. Aberrant neural synchrony in the maternal immune activation model: using translatable measures to explore targeted interventions. *Front Behav Neurosci.* 2013;7(217):00217.
- Dinarello CA. Interleukin-1beta. *Crit Care Med.* 2005;33(12 Suppl):S460-2.
- Doran KS, Fulde M, Gratz N, Kim BJ, Nau R, Prasadarao N, Schubert-Unkmeir A, Tuomanen EI, Valentin-Weigand P. Host-pathogen interactions in bacterial meningitis. *Acta Neuropathol.* 2016;131(2):185-209.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421-31.
- Ducharme G, Lowe GC, Goutagny R, Williams S. Early alterations in hippocampal circuitry and theta rhythm generation in a mouse model of prenatal infection: implications for schizophrenia. *PLoS One.* 2012;7(1):6.
- Dufour A, Overall CM. Missing the target: matrix metalloproteinase antitargets in inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(4):233-42.

- Elissalde SN, Mazzola-Pomietto P, Viglianese N, Correard N, Fakra E, Azorin JM. [Schizophrenia, executive control and memory]. *Encephale*. 2011;37(2):70034-3.
- Elmer BM, Estes ML, Barrow SL, McAllister AK. MHCII requires MEF2 transcription factors to negatively regulate synapse density during development and in disease. *J Neurosci*. 2013;33(34):13791-804.
- Enayati M, Solati J, Hosseini MH, Shahi HR, Saki G, Salari AA. Maternal infection during late pregnancy increases anxiety- and depression-like behaviors with increasing age in male offspring. *Brain Res Bull*. 2012;87(2-3):295-302.
- Estes ML, McAllister AK. Alterations in immune cells and mediators in the brain: it's not always neuroinflammation! *Brain Pathol*. 2014;24(6):623-30.
- Estes ML, McAllister AK. Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(8):469-86.
- Estes ML, McAllister AK. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science*. 2016;353(6301):772-7.
- Fabry Z, Fitzsimmons KM, Herlein JA, Moninger TO, Dobbs MB, Hart MN. Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes. *J Neuroimmunol*. 1993;47(1):23-34.
- 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.
- Fillman SG, Weickert TW, Lenroot RK, Catts SV, Bruggemann JM, Catts VS, Weickert CS. Elevated peripheral cytokines characterize a subgroup of people with schizophrenia displaying poor verbal fluency and reduced Broca's area volume. *Mol Psychiatry*. 2016;21(8):1090-8.
- Fletcher PC, Honey GD. Schizophrenia, ketamine and cannabis: evidence of overlapping memory deficits. *Trends Cogn Sci*. 2006;10(4):167-74.
- Fortier ME, Luheshi GN, Boksa P. Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. *Behav Brain Res*. 2007;181(2):270-7.
- Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature*. 1996;383(6596):166-8.

- Francis MM, Hummer TA, Vohs JL, Yung MG, Liffick E, Mehdiyoun NF, Radnovich AJ, McDonald BC, Saykin AJ, Breier A. Functional neuroanatomical correlates of episodic memory impairment in early phase psychosis. *Brain Imaging Behav.* 2016;10(1):1-11.
- Frey BN, Andrezza AC, Cereser KM, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci.* 2006;79(3):281-6.
- Frohlich J, Van Horn JD. Reviewing the ketamine model for schizophrenia. *J Psychopharmacol.* 2014;28(4):287-302.
- 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.
- Gavish M, Weizman A, Karp L, Tyano S, Tanne Z. Decreased peripheral benzodiazepine binding sites in platelets of neuroleptic-treated schizophrenics. *Eur J Pharmacol.* 1986;121(2):275-9.
- Ghedim FV, Fraga Dde B, Deroza PF, Oliveira MB, Valvassori SS, Steckert AV, Budni J, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Zugno AI. Evaluation of behavioral and neurochemical changes induced by ketamine in rats: implications as an animal model of mania. *J Psychiatr Res.* 2012;46(12):1569-75.
- Gilmore JH, Jarskog LF, Vadlamudi S. Maternal infection regulates BDNF and NGF expression in fetal and neonatal brain and maternal-fetal unit of the rat. *J Neuroimmunol.* 2003;138(1-2):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.* 2005;159(1-2):106-12.
- Girard S, Tremblay L, Lepage M, Sebire G. IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation. *J Immunol.* 2010;184(7):3997-4005.
- Glynn MW, Elmer BM, Garay PA, Liu XB, Needleman LA, El-Sabeawy F, McAllister AK. MHCI negatively regulates synapse density during the establishment of cortical connections. *Nat Neurosci.* 2011;14(4):442-51.
- Gonzalez-Perez O, Gutierrez-Fernandez F, Lopez-Virgen V, Collas-Aguilar J, Quinones-Hinojosa A, Garcia-Verdugo JM. Immunological regulation of neurogenic niches in the adult brain. *Neuroscience.* 2012;226:270-81.

- Graham FK. Presidential Address, 1974. The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology*. 1975;12(3):238-48.
- Greenwood J. Mechanisms of blood-brain barrier breakdown. *Neuroradiology*. 1991;33(2):95-100.
- Hanke ML, Kielian T. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci*. 2011;121(9):367-87.
- Harvey L, Boksa P. Prenatal and postnatal animal models of immune activation: relevance to a range of neurodevelopmental disorders. *Dev Neurobiol*. 2012;72(10):1335-48.
- Hirst RA, Kadioglu A, O'Callaghan C, Andrew PW. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clinical & Experimental Immunology*. 2004;138(2):195-201.
- Hoffman HS, Ison JR. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychol Rev*. 1980;87(2):175-89.
- Howerton CL, Bale TL. Prenatal programming: at the intersection of maternal stress and immune activation. *Horm Behav*. 2012;62(3):237-42.
- Howes OD, Kambeitz J, Kim E, Stahl D, Slifstein M, Abi-Dargham A, Kapur S. The nature of dopamine dysfunction in schizophrenia and what this means for treatment. *Arch Gen Psychiatry*. 2012;69(8):776-86.
- Hsieh HL, Wang HH, Wu CY, Tung WH, Yang CM. Lipoteichoic acid induces matrix metalloproteinase-9 expression via transactivation of PDGF receptors and NF-kappaB activation in rat brain astrocytes. *Neurotox Res*. 2010;17(4):344-59.
- Huang TL, Lee CT, Liu YL. Serum brain-derived neurotrophic factor levels in patients with major depression: effects of antidepressants. *J Psychiatr Res*. 2008;42(7):521-5.
- Hung YC, Chen TY, Lee EJ, Chen WL, Huang SY, Lee WT, Lee MY, Chen HY, Wu TS. Melatonin decreases matrix metalloproteinase-9 activation and expression and attenuates reperfusion-induced hemorrhage following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Pineal Res*. 2008;45(4):459-67.
- Izadpanah K, Freyer D, Weber JR, Braun JS. Brain parenchymal TNF-alpha and IL-1beta induction in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol*. 2014;276(1-2):104-11.

- 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(4):2030-7.
- Jauneikaite E, Jefferies JM, Hibberd ML, Clarke SC. Prevalence of *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing invasive and non-invasive disease in South East Asia: a review. *Vaccine.* 2012;30(24):3503-14.
- Jia P, Wang L, Meltzer HY, Zhao Z. Common variants conferring risk of schizophrenia: a pathway analysis of GWAS data. *Schizophr Res.* 2010;122(1-3):38-42.
- 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(1):99-103.
- Jiang HY, Xu LL, Shao L, Xia RM, Yu ZH, Ling ZX, Yang F, Deng M, Ruan B. Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immun.* 2016;58:165-72.
- Kapur S, Mizrahi R, Li M. From dopamine to salience to psychosis--linking biology, pharmacology and phenomenology of psychosis. *Schizophr Res.* 2005;79(1):59-68.
- Kastenbauer S, Koedel U, Becker BF, Pfister HW. Oxidative stress in bacterial meningitis in humans. *Neurology.* 2002;58(2):186-91.
- Kastenbauer S, Pfister HW. Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain.* 2003;126(Pt 5):1015-25.
- 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(3):1090-100.
- Keogh MJ, Bennet L, Drury PP, Booth LC, Mathai S, Naylor AS, Fraser M, Gunn AJ. Subclinical exposure to low-dose endotoxin impairs EEG maturation in preterm fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012;303(3):13.
- Kieser KJ, Kagan JC. Multi-receptor detection of individual bacterial products by the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2017;2(10):25.
- Kim JY, Duan X, Liu CY, Jang MH, Guo JU, Pow-anpongkul N, Kang E, Song H, Ming GL. DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. *Neuron.* 2009;63(6):761-73.

Kimura A, Namekata K, Guo X, Harada C, Harada T. Neuroprotection, Growth Factors and BDNF-TrkB Signalling in Retinal Degeneration. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9).

Kirsten TB, Taricano M, Florio JC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide reduces motor activity after an immune challenge in adult male offspring. *Behav Brain Res.* 2010;211(1):77-82.

Klein M, Koedel U, Pfister HW. Oxidative stress in pneumococcal meningitis: a future target for adjunctive therapy? *Prog Neurobiol.* 2006;80(6):269-80.

Knuesel I, Chicha L, Britschgi M, Schobel SA, Bodmer M, Hellings JA, Toovey S, Prinszen EP. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(11):643-60.

Konrath L, Beckius D, Tran US. Season of birth and population schizotypy: Results from a large sample of the adult general population. *Psychiatry Res.* 2016;242:245-50.

Kritas SK, Saggini A, Cerulli G, Caraffa A, Antinolfi P, Pantalone A, Frydas S, Rosati M, Tei M, Speziali A, Saggini R, Pandolfi F, Conti P. Neuropeptide NGF mediates neuro-immune response and inflammation through mast cell activation: *J Biol Regul Homeost Agents.* 2014 Apr-Jun;28(2):177-81.; 2014.

Kwiek JJ, Mwapasa V, Milner DA, Jr., Alker AP, Miller WC, Tadesse E, Molyneux ME, Rogerson SJ, Meshnick SR. Maternal-fetal microtransfusions and HIV-1 mother-to-child transmission in Malawi. *PLoS Med.* 2006;3(1):22.

Laird MH, Rhee SH, Perkins DJ, Medvedev AE, Piao W, Fenton MJ, Vogel SN. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *J Leukoc Biol.* 2009;85(6):966-77.

Lante F, Meunier J, Guiramand J, De Jesus Ferreira MC, Cambonie G, Aimar R, Cohen-Solal C, Maurice T, Vignes M, Barbanel G. Late N-acetylcysteine treatment prevents the deficits induced in the offspring of dams exposed to an immune stress during gestation. *Hippocampus.* 2008;18(6):602-9.

Larson SJ, Dunn AJ. Behavioral effects of cytokines. *Brain Behav Immun.* 2001;15(4):371-87.

Lau CI, Wang HC, Hsu JL, Liu ME. Does the dopamine hypothesis explain schizophrenia? *Rev Neurosci.* 2013;24(4):389-400.

- Leppert D, Lindberg RLP, Kappos L, Leib SL. Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain Research Reviews*. 2001;36(2-3):249-57.
- Lesh TA, Niendam TA, Minzenberg MJ, Carter CS. Cognitive control deficits in schizophrenia: mechanisms and meaning. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(1):316-38.
- Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol*. 2003;69(5):341-74.
- Levin R, Calzavara MB, Santos CM, Medrano WA, Niigaki ST, Abilio VC. Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) present deficits in prepulse inhibition of startle specifically reverted by clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(7):1748-52.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186:464-78.
- Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, Williams NM, Schwab SG, Pulver AE, Faraone SV, Brzustowicz LM, Kaufmann CA, Garver DL, Gurling HM, Lindholm E, Coon H, Moises HW, Byerley W, Shaw SH, Mesen A, Sherrington R, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS, Ekelund J, Paunio T, Lonnqvist J, Peltonen L, O'Donovan MC, Owen MJ, Wildenauer DB, Maier W, Nestadt G, Blouin JL, Antonarakis SE, Mowry BJ, Silverman JM, Crowe RR, Cloninger CR, Tsuang MT, Malaspina D, Harkavy-Friedman JM, Svrakic DM, Bassett AS, Holcomb J, Kalsi G, McQuillin A, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Petursson H, Jazin E, Zoega T, Helgason T. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet*. 2003;73(1):34-48.
- Leza JC, Garcia-Bueno B, Bioque M, Arango C, Parellada M, Do K, O'Donnell P, Bernardo M. Inflammation in schizophrenia: A question of balance. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015;55:612-26.
- Lian D, He D, Wu J, Liu Y, Zhu M, Sun J, Chen F, Li L. Exogenous BDNF increases neurogenesis in the hippocampus in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Neuroimmunol*. 2016;294:46-55.
- Ling Z, Chang QA, Tong CW, Leurgans SE, Lipton JW, Carvey PM. Rotenone potentiates dopamine neuron loss in animals exposed to lipopolysaccharide prenatally. *Exp Neurol*. 2004;190(2):373-83.

- Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, del Castillo MD. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med.* 1995;18(2):153-8.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
- Luchicchi A, Lecca S, Melis M, De Felice M, Cadeddu F, Frau R, Muntoni AL, Fadda P, Devoto P, Pistis M. Maternal Immune Activation Disrupts Dopamine System in the Offspring. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2016;19(7).
- Ludewig K, Geyer MA, Vollenweider FX. Deficits in prepulse inhibition and habituation in never-medicated, first-episode schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2003;54(2):121-8.
- Makinodan M, Tatsumi K, Manabe T, Yamauchi T, Makinodan E, Matsuyoshi H, Shimoda S, Noriyama Y, Kishimoto T, Wanaka A. Maternal immune activation in mice delays myelination and axonal development in the hippocampus of the offspring. *J Neurosci Res.* 2008;86(10):2190-200.
- Malaeb S, Dammann O. Fetal inflammatory response and brain injury in the preterm newborn. *J Child Neurol.* 2009;24(9):1119-26.
- Mancini A, Di Battista JA. Transcriptional regulation of matrix metalloprotease gene expression in health and disease. *Front Biosci.* 2006;11:423-46.
- Martner A, Dahlgren C, Paton JC, Wold AE. Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. *Infect Immun.* 2008;76(9):4079-87.
- Masi A, Quintana DS, Glozier N, Lloyd AR, Hickie IB, Guastella AJ. Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry.* 2015;20(4):440-6.
- Maxeiner HG, Marion Schneider E, Kurfiss ST, Brettschneider J, Tumani H, Bechter K. Cerebrospinal fluid and serum cytokine profiling to detect immune control of infectious and inflammatory neurological and psychiatric diseases. *Cytokine.* 2014;69(1):62-7.
- Mayhan WG. Nitric oxide donor-induced increase in permeability of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 2000;866(1-2):101-8.
- McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(5):534-40.

- McGuire JK, Li Q, Parks WC. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. *Am J Pathol.* 2003;162(6):1831-43.
- McIntyre PB, O'Brien KL, Greenwood B, van de Beek D. Effect of vaccines on bacterial meningitis worldwide. *Lancet.* 2012;380(9854):1703-11.
- Meincke U, Light GA, Geyer MA, Braff DL, Gouzoulis-Mayfrank E. Sensitization and habituation of the acoustic startle reflex in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2004;126(1):51-61.
- Meyer U. Prenatal poly(i:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biol Psychiatry.* 2014;75(4):307-15.
- 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(7):1061-79.
- 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.* 2008;22(4):469-86.
- Miller AH, Raison CL. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(1):22-34.
- Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry.* 2011;70(7):663-71.
- Minzenberg MJ, Laird AR, Thelen S, Carter CS, Glahn DC. Meta-analysis of 41 functional neuroimaging studies of executive function in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 2009;66(8):811-22.
- Mishra MK, Dutta K, Saheb SK, Basu A. Understanding the molecular mechanism of blood-brain barrier damage in an experimental model of Japanese encephalitis: correlation with minocycline administration as a therapeutic agent. *Neurochem Int.* 2009;55(8):717-23.
- Modabbernia A, Taslimi S, Brietzke E, Ashrafi M. Cytokine alterations in bipolar disorder: a meta-analysis of 30 studies. *Biol Psychiatry.* 2013;74(1):15-25.
- Mofenson LM, Lambert JS, Stiehm ER, Bethel J, Meyer WA, 3rd, Whitehouse J, Moye J, Jr., Reichelderfer P, Harris DR, Fowler MG, Mathieson BJ, Nemo GJ. Risk factors for perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in women treated with

- zidovudine. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Study 185 Team. *N Engl J Med.* 1999;341(6):385-93.
- Monji A, Kato T, Kanba S. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2009;63(3):257-65.
- Morrison CJ, Butler GS, Rodriguez D, Overall CM. Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21(5):645-53.
- Mousa A, Bakhiet M. Role of cytokine signaling during nervous system development. *Int J Mol Sci.* 2013;14(7):13931-57.
- Munzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med.* 2008;40(3):180-96.
- Murphy K. *Immunobiology of Jeneway.* 8 ed. Washington University School of medicine, St. Louis 2016.
- Muschamp JW, Regina MJ, Hull EM, Winter JC, Rabin RA. Lysergic acid diethylamide and [-]-2,5-dimethoxy-4-methylamphetamine increase extracellular glutamate in rat prefrontal cortex. *Brain Res.* 2004;8(1):134-40.
- Nathan C, Cunningham-Bussel A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(5):349-61.
- Neill JC, Barnes S, Cook S, Grayson B, Idris NF, McLean SL, Snigdha S, Rajagopal L, Harte MK. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol Ther.* 2010;128(3):419-32.
- Niesters M, Khalili-Mahani N, Martini C, Aarts L, van Gerven J, van Buchem MA, Dahan A, Rombouts S. Effect of subanesthetic ketamine on intrinsic functional brain connectivity: a placebo-controlled functional magnetic resonance imaging study in healthy male volunteers. *Anesthesiology.* 2012;117(4):868-77.
- Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H. BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol Histopathol.* 2010;25(2):237-58.
- Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemannel M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature.* 2004;427(6977):843-8.

- Okun E, Griffioen KJ, Lathia JD, Tang SC, Mattson MP, Arumugam TV. Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain Res Rev.* 2009;59(2):278-92.
- Oskvig DB, Elkahloun AG, Johnson KR, Phillips TM, Herkenham M. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain Behav Immun.* 2012;26(4):623-34.
- Overall CM, Blobel CP. In search of partners: linking extracellular proteases to substrates. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):245-57.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):221-33.
- Paintlia MK, Paintlia AS, Singh AK, Singh I. Attenuation of lipopolysaccharide-induced inflammatory response and phospholipids metabolism at the fetomaternal interface by N-acetyl cysteine. *Pediatr Res.* 2008;64(4):334-9.
- Pang Y, Dai X, Roller A, Carter K, Paul I, Bhatt AJ, Lin RC, Fan LW. Early Postnatal Lipopolysaccharide Exposure Leads to Enhanced Neurogenesis and Impaired Communicative Functions in Rats. *PLoS One.* 2016;11(10).
- Parboosing R, Bao Y, Shen L, Schaefer CA, Brown AS. Gestational influenza and bipolar disorder in adult offspring. *JAMA Psychiatry.* 2013;70(7):677-85.
- Parent CI, Meaney MJ. The influence of natural variations in maternal care on play fighting in the rat. *Dev Psychobiol.* 2008;50(8):767-76.
- Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(8):617-29.
- Patrich E, Piontkewitz Y, Peretz A, Weiner I, Attali B. Maternal immune activation produces neonatal excitability defects in offspring hippocampal neurons from pregnant rats treated with poly I:C. *Sci Rep.* 2016;6(19106).
- Pilling S, Bebbington P, Kuipers E, Garety P, Geddes J, Martindale B, Orbach G, Morgan C. Psychological treatments in schizophrenia: II. Meta-analyses of randomized controlled trials of social skills training and cognitive remediation. *Psychol Med.* 2002;32(5):783-91.
- Piontkewitz Y, Arad M, Weiner I. Abnormal trajectories of neurodevelopment and behavior following in utero insult in the rat. *Biol Psychiatry.* 2011;70(9):842-51.

- 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):1273-89.
- Ploeger A, Raijmakers ME, van der Maas HL, Galis F. The association between autism and errors in early embryogenesis: what is the causal mechanism? *Biol Psychiatry*. 2010;67(7):602-7.
- Quednow BB, Kometer M, Geyer MA, Vollenweider FX. Psilocybin-induced deficits in automatic and controlled inhibition are attenuated by ketanserin in healthy human volunteers. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(3):630-40.
- Rahimifard M, Maqbool F, Moeini-Nodeh S, Niaz K, Abdollahi M, Braidly N, Nabavi SM, Nabavi SF. Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: A novel therapeutic strategy for neuroinflammation. *Ageing Res Rev*. 2017;36:11-9.
- Ricci A, Mariotta S, Pompili E, Mancini R, Bronzetti E, Vitis CD, Pisani L, Cherubini E, Bruno P, Gencarelli G, Giovagnoli MR, Terzano C, Ciliberto G, Giarnieri E, Fumagalli L. Neurotrophins system activation in pleural effusion. *Growth Factors*. 2010;28(4):221-31.
- Richetto J, Calabrese F, Riva MA, Meyer U. Prenatal immune activation induces maturation-dependent alterations in the prefrontal GABAergic transcriptome. *Schizophr Bull*. 2014;40(2):351-61.
- Richie MB, Josephson SA. A Practical Approach to Meningitis and Encephalitis. *Semin Neurol*. 2015;35(6):611-20.
- Rincon M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol*. 2012;33(11):571-7.
- Rivest S. Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun*. 2003;17(1):13-9.
- Romero E, Guaza C, Castellano B, Borrell J. Ontogeny of sensorimotor gating and immune impairment induced by prenatal immune challenge in rats: implications for the etiopathology of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2010;15(4):372-83.
- Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med*. 2007;25(1):21-39.
- Roomi MW, Kalinovskiy T, Rath M, Niedzwiecki A. Modulation of MMP-2 and MMP-9 secretion by cytokines, inducers and inhibitors in human glioblastoma T-98G cells. *Oncol Rep*. 2017;37(3):1907-13.

- Rosenberg GA. Extracellular matrix inflammation in vascular cognitive impairment and dementia. *Clin Sci*. 2017;131(6):425-37.
- Roumier A, Pascual O, Bechade C, Wakselman S, Ponce JC, Real E, Triller A, Bessis A. Prenatal activation of microglia induces delayed impairment of glutamatergic synaptic function. *PLoS One*. 2008;3(7):0002595.
- Rowland LM, Bustillo JR, Mullins PG, Jung RE, Lenroot R, Landgraf E, Barrow R, Yeo R, Lauriello J, Brooks WM. Effects of ketamine on anterior cingulate glutamate metabolism in healthy humans: a 4-T proton MRS study. *Am J Psychiatry*. 2005;162(2):394-6.
- Roy A, Srivastava M, Saqib U, Liu D, Faisal SM, Sugathan S, Bishnoi S, Baig MS. Potential therapeutic targets for inflammation in toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated signaling pathways. *Int Immunopharmacol*. 2016;40:79-89.
- Rybakowski JK. BDNF gene: functional Val66Met polymorphism in mood disorders and schizophrenia. *Pharmacogenomics*. 2008;9(11):1589-93.
- Sahin M, Sur M. Genes, circuits, and precision therapies for autism and related neurodevelopmental disorders. *Science*. 2015;350(6263):15.
- Santini E, Klann E. Reciprocal signaling between translational control pathways and synaptic proteins in autism spectrum disorders. *Sci Signal*. 2014;7(349):2005832.
- Saunders NR, Liddel SA, Dziegielewska KM. Barrier mechanisms in the developing brain. *Front Pharmacol*. 2012;3(46):29.
- Schmidt-Kastner R, van Os J, Esquivel G, Steinbusch HW, Rutten BP. An environmental analysis of genes associated with schizophrenia: hypoxia and vascular factors as interacting elements in the neurodevelopmental model. *Mol Psychiatry*. 2012;17(12):1194-205.
- Scola G, Duong A. Prenatal maternal immune activation and brain development with relevance to psychiatric disorders. *Neuroscience*. 2017;346:403-8.
- Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, Davis A, Hammond TR, Kamitaki N, Tooley K, Presumey J, Baum M, Van Doren V, Genovese G, Rose SA, Handsaker RE, Daly MJ, Carroll MC, Stevens B, McCarroll SA. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature*. 2016;530(7589):177-83.
- Sen S, Duman R, Sanacora G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry*. 2008;64(6):527-32.

- Shatz CJ. MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity. *Neuron*. 2009;64(1):40-5.
- Shi L, Smith SE, Malkova N, Tse D, Su Y, Patterson PH. Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring. *Brain Behav Immun*. 2009;23(1):116-23.
- Singh P, Agnihotri SK, Tewari MC, Kumar S, Sachdev M, Tripathi RK. HIV-1 Nef breaches placental barrier in rat model. *PLoS One*. 2012;7(12):11.
- Smigiel KS, Parks WC. Matrix Metalloproteinases and Leukocyte Activation. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;147:167-95.
- Smith SL, Hall ED. Mild pre- and posttraumatic hypothermia attenuates blood-brain barrier damage following controlled cortical impact injury in the rat. *J Neurotrauma*. 1996;13(1):1-9.
- Soreni N, Apter A, Weizman A, Don-Tufeled O, Leschiner S, Karp L, Gavish M. Decreased platelet peripheral-type benzodiazepine receptors in adolescent inpatients with repeated suicide attempts. *Biol Psychiatry*. 1999;46(4):484-8.
- Sperling RS, Shapiro DE, Coombs RW, Todd JA, Herman SA, McSherry GD, O'Sullivan MJ, Van Dyke RB, Jimenez E, Rouzioux C, Flynn PM, Sullivan JL. Maternal viral load, zidovudine treatment, and the risk of transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med*. 1996;335(22):1621-9.
- Steeds H, Carhart-Harris RL, Stone JM. Drug models of schizophrenia. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2015;5(1):43-58.
- Stone JM, Dietrich C, Edden R, Mehta MA, De Simoni S, Reed LJ, Krystal JH, Nutt D, Barker GJ. Ketamine effects on brain GABA and glutamate levels with 1H-MRS: relationship to ketamine-induced psychopathology: *Mol Psychiatry*. 2012 Jul;17(7):664-5. doi: 10.1038/mp.2011.171. Epub 2012 Jan 3.; 2012.
- Swerdlow NR, Geyer MA. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 1998;24(2):285-301.
- Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett*. 2003;140-141:105-12.
- Takahashi W, Nakada TA, Abe R, Tanaka K, Matsumura Y, Oda S. Usefulness of interleukin 6 levels in the cerebrospinal fluid for the diagnosis of bacterial meningitis. *J Crit Care*. 2014;29(4):5.

- Tang G, Gudsnuk K, Kuo SH, Cotrina ML, Rosoklija G, Sosunov A, Sonders MS, Kanter E, Castagna C, Yamamoto A, Yue Z, Arancio O, Peterson BS, Champagne F, Dwork AJ, Goldman J, Sulzer D. Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron*. 2014;83(5):1131-43.
- Tato CM, Hunter CA. Host-pathogen interactions: subversion and utilization of the NF-kappa B pathway during infection. *Infect Immun*. 2002;70(7):3311-7.
- Thanabalasundaram G, Pieper C, Lischper M, Galla HJ. Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro. *Brain Res*. 2010;6:1-10.
- Thomas EHX, Bozaoglu K, Rossell SL, Gurvich C. The influence of the glutamatergic system on cognition in schizophrenia: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017;77:369-87.
- Tishkina A, Stepanichev M, Kudryashova I, Freiman S, Onufriev M, Lazareva N, Gulyaeva N. Neonatal proinflammatory challenge in male Wistar rats: Effects on behavior, synaptic plasticity, and adrenocortical stress response. *Behav Brain Res*. 2016;304:1-10.
- Torrey EF, Bartko JJ, Yolken RH. *Toxoplasma gondii* and other risk factors for schizophrenia: an update. *Schizophr Bull*. 2012;38(3):642-7.
- Torrey EF, Rawlings RR, Ennis JM, Merrill DD, Flores DS. Birth seasonality in bipolar disorder, schizophrenia, schizoaffective disorder and stillbirths. *Schizophr Res*. 1996;21(3):141-9.
- Uggerby P, Nielsen RE, Correll CU, Nielsen J. Characteristics and predictors of long-term institutionalization in patients with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2011;131(1-3):120-6.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
- Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007;82(6):1375-81.
- Varon E. [Epidemiology of acute bacterial meningitis in adult patients in France]. *Med Mal Infect*. 2009;39(7-8):432-44.
- Verma S, Nakaoka R, Dohgu S, Banks WA. Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun*. 2006;20(5):449-55.

Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 2000;7(5):333-40.

Vicario-Abejon C, Owens D, McKay R, Segal M. Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(12):965-74.

Voineagu I, Eapen V. Converging Pathways in Autism Spectrum Disorders: Interplay between Synaptic Dysfunction and Immune Responses. *Front Hum Neurosci.* 2013;7(738):00738.

Vollenweider FX, Geyer MA. A systems model of altered consciousness: integrating natural and drug-induced psychoses. *Brain Res Bull.* 2001;56(5):495-507.

Vuillermot S, Weber L, Feldon J, Meyer U. A longitudinal examination of the neurodevelopmental impact of prenatal immune activation in mice reveals primary defects in dopaminergic development relevant to schizophrenia. *J Neurosci.* 2010;30(4):1270-87.

Walker AK, Nakamura T, Byrne RJ, Naicker S, Tynan RJ, Hunter M, Hodgson DM. Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis. *Psychoneuroendocrinology.* 2009;34(10):1515-25.

Wang S, Yan JY, Lo YK, Carvey PM, Ling Z. Dopaminergic and serotonergic deficiencies in young adult rats prenatally exposed to the bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res.* 2009;10:196-204.

Wang X, Rousset CI, Hagberg H, Mallard C. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006;11(5):343-53.

Weiss IC, Feldon J. Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacology.* 2001;156(2-3):305-26.

Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2009;4:842-57.

Weizman R, Laor N, Karp L, Dagan E, Reiss A, Dar DE, Wolmer L, Gavish M. Alteration of platelet benzodiazepine receptors by stress of war. *Am J Psychiatry.* 1994;151(5):766-7.

Wodarz N, Rothenhofer C, Fischer R, Stober G, Kiehl B, Jungkunz G, Riederer P, Klein HE. Peripheral-type benzodiazepine receptors in

- diagnostic subtypes of schizophrenic patients. *Psychiatry Res.* 1998;81(3):363-9.
- 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.* 2014;42:212-21.
- Xu DX, Wang H, Zhao L, Ning H, Chen YH, Zhang C. Effects of low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment on LPS-induced intra-uterine fetal death and preterm labor. *Toxicology.* 2007;234(3):167-75.
- Yamada S, Iida T, Tabata T, Nomoto M, Kishikawa H, Kohno K, Eto S. Alcoholic fatty liver differentially induces a neutrophil-chemokine and hepatic necrosis after ischemia-reperfusion in rat. *Hepatology.* 2000;32(2):278-88.
- Yarlagadda A, Acharya G, Kasaraneni J, Hampe CS, Clayton AH. Placental Barrier and Autism Spectrum Disorders: The Role of Prolactin and Dopamine on the Developing Fetal Brain. *Innov Clin Neurosci.* 2015;12(9-10):14-7.
- Young J, McKinney SB, Ross BM, Wahle KW, Boyle SP. Biomarkers of oxidative stress in schizophrenic and control subjects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2007;76(2):73-85.
- Zaretsky MV, Alexander JM, Byrd W, Bawdon RE. Transfer of inflammatory cytokines across the placenta. *Obstet Gynecol.* 2004;103(3):546-50.
- Zavitsanou K, Dalton VS, Walker AK, Weickert CS, Sominsky L, Hodgson DM. Neonatal lipopolysaccharide treatment has long-term effects on monoaminergic and cannabinoid receptors in the rat. *Synapse.* 2013;67(6):290-9.
- Zaytseva Y, Chan RC, Poppel E, Heinz A. Luria revisited: cognitive research in schizophrenia, past implications and future challenges. *Philos Ethics Humanit Med.* 2015;10(4):015-0026.
- Zerbo O, Iosif AM, Delwiche L, Walker C, Hertz-Picciotto I. Month of conception and risk of autism. *Epidemiology.* 2011;22(4):469-75.
- Zhao L, Chen YH, Wang H, Ji YL, Ning H, Wang SF, Zhang C, Lu JW, Duan ZH, Xu DX. Reactive oxygen species contribute to lipopolysaccharide-induced teratogenesis in mice. *Toxicol Sci.* 2008;103(1):149-57.
- Zhu F, Zhang L, Ding YQ, Zhao J, Zheng Y. Neonatal intrahippocampal injection of lipopolysaccharide induces deficits in social behavior and prepulse inhibition and microglial activation in rats: Implication for a new schizophrenia animal model. *Brain Behav Immun.* 2014;38:166-74.

Zuckerman L, Rehavi M, Nachman R, Weiner I. Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: a novel neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2003;28(10):1778-89.

Zugno AI, Chipindo HL, Volpato AM, Budni J, Steckert AV, de Oliveira MB, Heylmann AS, da Rosa Silveira F, Mastella GA, Maravai SG, Wessler PG, Binatti AR, Panizzutti B, Schuck PF, Quevedo J, Gama CS. Omega-3 prevents behavior response and brain oxidative damage in the ketamine model of schizophrenia. *Neuroscience*. 2014a;259:223-31.

Zugno AI, Fraga DB, De Luca RD, Ghedim FV, Deroza PF, Cipriano AL, Oliveira MB, Heylmann AS, Budni J, Souza RP, Quevedo J. Chronic exposure to cigarette smoke during gestation results in altered cholinesterase enzyme activity and behavioral deficits in adult rat offspring: potential relevance to schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2013;47(6):740-6.

Zugno AI, Matos MP, Canever L, Fraga DB, De Luca RD, Ghedim FV, Deroza PF, de Oliveira MB, Pacheco FD, Valvassori SS, Volpato AM, Budni J, Quevedo J. Evaluation of acetylcholinesterase activity and behavioural alterations induced by ketamine in an animal model of schizophrenia. *Acta Neuropsychiatr*. 2014b;26(1):43-50.

Zugno AI, Oliveira MB, Mastella GA, Heylmann AS, Canever L, Pacheco FD, Damazio LS, Citadin SA, de Lucca LA, Simoes LR, Malgarin F, Budni J, Barichello T, Schuck PF, Quevedo J. Increased risk of developing schizophrenia in animals exposed to cigarette smoke during the gestational period. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017;75:199-206.

## **ANEXOS**



**Resolução**



*A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.*

**Protocolo: 114/2013-2**

**Professor Responsável:** Tatiana Barichello.

**Equipe:** Ana Paula Moreira, André Ronsoni, Caroline Serafim Dagostin, Gustavo Sangiogo, Jaqueline da Silva Generoso, Jessica Goularte, Lutiana Roque Simões, Michael Hikaru, Paulo Eduardo Aveline, Patricia Rafaely Wielewski, Josiane Budni e Ana Maria Volpato.

**Título:** “Avaliação dos efeitos da ativação imune materna através de lipopolissacarídeos (LPS) nos feto na vida adulta da prole.”

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização de 278 Ratos Wistar de 60 dias de 250-300 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).*

*The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:*

**Protocol number: 114/2013-2**

**Principal Investigator:** Tatiana Barichello.

**Researchers:** Ana Paula Moreira, André Ronsoni, Caroline Serafim Dagostin, Gustavo Sangiogo, Jaqueline da Silva Generoso, Jessica Goularte, Lutiana Roque Simões, Michael Hikaru, Paulo Eduardo Aveline, Patricia Rafaely Wielewski, Josiane Budni e Ana Maria Volpato.

**Project title:** “Evaluation of the effects of maternal immune activation by lipopolysaccharide (LPS) in fetal and adult life of the offspring

*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](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).*

Criciúma, 10 de dezembro de 2013.

  
 Patricia Fernanda Schuck  
 Coordenadora da CEUA



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



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Ativação imune materna e a resposta imune fetal em ratas prenhas infectadas por lipopolissacarídeo**", registrada com o protocolo nº **066/2016-1**, sob a responsabilidade de **Josiane Budni**, junto à equipe: **Ana Paula Moreira, Cassia Rafael, Cristiano J Faller, Gustavo Sangiogo, Jaqueline da Silva Generoso, Jéssica Goularte, Lutiana Roque Simões, Paulo Eduardo Aveline** - 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 **28/06/2016**.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2016 a 30/07/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	292
Peso/Idade	250 g / 60 dias (fetos e adultos)
Sexo	Masculino (168) e Feminino (124)
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: "**Maternal immune activation and fetal immune response in pregnant rats infected by lipopolysaccharide**".

Protocol number: **066/2016-1**

Principal Investigator: **Josiane Budni**

Researchers: **Ana Paula Moreira, Cassia Rafael, Cristiano J Faller, Gustavo Sangiogo, Jaqueline da Silva Generoso, Jéssica Goularte, Lutiana Roque Simões, Paulo Eduardo Aveline**.

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](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 28 de junho de 2016.

  
Jairo José Zocche  
Coordenador da CEUA