

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Ativação precoce na prole de ratas por lipopolissacarídeo (LPS) promove alterações comportamentais e imunes sexualmente dimórficas.

Lívia Pereira Teixeira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.

SÃO PAULO
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Ativação precoce na prole de ratas por lipopolissacarídeo (LPS) promove alterações comportamentais e imunes sexualmente dimórficas.

Lívia Pereira Teixeira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.
Área de Concentração: Imunopatologia
Orientadora: Profa. Dra. Maria Martha Bernardi

SÃO PAULO
2010

Teixeira, Livia Pereira

Ativação precoce na prole de ratas por lipossacarídeo (LPS) promove alterações comportamentais e imunes sexualmente dimórficas./ Livia Teixeira Pereira. – São Paulo, 2009.
112 f. il. Color.

Dissertação (mestrado) – Apresentado ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista, São Paulo, 2009.

Área de Concentração: Imunopatologia
“Orientação: Profª Drª Maria Martha Bernardi”

1. Ansiedade. 2. Depressão. 3. Comportamento doentio. 4. Neonatal. I. Título.

UNIVERSIDADE PAULISTA UNIP
Programa de Mestrado em Medicina Verinária

Candidata: Livia Pereira Teixeira

Título da Dissertação: Ativação precoce na prole de ratas por lipopolissacarídeo (LPS) promove alterações comportamentais e imunes sexualmente dimórficas.

Orientadora: Maria Martha Bernardi

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

Aprovada

Reprovada

1) Examinador (a) _____

Nome _____

Instituição _____

2) Examinador (a) _____

Nome _____

Instituição _____

3) Presidente _____

Nome _____

Instituição _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha falecida mãe, Beatriz, pelo amor e os ensinamentos éticos e morais de toda uma vida e que estaria muito orgulhosa em compartilhar mais esta vitória comigo.

Ao meu pai, Sérgio, por todo o amor, apoio e por me ensinar que a única coisa que jamais poderá ser roubada de alguém é o seu saber. Exemplo de integridade. Por me mostrar o quanto é importante sermos independentes.

Ao meu irmão, Júlio, que me mostrou que todo o poder esta dentro de nós, que por pior que seja uma situação podemos vencê-la com fé, dignidade e bom humor, que não permitamos jamais que nos digam que não somos capazes, por todo o seu amor.

Ao meu falecido avô, Melchiades, homem a frente de seu tempo, meu querido contador de histórias, que foi sempre um grande incentivador de meus estudos, companheiro de grandes papos e idéias. Infelizmente não conseguiu acompanhar este trabalho até o fim, mas certamente estaria muito feliz.

A minha avó, Lúcia, por sempre estar ao meu lado, nos melhores e piores momentos, por sempre acreditar em mim quando outros não acreditavam, por seu amor incondicional, suas sábias e quase proféticas palavras, pelos lanchinhos de madrugada, por ser um referencial de força e honestidade, por seu bom humor e pelas broncas dadas da maneira mais doce. Minha fortaleza. Sem a senhora eu não teria conseguido

Ao meu marido Júlio que sempre me incentivou, ajudou e esteve ao meu lado, exemplo de determinação e garra inspiradora. Por toda sua paciência e amor.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À amiga e orientadora Profa. Dra. Maria Martha Bernardi, pela confiança, por acreditar no meu potencial, pelo incentivo, profissionalismo, paciência em ensinar-me, carinho e compreensão.

Aos animais usados neste trabalho meu sincero respeito.

AGRADECIMENTOS

- ✓ À Dra. Ana Paula Ligeiro, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - USP, pelos comentários construtivos, pela ajuda na revisão bibliográfica e pelo auxílio nas dosagens sanguíneas, medulares, hormonais e das citocinas;
- ✓ Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Bondan, do Programa de Mestrado da Universidade Paulista - UNIP, pela participação nas bancas de qualificação e defesa deste trabalho;
- ✓ Ao Prof. Dr. Maurício Marcio A. B. Moreira, chefe do Laboratório de Patologia Clínica e Banco de Sangue Veterinário do Hospital Veterinário Anhembi Morumbi, pela contagem diferencial de leucócitos no sangue dos animais testados;
- ✓ À Caroline Sultanum, médica veterinária residente do Hospital Veterinário da Universidade Anhembi Morumbi, pela contagem diferencial de leucócitos no sangue dos animais testados;
- ✓ Ao Ms. Thiago Kirsten, pelos seus comentários construtivos a ajuda com o programa EndNot;
- ✓ À Magali Caetano, técnica do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Aplicada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pelo auxílio na aprendizagem da manipulação dos animais e metodologia experimental;
- ✓ Ao colega Marcos de Souza, pelo auxílio nos experimentos comportamentais e imunes;
- ✓ À colega Nancy Monteiro, pelo auxílio nos experimentos comportamentais;
- ✓ À médica veterinária e colega Ana Maria Souto, pelo cuidado com os animais;

- ✓ *Às técnicas do Biotério da Universidade Paulista - UNIP, Dadá, Sandra e Cristiane, pelos cuidados com os animais e apoio técnico durante os experimentos;*
- ✓ *À Prof. Ms.Daclé Juliani Macrini, da Universidade Paulista - UNIP, pelas orientações no Laboratório de Comportamento e Biotério;*
- ✓ *Ao Prof. Dr. César Dinola, por ter despertado meu interesse pela pesquisa científica;*
- ✓ *A todos os professores do Programa de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Paulista - UNIP, por todos os ensinamentos e lições durante esses dois anos;*
- ✓ *Ao Prof. Dr. José Luiz Guerra, pelo incentivo para que eu tentasse o mestrado;*
- ✓ *À secretária da pós-graduação do Programa de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Paulista – UNIP, Andrea Halluli, pelo auxílio na parte burocrática;*
- ✓ *À Aparecida Mason, pela revisão ortográfica;*
- ✓ *Aos meus queridos amigos e familiares que sempre torceram e me apoiaram;*
- ✓ *A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ESQUEMA

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO

1.1. Depressão.....	1
1.2. Ansiedade.....	3
1.3. Sistema Imune e Sistema Nervoso Central.....	6
1.4. Lipopolissacarídeo – LPS.....	15
1.5. Dimorfismo Sexual.....	19
1.6. Sistema Imune e Período Neonatal.....	22

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral.....	29
2.2. Objetivos Específicos.....	29

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais.....	30
3.2. Drogas e Soluções.....	32
3.3. Tratamento e Procedimentos Neonatais.....	34
3.4. Tratamento e Procedimentos na Idade Adulta.....	35
3.5. Determinação da Fase do Ciclo Estral.....	36
3.6. Métodos Comportamentais.....	38
3.6.1. Avaliação da Atividade Geral em Campo Aberto.....	38

3.6.2. Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado.....	39
3.6.3. Avaliação do comportamento na Natação Forçada.....	40
3.7. Métodos Imunológicos.....	41
3.7.1. Determinação do Número de Leucócitos Circulantes.....	41
3.7.2. Determinação do Número Total de Células na Medula Óssea.....	41
3.7.3. Quantificação de Mediadores Inflamatórios.....	42
3.7.4. Avaliação dos Níveis Séricos de Corticosterona.....	42
3.8. Delineamento Experimental.....	42
4. RESULTADOS	
Experimento 1.....	45
Experimento 2.....	47
Experimento 3.....	49
Experimento 4.....	51
Experimento 5.....	53
Experimento 6.....	55
Experimento 7.....	61
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÃO	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

LISTA DE ABREVIATURAS

LPS	Lipopolissacarídeo
HPA	Eixo hipotalâmico- hipofisário- adrenal
TLR	Receptor <i>Toll like</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
IL -1 β	Interleucina 1beta
IL	Interleucina
CRH	Hormônio hipotalâmico de liberação de corticotrofina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
SNC	Sistema nervoso central
OVA	Ovoalbumina
SI	Sistema imune
DPN	Dia pós natal
i.p.	Via intra-peritoneal
LCE	Labirinto em cruz elevado
PMN	Células polimorfonucleares
MN	Células mononucleares
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
SLF	Fêmeas tratadas no período neonatal com solução salina e desafiadas com LPS na idade adulta
LLF	Fêmeas tratadas no período neonatal com LPS e desafiadas com a mesma endotoxina na idade adulta
SLM	Machos tratados no período neonatal com solução salina e desafiados com LPS na idade adulta
LLF	Machos tratados no período neonatal com LPS e desafiados com a mesma endotoxina na idade adulta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Sistema Límbico, Vista lateral do Córtex. Retirado de (MARTIN et al., 2009).....	5
Figura 2 -	Efeitos gerais, vasculares, neuronais e na glia das citocinas. Retirado de (ALLAN; ROTHWELL, 2001).....	10
Figura 3 -	Mecanismo de ação dos glicocorticóides em células imunes. Retirado de (STERNBERG, 2006).....	12
Figura 4 -	Cascata de efeitos neuroendócrinos em resultado da estimulação promovida pelo estresse. Retirado de (GLASER; KIECOLT-GLASER, 2005).....	14
Figura 5 -	Estrutura do LPS. Retirado de (BROOKS et al., 2000).....	15
Figura 6 -	Modelo estrutural da parede celular da Escherichia coli, destacando o lipopolissacarídeo conforme proposição de (RAETZ; WHITFIELD, 2002).....	16
Figura 7 -	Ativação celular por LPS. Retirado de (COHEN, 2002).....	18
Figura 8 -	Comparação do desenvolvimento pré e pós-natal do cérebro de ratos e humanos. Retirado de (MORGANE et al., 2002).....	26
Figura 9 -	Rato Wistar e Gaiola de Polipropileno. Retirado de http://www.criver.com/enUS/ProdServ/ByType/ResModOver/ResMod/Pages/WistarFurth.aspx e http://insightltda.com.br/insight-equipamento-cientifico-133-Caixa%20de%20Polipropileno%20Completa%2030%20x%2019%20x%2013%20cm	31
Figura 10 -	Padronização das Ninhadas em 4 machos e 4 fêmeas. Retirado de http://www.folkcatart.com/blogs/jen/?cat=63	31
Figura 11 -	Rata Wistar com filhotes. Cedido por BERNARDI M.M.....	32
Figura 12 -	Solução Salina à 0,9%. Arquivo pessoal.....	33
Figura 13 -	Eppendorfs com LPS. Arquivo pessoal.....	33

Figura 14 -	Ketamina® (AGENER) e Rompum® (BAYER) Retirado de http://mercado.ruralcentro.com.br/categoria/790/produtosveterinarios/anestesico-e-sedativo/anestesico-e-sedativo-injetavel.....	33
Figura 15 -	Rato Wistar DPN2. Arquivo pessoal.....	34
Figura 16 -	Contenção física e injeção (i.p.) em rato Wistar. Retirado de Assessing the Health and Welfare of Laboratory Animals. Disponível e: http://www.ahwla.org.uk/site/tutorials/BVA/BVA06-Rat/Rat.html.....	35
Figura 17 -	Coleta do lavado vaginal com 10 µL de salina. Retirado de MARCONDES (MARCONDES et al., 2002).....	36
Figura 18 -	Fotomicrografia de lavado vagina. Retirado de MARCANDES ET AL (MARCONDES et al., 2002).....	37
Figura 19 -	Rato Wistar em sessão do teste de Atividade Geral em Campo Aberto. Cedido por BERNARDI M.M.....	38
Figura 20 -	???????????????? m sessão do teste do Labirinto em Cedido por BERNARDI M.M.....	40
Figura 21 -	Rato Wistar em sessão do teste de Natação Forçada. Retirado de BIANCHI ET AL (BIANCHI et al., 2002).....	41
Figura 22 -	Efeitos da ativação precoce do sistema imune com LPS (50 µg/Kg) na atividade geral observada em campo aberto de ratos machos e fêmeas, desafiados com 100µg/Kg da mesma endotoxina na idade adulta. ^a p < 0,05 em relação ao respectivo grupo controle; * p < 0,05 em relação ao sexo. N= 13/grupo. ANOVA de 2 vias seguida pelo teste de Bonferroni.....	46
Figura 23 -	Efeitos da ativação precoce do sistema imune com LPS (50 µg/Kg) no labirinto em cruz elevado de ratos machos e fêmeas desafiados com 100µg/Kg da mesma endotoxina na idade adulta. ^a p < 0,05 em relação ao respectivo grupo controle; * p < 0,05 em relação ao sexo. N = 13/grupo. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni.....	48

- Figura 24 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) no teste de natação forçada de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta. ^a $p < 0,05$ e em relação ao respectivo grupo controle; * $p < 0,05$ em relação ao sexo. N = 13/grupo. ANOVA de 2 vias..... 50
- Figura 25 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) no número leucócitos circulantes totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta. N= 6/ grupo. ANOVA de 2 vias. *** $p < 0.001$ em relação aos animais dos demais grupos..... 52
- Figura 26 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) no número total de células da medula óssea de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta. N= 6/ grupo. ANOVA de 2 vias. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $p < 0.001$ em relação ao sexo..... 54
- Figura 27 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) nos níveis IL-1 β E TNF α no soro de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta. N= 4-5 grupo. ANOVA de 2 vias. $a < p, 0,05$ em relação ao grupo SLF, * $p < 0,05$ em relação ao grupo LLF..... 56
- Figura 28 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) nos níveis IL-1 β E TNF α no baço de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta. N= 4-5 grupo. ANOVA de 2 vias. $a < p, 0,05$ em relação ao grupo SLM, * $p < 0,05$ em relação ao grupo LLM..... 58
- Figura 29 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) nos níveis IL-1 β E TNF α nos linfonodos de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta. N= 4-5 grupo. ANOVA de 1 vias. $a < p, 0,05$ em relação ao grupo SLM, * $p < 0,05$ em relação aos grupos SLF e LLM..... 60
- Figura 30 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) nos níveis de corticosterona plasmática de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta. N= 4-5 grupo. ANOVA de 1 via seguida pelo teste de Newman-Keuls ? $< p, 0,05$ em relação ao grupo SLM, * $p < 0,05$ em relação ao grupo LLM..... 61

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 -	Delineamento Experimental	43
-------------	---------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos de Citocinas Inflamatórias na Função Neural.....	27
Tabela 2 - Descrição dos Grupos Experimentais.....	43

Resumo

Algumas evidências indicam que a ativação imune aguda com LPS no período neonatal modifica diversos processos fisiológicos, comportamentais e a resposta a doenças na idade adulta, os quais são modulados pelo tempo de exposição, sexo e estímulo imunológico. Este trabalho investigou os efeitos comportamentais no sistema imune da exposição da prole feminina e masculina de ratas ao LPS (50µg/kg) administrado no 2º dia de vida pós-natal, que receberam na idade adulta um desafio com a mesma endotoxina (100µg/kg). Empregaram-se modelos animais ligados à emocionalidade/exploração, ansiedade e depressão e analisaram-se os níveis de corticosterona plasmática, o leucograma, células hematopoiéticas medulares e os níveis de citocinas no sangue, baço e linfonodos após o desafio com LPS. Os resultados mostraram que, de uma forma geral, a administração neonatal de LPS alterou o dimorfismo sexual nos modelos comportamentais estudados após o desafio com a endotoxina, na celularidade sanguínea e medular bem como nos níveis de citocinas. Estes resultados sugerem que a ativação precoce do sistema imune por LPS promove comportamento doentio e menor ansiedade em fêmeas e não em machos. Por outro lado, ratos machos do grupo experimental não apresentam comportamento doentio, e menores sinais de ansiedade e depressão. A análise do número de total de leucócitos circulantes e no número total de células da medula óssea indicou que houve aumento significativo em ratos machos do grupo experimental com relação àqueles do grupo controle. Não houve alterações nestes parâmetros nas fêmeas de ambos os grupos. Em relação à dosagem de citocinas no linfonodo as fêmeas expostas neonatalmente ao LPS secretaram mais IL-1β que machos de mesmo tratamento e muito mais que fêmeas que não foram tratadas neonatalmente com LPS; resultados similares foram vistos quando da dosagem de TNFα porém sem significância estatística. No baço não foram observadas alterações entre os grupos nos níveis de IL-1β, porém, fêmeas tratadas neonatalmente secretaram mais TNFα que fêmeas e machos dos grupos não tratados neonatalmente; em machos tratados neonatalmente houve menor secreção de TNFα neste local. No soro verifica-se que existe dimorfismo sexual nas secreções de IL-1β e TNFα. O tratamento com LPS na idade adulta aumentou a secreção de IL-1β em relação aos machos de grupo de mesmo tratamento. Estes dados permitem sugerir que a exposição em período precoce da vida ao LPS em

fêmeas promove maior comportamento doentio, menor ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, maiores níveis de IL-1 β no soro e linfonodos e nenhuma alteração na celularidade avaliados, o que corrobora com a redução neste grupo dos níveis de corticosterona. Em machos a administração neonatal de LPS seguida, na idade adulta, do desafio imune não promoveu comportamento doentio no campo aberto, não alterou a ansiedade no labirinto em cruz elevado e reduziu a depressão no modelo de natação forçada. Por outro lado observou-se nestes animais redução significativa na celularidade sanguínea e medular e redução na secreção de TNF α no baço.

Palavras chaves: Lipopolissacarídeo, depressão, ansiedade, atividade geral, dimorfismo sexual, imunidade.

Abstract

Some evidence indicates that acute immune activation with LPS in the neonatal period alters several physiological processes, behavior and response to diseases in adult age, which is modulated by the exposure time, gender and immune stimulation. This study investigated the dimorphic behavioral and immune effects of female and male offspring exposure to LPS (50 μ g/kg) administered on day 2 of postnatal life. In addition, these rats received in adulthood a challenge with the same endotoxin (100 μ g/kg). The open field, plus maze and swimming behavioral tests were employed to investigate the sexual dimorphic effects of LPS perinatal exposure in adult rats. Also, the corticosterona plasma levels, the leucogram and bone marrow hematopoietic cells as well as the cytokine levels in the blood, spleen and lymph nodes after challenge with LPS were analyzed. Results showed that, in general, perinatal LPS administration altered the sexual dimorphism in the behavioral patterns studied after challenge with endotoxin, the sexual dimorphism of the blood and bone marrow cellularity and the levels of cytokines. These results suggest that early activation of the immune system by LPS promotes sickness behavior and less anxiety in females rather than males. Moreover, experimental male rats did not presented sickness behavior, but less anxiety and depression. The analysis of the total number of leukocytes and the total number of bone marrow cells indicated that there was a significant increase in experimental male rats relative to those in the control group. There were no changes in these parameters in females of both groups. In relation to the cytokines levels in lymph, females exposed perinatally to LPS secreted more IL-1 β than males of the same treatment and more than females who were not treated perinatally with LPS; similar results were seen in the TNF α levels, but the data did not reach statistical significance. In the spleen, no changes were observed between groups in the IL-1 β levels. However, experimental females challenged in adult age secreted more TNF α than females and males of the groups not treated perinatally; Experimental males had lower secretion of TNF α on this site. It was also observed a sexual dimorphism IL-1 β and TNF α secretion in serum. Treatment with LPS in adulthood increased the secretion of IL-1 β compared to males of the same treatment group. These findings suggested that exposure in the early stages of life to LPS in females promotes greater sickness behavior, less activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, higher levels of IL-1 β in serum and lymph

nodes and no change in cellularity assessed, which confirms the reduction in this group the levels of corticosterone. In males the neonatal administration of LPS then into adulthood, the immune challenge did not produced sickness behavior in the open field, did not alter the anxiety in the elevated plus-maze and reduced the depression in the forced swimming model. On the other hand it was observed in these animals a significant reduction in blood and bone marrow cellularity and a reduction in the secretion of TNF α in the spleen.

Key words: Lipopolysacharide, depression, anxiety, general activity, sexual dimorphism, immunity.

INTRODUÇÃO

1.1. Depressão

A depressão é uma doença conhecida de longa data pelos seres humanos, era chamada de melancolia pelos antigos gregos e já era relacionada a um mau prognóstico quando associada às outras doenças como, por exemplo, o câncer (BERRIOS, 1988). É uma condição relativamente comum (WARAICH et al., 2004) de curso crônico (MUELLER et al., 1999) e recorrente (KELLER, M. B. et al., 1992; KELLER, S. et al., 2003).

Estima-se que mais de 15% de todos os adultos irão experimentar um episódio de depressão maior em algum momento de suas vidas (REGIER et al., 1993; KESSLER et al., 1994). O suicídio é estimado em ser a causa da morte de até 15% dos indivíduos com transtorno depressivo maior e, além de suicídio, a saúde e muitos outros efeitos nocivos relacionados à doença são cada vez mais reconhecidos (MUSSELMAN et al., 1998; SCHULZ et al., 2000).

Longe de ser uma doença apenas de manifestações psicológicas, o transtorno depressivo é uma doença sistêmica com deletérios efeitos sobre múltiplos órgãos (MUSSELMAN et al., 1998; SCHULZ et al., 2000). Pacientes com doenças clínicas e depressão têm maior risco de não aderirem às recomendações médicas (DIMATTEO et al., 2000; KATON et al., 2001). Depressão e ansiedade parecem ainda aumentar a percepção de sintomas físicos inexplicáveis (KATON et al., 2001). Ainda assim a depressão segue sendo subdiagnosticada e subtratada. Entre 30 e 60% dos casos de depressão não são detectados pelo médico clínico em cuidados primários (RONALDS et al., 1997; KESSLER et al., 2003; WARAICH et al., 2004).

As crises recorrentes de episódios depressivos levam a um aumento da taxa de problemas afetivos, conjugais, desagregação familiar, desemprego, incapacidade de progredir na carreira e conseqüente dificuldades financeiras. Os custos associados com a incapacidade e morte prematura relacionadas a esta doença representam um ônus econômico de dezenas de bilhões de dólares anualmente aos Estados Unidos (RAO et al., 1989; GREENBERG et al., 1999). De acordo com o *Global Burden of Disease Study*, os transtornos de humor estão entre as principais

causas de incapacidade no mundo atualmente (MURRAY; LOPEZ, 1997). Apesar do impacto devastador que esta doença gera na vida de milhões de pessoas em todo o mundo, ainda há falta de conhecimentos sobre sua etiologia e fisiopatologia (SOLOMON et al., 2000).

Atualmente especula-se se o aumento desta doença estaria relacionado ao estresse da vida moderna, pois verifica-se que as taxas de prevalência dos transtornos de ansiedade e depressão são mais ou menos as mesmas em muitos países diferentes, apesar de diferenças ambientais, culturais e sociais sendo então atribuídas principalmente a causas culturais ou psicossociais. Se este fosse o caso, determinantes neurobiológicos que são distribuídos estatisticamente entre todas as pessoas, independentemente do seu meio sociocultural, também deveriam ser vistos como um relevante fator etiológico (KENDLER et al., 1987; LEPINE, 2001; NARROW et al., 2002).

Como descrito por Hastings et al. (HASTINGS et al., 2004) diversos distúrbios neuroanatômicos e bioquímicos foram encontrados em indivíduos que sofrem de diferentes tipos de transtornos psiquiátricos, entre eles a depressão. As principais alterações neuroanatômicas implicadas nos transtornos de humor podem ser divididas em dois grupos: as anormalidades cerebrais generalizadas que se caracterizam por atrofia cerebral (medidas ventriculares, medidas sulcais, volume cerebral) e lesões da substância branca e as anormalidades cerebrais regionais das regiões corticais, subcorticais (tálamo, amígdala e hipocampo, gânglios da base), estruturas da fossa superior (cerebelo) e outras (eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, núcleo supraquiasmático e lateralidade das lesões anatômicas) (SOARES; MANN, 1997; LACERDA et al., 2004). A depressão unipolar parece associar-se a anormalidades no lobo frontal (particularmente no córtex pré-frontal subgenua), gânglios da base (especialmente estriado), cerebelo e complexo amígdala/hipocampo. (SOARES; MANN, 1997) .

No entanto a teoria da hipótese monoaminérgica da depressão propõe que a doença seja consequência da menor disponibilidade de aminas biogênicas cerebrais, em particular de serotonina, noradrenalina e/ou dopamina. Ela baseia-se no conhecimento do mecanismo de ação dos antidepressivos que aumentam a

disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica, quer seja pela inibição de suas recapturas, ou pela inibição da enzima responsável por suas degradações (inibidores da monoaminoxidase). (STAHL, 2002).

Em 1991, Smith (SMITH, R. S., 1991) propôs a teoria macrofágica da depressão. Considerando os efeitos potentes de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 no cérebro e a associação entre os estados patológicos da alteração imunológica e depressão, Smith postulava que a secreção excessiva de IL-1 e outros produtos de macrófagos estariam envolvidos na patogênese da depressão. Foi sugerido então que os déficits de comportamento, anormalidades nas monoaminas centrais, e ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA) observados na depressão estariam associados com alterações na função imune (ANISMAN, 2009; KHAIROVA et al., 2009; MILLER, A. H. et al., 2009).

O paciente deprimido apresenta distúrbios do sono, diminuição de apetite, perda de peso ou ganho de peso, perda do prazer ou interesse e humor deprimido (TAKADA et al., 2009) que se assemelham bastante às características comportamentais observadas em animais apresentando comportamento doentio.

A depressão foi descrita por Hipócrates no século I AC como um desbalanço entre os quatro líquidos corpóreos – sangue, fleuma, bile amarela e bile negra – cujo excesso causaria a melancolia, termo então usado para depressão. Transtornos psicológicos refletindo processos físicos, portanto, já foram relacionados na antiguidade (MILLER, E. J.; CHUNG, 2009).

1.2. Ansiedade

A ansiedade é tida como uma função normal e adaptativa. Inúmeras pesquisas no campo da ansiedade têm mostrado que as raízes biológicas da ansiedade encontram-se nas reações de defesa que os animais exibem em resposta a diferentes estímulos em situações de perigo (SANDFORD et al., 2000). Sua expressão envolve alterações comportamentais, psicofisiológicas e cognitivas (CAROBREZ et al., 1983; GRAEFF, 1994). Ao contrário do medo, que se manifesta

em situações em que o perigo é iminente, a ansiedade se manifesta em situações onde o perigo é apenas potencial e incerto (CAROBREZ et al., 1983; RODGERS; DALVI, 1997; LANG et al., 2000).

A ansiedade e o medo passam a ser reconhecidos como patológicos quando são exagerados, desproporcionais em relação ao estímulo, ou qualitativamente diversos do que se observa como norma em uma determinada faixa etária e interferem com a qualidade de vida, o conforto emocional ou o desempenho diário do indivíduo, tais reações exageradas ao estímulo ansiogênico se desenvolvem, mais comumente, em indivíduos com uma predisposição neurobiológica herdada (ROSEN; SCHULKIN, 1998).

Muitos neurotransmissores parecem estar envolvidos na gênese e modulação da ansiedade, entre eles a noradrenalina, a serotonina, a dopamina, o ácido gama aminobutírico (GABA), a glicina, os aminoácidos excitatórios, o hormônio hipotalâmico de liberação de corticotrofina (CRH), a corticosterona e a colecistocinina, entre outros neuropeptídeos (BEHAN et al., 1996; MILLAN, 2003; MILLAN; BROCCO, 2003). Atualmente, existem várias evidências de que os neuropeptídeos desempenham um papel importante na modulação do estado de ansiedade (HARRO et al., 1993; WETTSTEIN et al., 1995; TEIXEIRA et al., 1996; STROHLE et al., 1997; RIBEIRO; DE LIMA, 1998; RUPNIAK et al., 2000).

Estudos animais sugerem que reações análogas ao medo humano são mediadas e integradas por substratos neuroanatômicos localizados no sistema límbico (KOPCHIA et al., 1992; YADIN et al., 1993; GRAEFF, 1994; SANDERS et al., 1995; AGUIAR; BRANDAO, 1996; SANDFORD et al., 2000). Dois conceitos fundamentais ajudam a compreender a anatomia funcional da ansiedade. Os circuitos neurais relacionados com a ansiedade são organizados em diferentes níveis, refletindo as diferentes demandas do processo cognitivo. Respostas automáticas são mediadas por áreas da região inferior do encéfalo, como a substância cinzenta periaquedutal (PAG), acima dessa área estão os níveis intermediários (amígdala e sistema septohipocampal) e as regiões corticais (córtex paralímbico) que gerenciam respostas com uma demanda maior de cognição. (SANDFORD et al., 2000). Porém, estas regiões mantêm diversas conexões umas com as outras.

A PAG recebe aferências descendentes do sistema límbico e do córtex paralímbico; sua estimulação pode desencadear respostas de luta ou fuga e ainda variações na pressão arterial e nos batimentos cardíacos (GRAEFF et al., 1993). O locus coeruleus, um núcleo noradrenérgico localizado na ponte, envia eferências para o córtex, áreas límbicas e tálamo (ASTON-JONES et al., 1996) e sua estimulação farmacológica ou eletrofisiológica também desencadeia respostas características de um quadro de ansiedade (KOC SIS et al., 1985). O hipotálamo recebe aferências do locus coeruleus e do sistema límbico e desempenha um papel importante nas respostas endócrinas da ansiedade através da sua participação no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). A amígdala ou processo amigdalóide tem muitas comunicações com córtex cerebral, tálamo, locus coeruleus, estriado, mesencéfalo e tronco cerebral e ainda, recebe eferências da PAG e do hipotálamo e através desta rede, a resposta fisiológica é mediada. Juntamente com o hipocampo, a amígdala também exerce importante função na regulação do eixo HPA.

Tendo em vista que o estresse pode ser um potente causador de transtornos da ansiedade, as estruturas amígdala e hipocampo regulam o sistema hipotálamo-hipófise-adrenal, a primeira estimulando e a segunda suprimindo as respostas deste sistema (DREVETS et al., 2008).

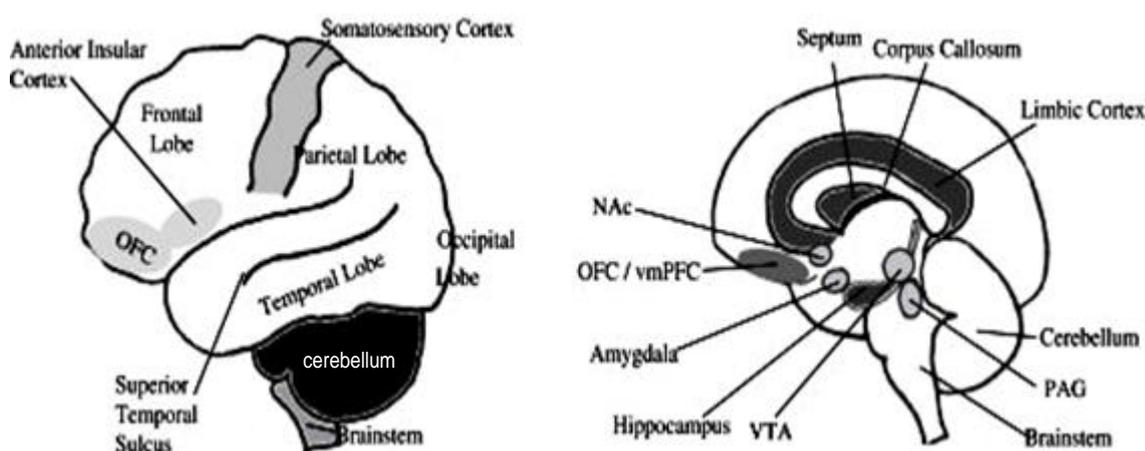


Figura 1 - Sistema Límbico (A) Vista lateral do Córtex (B) Visão de corte sagital através da linha média. NAc, núcleo accumbens; OFC, córtex orbital frontal; PAG, substância cinzenta periaquedutal, VTA, área ventral tegmental. Retirado de Martin (MARTIN et al., 2009)

A maneira prática de se diferenciar ansiedade normal de ansiedade patológica é basicamente avaliar se a reação ansiosa é de curta duração, auto

limitada e relacionada ao estímulo do momento ou não. Quando patológica pode ser caracterizada por sentimentos de temor acompanhados por sinais somáticos de hiperatividade do sistema nervoso autônomo, nervosismo, tremores, tensão muscular, sudorese, sensação de cabeça leve, palpitações, tonturas e desconforto epigástrico (WEISBERG, 2009).

Estima-se que $\frac{1}{4}$ da população geral já sofreu de algum transtorno de ansiedade (WEISBERG, 2009). Transtornos de ansiedade são o grupo de transtornos psiquiátricos mais prevalentes, com uma prevalência estimada ao longo da vida de 28,8% e uma prevalência estimada em 12 meses de 18,1% na população geral (KESSLER et al., 2005a; KESSLER et al., 2005b).

Este transtorno atinge em sua maioria mulheres. Conforme estudo populacional realizado nos EUA, Kessler et al. (KESSLER et al., 1994) relata que enquanto a prevalência de vida é de 3,6% para o sexo masculino, este índice é de 6,6% para as mulheres. Resultados mostrados na revisão de Kessler (KESSLER, 2000) suportam a idéia de que o transtorno da ansiedade generalizada pode ser considerado um dos maiores problemas de saúde pública, pois sua capacidade de incapacitar é considerável à encontrada nos casos de depressão maior.

As manifestações psicológicas e fisiológicas da ansiedade têm sido extensamente estudadas, mas os mecanismos biológicos envolvidos na sua regulação ainda não foram completamente esclarecidos.

1.3. Sistema Imune e Sistema Nervoso Central

A descoberta de vias funcionais bilaterais existentes entre os sistemas imunológico e neuroendócrino foi uma das mais fascinantes para melhor compreensão da regulação do equilíbrio homeostático dos organismos vivos desafiados por antígenos (ROSAS-BALLINA; TRACEY, 2009) .

A relação do sistema neuroendócrino e do sistema imune foi proposta inicialmente por Seyle (SEYLE, 1936) que descreveu o desenvolvimento de uma síndrome decorrente da exposição de um animal a um conjunto diversificado de estímulos nocivos, tais como a exposição ao frio, injúria tecidual, excesso de exercícios e intoxicações. Os achados de necropsopia característicos dessa

síndrome foram hipertrofia das glândulas adrenais, aparecimento de úlceras gástricas e atrofia de órgãos linfóides, como timo, baço e linfonodos. Devido à independência do estímulo empregado Seyle concluiu que, representavam uma resposta orgânica à injúria, denominando-os coletivamente de 'síndrome de adaptação geral', posteriormente chamada de estresse. Este foi o primeiro registro de que o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imune (SI) apresentavam inter-relações.

Besendovisky na década de 70 avaliou as interações entre os SNC e SI. Em 1975, este autor (BESENDOVISKY, 1975) demonstrou que a imunização de animais com diferentes antígenos induzia mudanças neuroendócrinas e de atividade no sistema nervoso central, propondo então, que os produtos originários de processos imune/inflamatórios agiriam sobre a atividade do SNC.

O comportamento doentio é resultado desta interação. Assim, inúmeros trabalhos da literatura revelam que as alterações comportamentais decorrentes de doenças não são resultados da doença em si, mas da ação de mediadores do processo inflamatório no sistema nervoso central (KELLEY et al., 2003; DANTZER; KELLEY, 2007a; YARLAGADDA et al., 2009).

Pode-se definir comportamento doentio como o conjunto de alterações comportamentais que acompanham grande número de processos patológicos que ocorrem aparentemente sem ligação fisiopatológica. Estes comportamentos modificados durante a doença, expressam-se por alterações no padrão do sono, perda aparente do interesse por atividades cotidianas e positivas, como a busca por alimento, perda do contato social, e do interesse sexual. Este estado de anedonia é então caracterizado pela falta de busca do prazer somada à incapacidade aparente de percebê-lo ou apreciá-lo (KENT et al., 1992a; KENT et al., 1992b).

Segundo Dantzer (DANTZER, 2001a), os sintomas do comportamento doentio juntamente com a febre e outras mudanças fisiológicas associadas à doença, são uma estratégia altamente organizada do ser vivo para combater a infecção (HART, 1988). A febre (termogênese) associada à redução da perda de calor estimularia a proliferação de células do SI e produziria um ambiente desfavorável ao crescimento de muitas bactérias e vírus patógenos. Por outro lado,

o aumento da temperatura corporal exige grande atividade metabólica. Assim, na resposta inflamatória é necessário que haja sincronia entre os componentes metabólicos, fisiológicos e comportamentais do indivíduo. Os mediadores deste processo dependem de sinais moleculares mediados pelas citocinas inflamatórias as quais são liberadas pelos monócitos e macrófagos (KELLEY et al., 2003).

No início de 1980 as citocinas foram caracterizadas como moléculas de comunicação entre as células imunes e células endoteliais. O seu papel é fundamental na regulação da resposta imune e da coordenação da resposta do hospedeiro à infecção. Por seu papel na inflamação, citocinas são classificadas como citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1), IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF), e anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e IL-13 (OPAL; DEPALO, 2000).

Citocinas no SNC estão envolvidas em diferentes mecanismos de regulação: início da atividade imune no SNC durante um processo inflamatório; regulação da barreira hematoencefálica; desenvolvimento de mecanismos de reparo após a lesão; regulação do sistema endócrino no eixo HPA; diferentes influências estimuladoras e inibidoras de neurotransmissores dopaminérgicos, serotoninérgicos, noradrenérgicos e colinérgicos. As citocinas ativam as células do SNC de diferentes formas (ANISMAN; MERALI, 2003). Em primeiro lugar, diversas citocinas como a IL-1 β , IL-2, e TNF α , podem ser transportadas do sangue para o SNC por mecanismos de transporte ativo, como mostrado em estudos *in vitro*. Em segundo lugar, as células da glia secretam citocinas após a ativação de um desafio antigênico (VILCEK; LEE, 1991; PLATA-SALAMAN; TURRIN, 1999; KRONFOL; REMICK, 2000). (GUTIERREZ et al., 1993)

Finalmente, foi relatado que a secreção de citocinas no SNC pode ser estimulada por neurotransmissores. Noradrenalina estimula a liberação de IL-6 de astrócitos *in vitro* de uma maneira dose-dependente, um efeito que pode ser antagonizado por bloqueadores dos receptores adrenérgicos. A IL-6 está intimamente ligada à função de outras citocinas (ex, IL-1, IL-2 e TNF α), este resultado indica que neurotransmissores podem ativar a cascata de citocinas (BENVENISTE, 1992; MERRILL; BENVENISTE, 1996) Isto representa possivelmente um mecanismo regulador que influi de maneira relevante na ativação

(auto-) imune ligada a distúrbios psiconeuroimunológicos, sugerindo que processos infecciosos estão relacionados com a etiologia dos distúrbios psiquiátricos (DUNN et al., 2005; MARQUES et al., 2007) .

Já se demonstrou também que citocinas como a IL-1 β podem ser sintetizadas dentro do SNC, tendo ali importante papel em funções anteriormente descritas como exclusivas do sistema nervoso, como as modulações de emoções, de comportamentos e da memória. Estes mediadores agem no cérebro por diferentes vias. A primeira seria pela ativação de neurônios aferentes primários onde as reações inflamatórias ocorrem. A segunda via envolveria a difusão lenta de citocinas dos órgãos circunventriculares e plexo coróide para áreas críticas do cérebro como, por exemplo, o complexo amigdalóide (DANTZER, 2001a; b; ALLAN et al., 2005).

A figura 2 ilustra o papel das citocinas no SNC e suas estruturas. Nota-se então que estas podem ser expressas por vários tipos de células logo após injúrias cerebrais, ou seja, células da glia, vasculares, neuronais e do SI. Elas podem então ter ações em muitos aspectos da função do SNC, o que poderá contribuir para limitar ou expandir lesões neuronais subsequentes e determinar a sobrevivência ou não das mesmas (ALLAN; ROTHWELL, 2001).

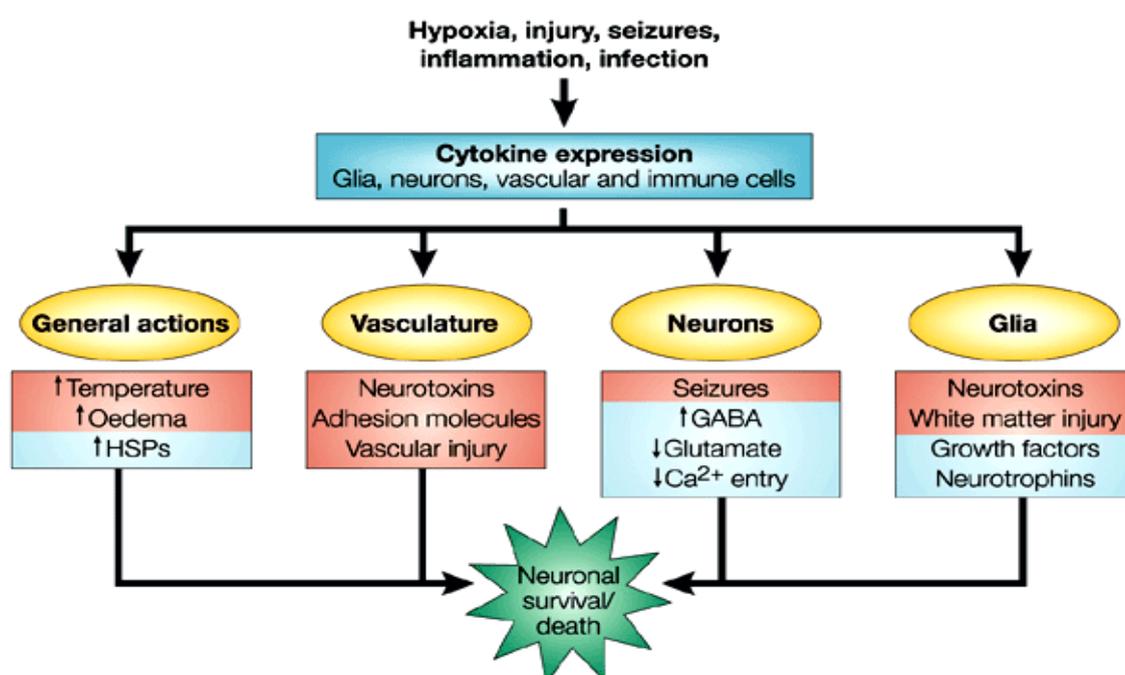


Figura 2– Efeitos gerais, vasculares, neuronais e na glia das citocinas. Caixas vermelhas = fatores que promovem a morte celular; Caixas Azuis = os fatores que promovem a sobrevivência da célula. Retirado de Allan e Rothwell (ALLAN; ROTHWELL, 2001)

Basso et al. (BASSO et al., 2003) mostraram aumento de marcação fos em áreas do SNC diretamente relacionadas com o comportamento ansioso e com a emoção (como o núcleo paraventricular do hipotálamo e o núcleo central da amígdala), após um único desafio oral com ovoalbumina (OVA) em camundongos, tornando-os alérgicos ao antígeno. Idêntico fato foi observado por Costa-Pinto et al. (COSTA-PINTO et al., 2005) após o uso de um antígeno intranasal (OVA) em camundongos OVA-sensibilizados.

A ativação do sistema de resposta inflamatória envolve não só as alterações imunológicas e metabólicas, mas também alterações neuroendócrinas, tal como a hiperatividade periférica e central do eixo HPA (HANSEL et al., 2009). Os efeitos das citocinas sobre o sistema nervoso e o sistema endócrino fecham o ciclo entre o cérebro e o SI, o que indica que as interações neuroimunes são bidirecionais. As IL-1 e IL-6 exercem potentes efeitos de aumento no eixo HPA (TURNBULL et al., 1998). O controle central da secreção de glicocorticóides é regulado pelo núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) que, sob condições de estresse, secreta CRH que, por sua vez, induz a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise, resultando no aumento da produção de corticosterona na zona fasciculada da adrenal (PIHOKER et al., 1993; PACAK et al., 1995; FUKUHARA et al., 1996; JEZOVA et al., 1999). A corticosterona tem uma importância primária nos estados de estresse, influenciando o metabolismo celular e gerando uma mobilização de substratos energéticos necessários para a produção de respostas fisiológicas adaptativas à presença dos agentes estressores (PACAK; PALKOVITS, 2001; CHARMANDARI et al., 2005). A magnitude da resposta do eixo HPA ao estresse induzida pelo PVN, via liberação de CRH, é limitada por mecanismos neuronais e hormonais, para manter os níveis de corticosterona dentro de limites toleráveis (HERMAN; CULLINAN, 1997).

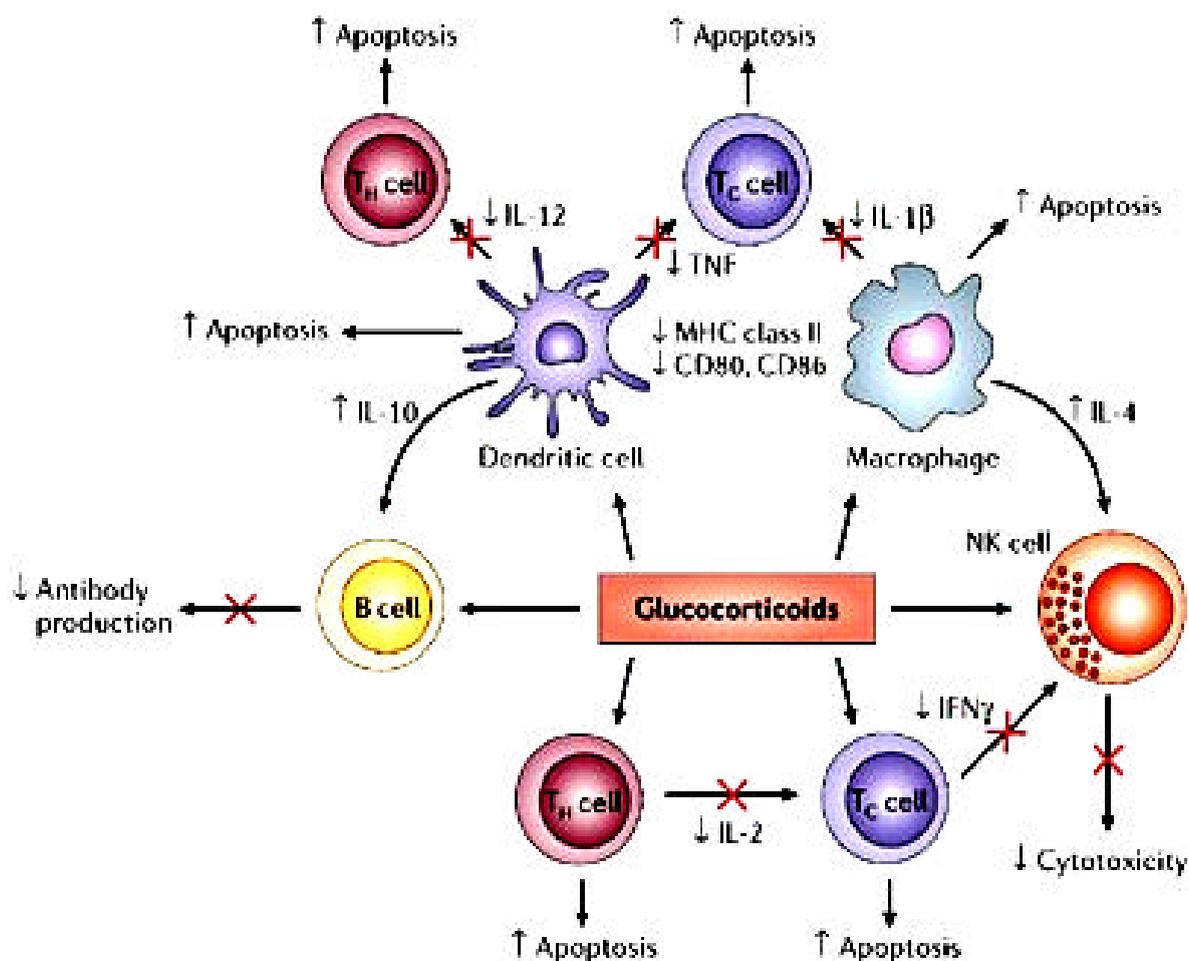
O PVN parece ser o ponto crucial na regulação do eixo HPA (HERMAN; CULLINAN, 1997). A ativação do eixo HPA é considerada um dos principais indicadores de estresse (MARTI et al., 1999) e a corticosterona é o marcador mais

utilizado para caracterizar uma situação de estresse. Assim, foi observado um aumento significativo do CRH e de corticosterona em ratos submetidos à laparotomia e craniotomia, demonstrando que o processo inflamatório pós cirúrgico ativa o eixo HPA (DEKEYSER et al., 2000). Atualmente acredita-se que o estresse, a ansiedade e a depressão são processos inter-relacionados. O estresse está implicado na etiologia tanto da ansiedade quanto da depressão ou é consequência delas (CLAES, 2009).

As reações imunes, mediadas por citocinas pró-inflamatórias são positivamente correlacionada com sintomas depressivos e com redução do *feedback* negativo do eixo HPA na depressão maior. Algumas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 podem induzir resistência aos efeitos dos hormônios glicocorticóides, influenciando a expressão do receptor de glicocorticóides (LEONARD; MYINT, 2009).

De fato, na depressão melancólica é descrito que há desregulação do retroalimentação negativa no eixo HPA levando à hipercortisolemia (GOLD et al., 1988; NEMEROFF, 1996)

A figura 3 ilustra o mecanismo de ação dos glicocorticóides em células imunes tanto de maneira direta como indireta suprimindo a indução da resposta inflamatória.. Eles inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNFa e ainda promovem a produção de citocinas anti -inflamatórias como IL-10 por macrófagos e células dendríticas. Promovem ainda a apoptose de macrófagos, células dendríticas e células T e inibem a resposta imune de interferão gama (IFN γ), células matadoras naturais (NK), células T citotóxicas (CD8) e células T auxiliares (CD4) (STERNBERG, 2006).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Figura 3 – Mecanismo de ação dos glicocorticóides em células imunes. Retirado de Sternberg (STERNBERG, 2006).

Existem evidências de que durante a depressão, a disfunção de estruturas límbicas, incluindo o hipotálamo e o hipocampo, resulta na hipersecreção de CRH e ACTH, o que, por sua vez, induz a ativação hipofisária-adrenal (HEUSER et al., 1998)

Neste sentido, compreendendo a influência de mediadores do SI sobre o SNC, induzindo à ativação do eixo HPA, a resposta por eles desencadeada passa, então, a fazer parte do repertório daquelas que são chamadas coletivamente de adaptativas ou de síndrome de adaptação geral ao estresse: essas respostas

envolviam classicamente apenas estímulos físicos ou psicológicos. Como definido por Blalock (BLALOCK, 1984), o SI funcionaria, nessa situação, como um sistema sensorial adicional, difuso, dinâmico e em constante adaptação, que capacitaria o SNC a receber e processar estímulos e mensagens que, de outro modo, não seriam percebidos pelas vias sensoriais clássicas.

A figura 4 ilustra os efeitos do estresse e a consequente estimulação do eixo HPA e eixo simpático-adrenal-medular (SAM). A produção do hormônio ACTH pela glândula hipofisária resulta na produção de hormônios glicocorticóides. O eixo SAM pode ser ativado pela estimulação da medula supra-renal para produzir as catecolaminas adrenalina e noradrenalina, assim como através da inervação simpática do sistema nervoso dos órgãos linfóides. Leucócitos possuem receptores para os hormônios do estresse que são produzidos pelas glândulas supra-renais e hipófise e podem ser moduladas pela ligação destes hormônios aos seus respectivos receptores. Além disso, a produção de noradrenalina nas terminações nervosas também pode modular a função das células imunes, ligando seu receptor na superfície das células de órgãos linfóides. Essas interações são bidirecionais e as citocinas produzidas por células do sistema imunológico podem modular a atividade do hipotálamo (GLASER; KIECOLT-GLASER, 2005).

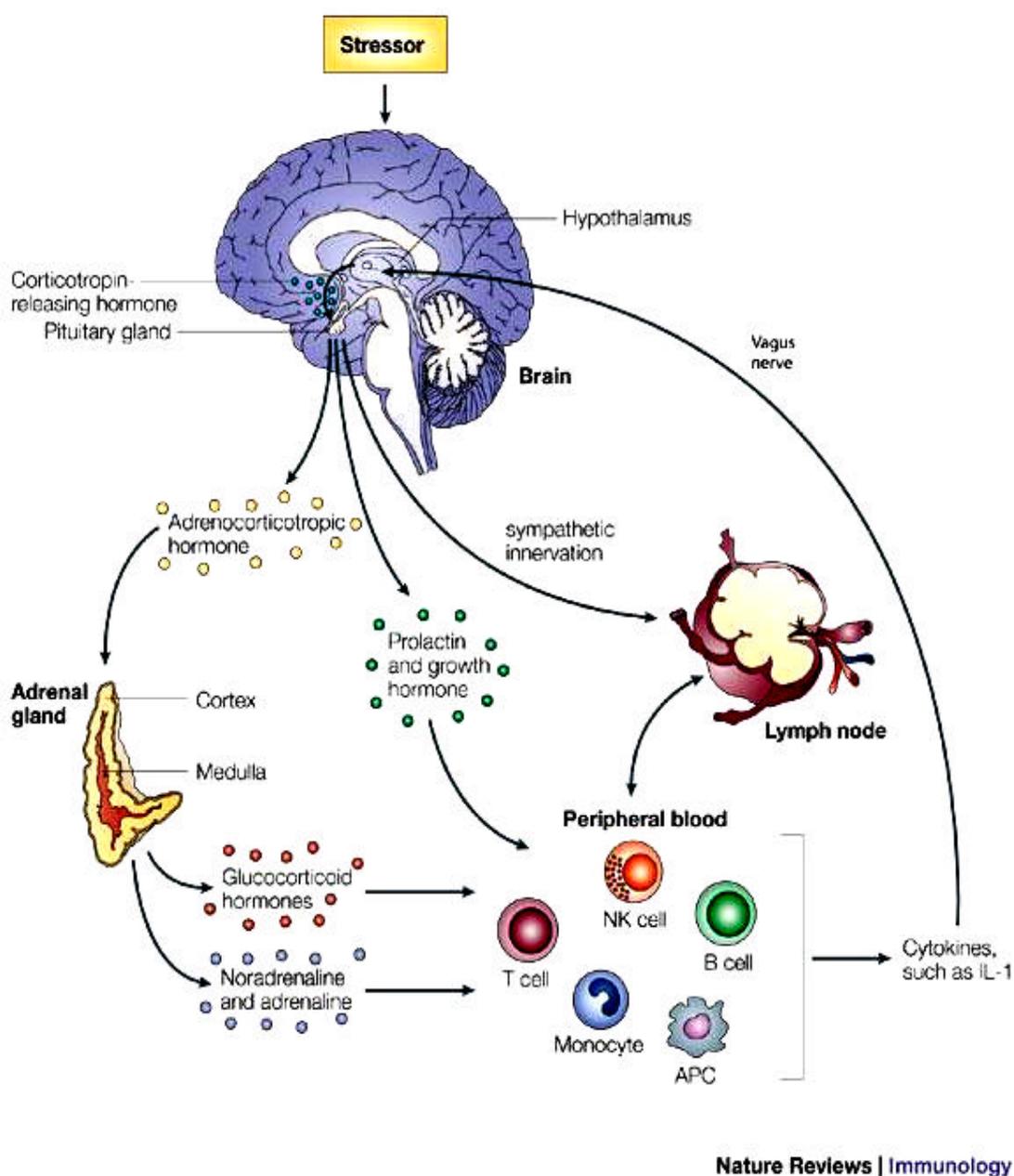


Figura 4 – Cascata de efeitos neuroendócrinos em resultado da estimulação promovida pelo estresse. APC = Células Apresentadoras de Antígenos; IL-1 = Interleucina-1; NK = Células Matadoras Naturais. Retirado de Glaser e Kiecolt (GLASER; KIECOLT-GLASER, 2005)

Os estudos sobre os efeitos de citocinas na regulação de respostas no SNC passaram, então, a compreender duas facções ou enfoques diferentes e complementares: a tentativa de isolamento de moléculas e das vias essenciais para a sinalização do SI para o SNC, e o estudo das alterações comportamentais no contexto em que se inserem, ou seja, como parte do repertório de comportamentos

expressos pelos animais. Assim, começa a ficar cada vez mais claro que as alterações de comportamento decorrentes de uma infecção não são consequências de uma depressão inespecífica do SNC, mas sim, de um conjunto de adaptações específicas e muito bem organizadas nesse sistema.

1.4. Lipopolissacarídeo - LPS

O lipopolissacarídeo (LPS) é um constituinte que pertence às paredes celulares de bactérias gram-negativas. É uma toxina termo-estável, composta por três subunidades: uma cadeia polissacarídica superficial, dita antígeno "O", responsável pela variabilidade antigênica das bactérias Gram-negativas, uma ponte também polissacarídica de localização intermediária e o fosfolípídeo A, inserido na membrana externa e responsável pela sensibilização do hospedeiro (RAETZ; WHITFIELD, 2002) como demonstrado nas figuras 5 e 6.

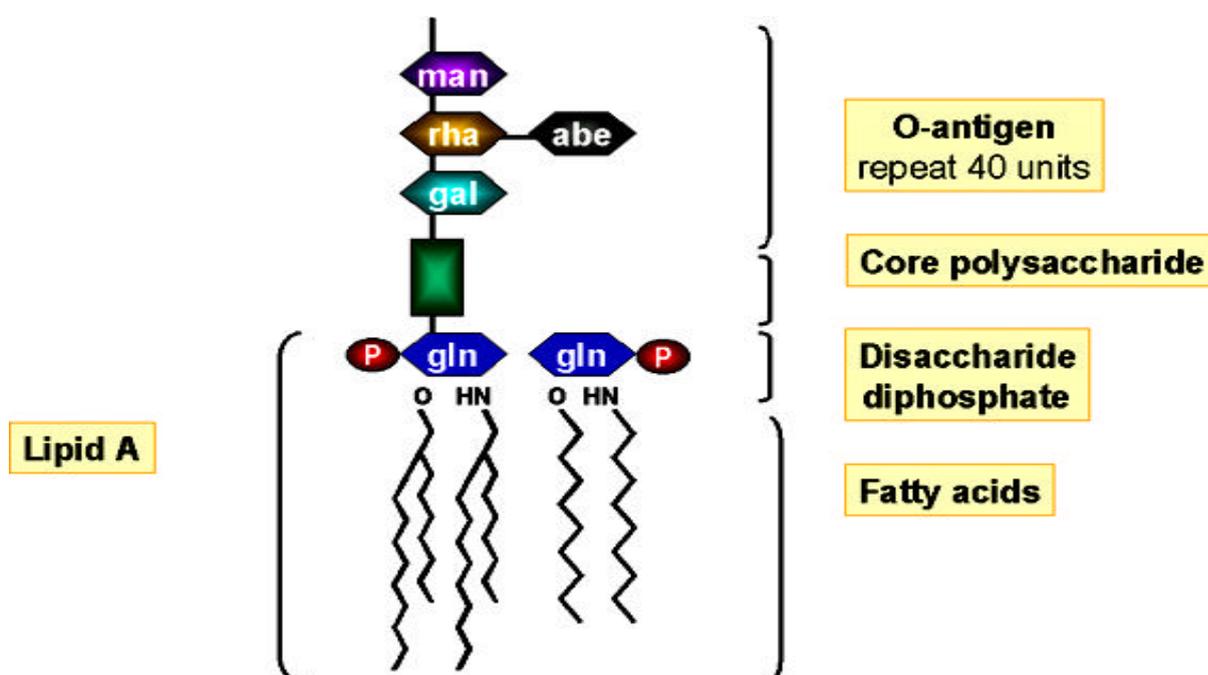


Figura 5 – Estrutura do LPS. Retirado de Brooks; Butel; Morse (BROOKS et al., 2000)

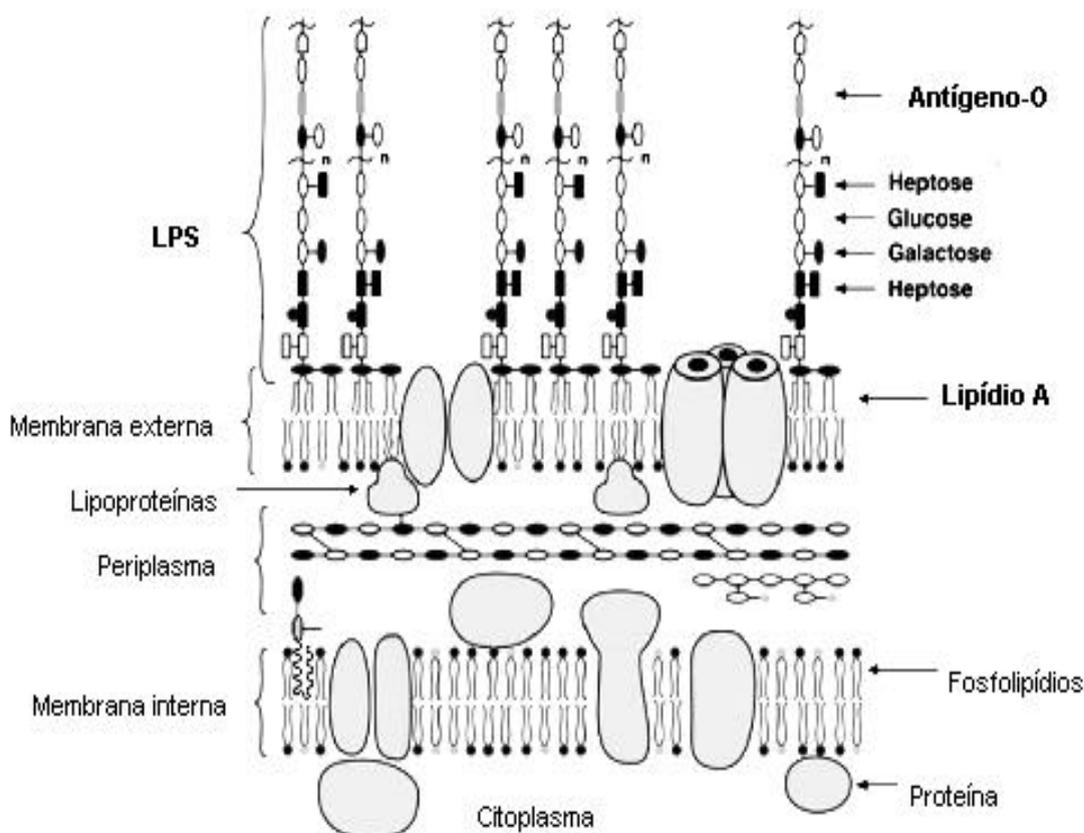


Figura 6 - Modelo estrutural da parede celular da *Escherichia coli*, destacando o lipopolissacarídeo conforme proposição de Raetz & Whitfield (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

O lipídio A é a porção com menor variação estrutural, responsável por todos efeitos descritos até hoje. Constituído principalmente de glucosamina e fosfato, associado a um ácido graxo que contém 14 átomos de carbono. A liberação do lipídio A, separando-se da parede bacteriana, é necessária para que a molécula se torne ativa, fenômeno que ocorre somente quando as bactérias morrem ou se multiplicam.

Uma vez que o LPS entra em contato com o organismo, seja a partir de uma bactéria Gram-negativa como a *Escherichia coli*, ou pela administração direta do LPS, inicia-se uma série de respostas no organismo infectado, atuando em células como os monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas e células endoteliais, mas os macrófagos são as principais estruturas onde o mecanismo de ação do LPS é deflagrado (TRENT et al., 2006). O LPS ligado aos receptores de membranas dos macrófagos induz a produção e secreção das citocinas. O TNF α é a primeira citocina

a ser produzida durante o processo inflamatório e sua liberação irá induzir a síntese de diversas outras citocinas. A liberação de IL-1 também é precoce e, em conjunto com o TNF α , estimula a síntese e modula a expressão de outras citocinas. As citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α , IL-1, IL-6 e a IL-8, interagem de forma a constituir um ciclo vicioso no seu próprio processo de produção e liberação. Dentre os múltiplos efeitos biológicos da IL-1 destacam-se a febre (ação no hipotálamo), neutrofilia, proliferação de colágeno, liberação de aminoácidos de músculos, produção de IL-2 (ação nas células T), e a produção de anticorpos (ação nas células B) (AIURA et al., 1997).

O LPS interage com vários sistemas celulares e humorais. Após penetrar na circulação, liga-se a lipoproteínas plasmáticas, resultando em redução de sua atividade biológica. Mesmo assim ativam o complemento, induzem a coagulação, afetam a função hepática e o sistema neuroendócrino. Esta diversidade de respostas fisiológicas é direcionada à eliminação de endotoxinas (ADEREM; ULEVITCH, 2000; MILLER, S. I. et al., 2005).

Para Aderem et al. (ADEREM; ULEVITCH, 2000) Miyake (MIYAKE, 2003) e Fenton et al. (FENTON; GOLENBOCK, 1998) e como demonstrado na figura 7 o mecanismo de ação se inicia com o LPS ligando-se a proteínas ligantes do hospedeiro, as LBPs (ou *lipopolisacharyde binding protein*), produzidas no fígado do animal. A partir deste passo, é formado um complexo chamado de LPS-LBP. O complexo entra em contato com o receptor CD14 dos macrófagos, iniciando a ativação celular. Neste momento, passam a atuar os receptores TLR4 (ou receptores *toll-like 4*), Uma vez ativado o complexo TLR-4, ocorre o recrutamento de uma proteína adaptativa denominada MyD88, a qual se associa à IRAK (serina-treonina-proteína-quinase do receptor de IL-1), que é fosforilada e se liga à uma proteína adaptativa denominada TRAF6 (fator de necrose tumoral associado ao fator 6). Esta associação leva à ativação de MAPquinasas, onde direta ou indiretamente irão ativar IKK1 e IKK2 (I kappa β Kinase 1 e 2), levando à ativação de NF κ B (fator nuclear kappa beta) e da proteína citoplasmática ligada a um inibidor (I κ B). A ligação do LPS ao complexo TLR4 induz também sinais transmembrana, incluindo a mobilização de cálcio, ativação da proteína tirosina quinase (PTK) e de MAPquinasas e posterior ativação do fator NF κ B (MUROI et al., 2002; ROUSSEAU et al., 2002; LIANG et al.,

2005). A ativação da via das proteínas quinases C (PKC) leva à fosforilação do inibidor ($I\beta$) e à dissociação do complexo, permitindo que o $NF\beta$ migre para o núcleo e realize sua função (BEUTLER, 2002; BEUTLER; RIETSCHER, 2003). O $NF\beta$ regula a expressão de genes envolvidos nas respostas inflamatória e imunológica, aumentando a taxa de transcrição destes genes com consequente síntese de ácido ribonucléico (RNA) mensageiro e proteínas, e tem papel importante na síntese dos mediadores pró-inflamatórios, além de regular a síntese de proteína C reativa (PCR) e iniciar a transcrição de citocinas com $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-2$ e $IL-6$ (GHOSH; BALTIMORE, 1990; HAVA et al., 2006b).

Recentemente, foi proposto que as células podem também ser capazes de responder ao LPS através de receptores intracelulares chamadas proteínas NOD (por domínio de oligomerização ligada a nucleotídeos). O mecanismo pelo qual NOD1 e NOD2 podem reconhecer o LPS no citosol é desconhecida (COHEN, 2002).

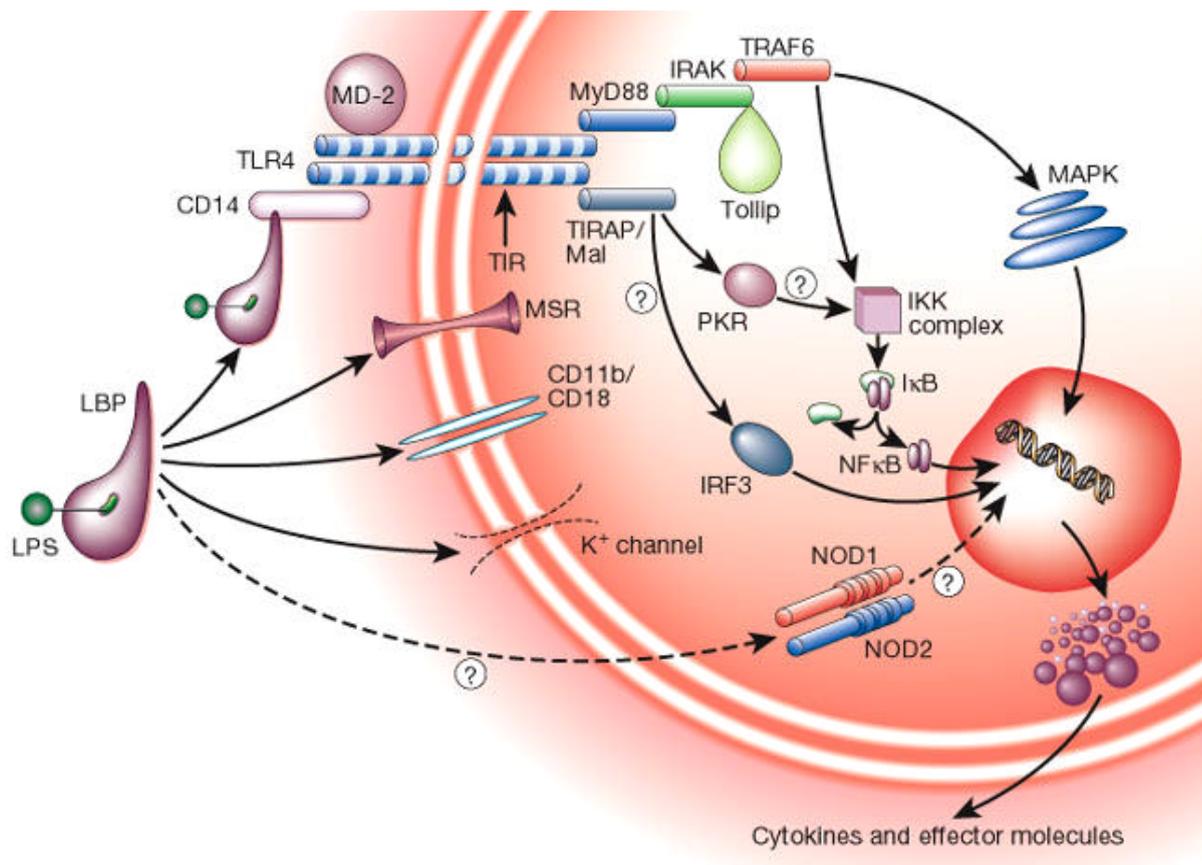


Figura 7 – Ativação celular por LPS. Retirado de Cohen (COHEN, 2002).

Devido à liberação de citocinas, o LPS é usado já há muitos anos como ativador de resposta imune, principalmente na resposta imune inata (inespecífica)

com os macrófagos. Mas em longo prazo atuam também na resposta imune adquirida (ou adaptativa), referente a respostas de linfócitos que reconhecem antígenos microbianos específicos (ADEREM; ULEVITCH, 2000; LEVITON et al., 2005).

1.5. Dimorfismo Sexual

A investigação sobre dimorfismo sexual progrediu gradualmente a partir de descrições qualitativas de traços anatômicos e comportamentais em animais (OBER et al., 2008) para os elegantes experimentos sobre circuitos neurais sexo-específicos do comportamento reprodutivo em drosófilas (KIMURA et al., 2005; STOCKINGER et al., 2005) e camundongos (KIMCHI et al., 2007). Na atualidade é evidente que o dimorfismo sexual ocorre não só nas características morfológicas, como tamanho, forma e coloração, mas também em níveis comportamentais (KIMURA et al., 2005; STOCKINGER et al., 2005; KIMCHI et al., 2007), psicológicos (PITYCHOUTIS et al., 2009b), bioquímicos (MCGRATH; PUZAN, 2004), na expressão gênica e de fenótipos (RINN; SNYDER, 2005; ELLEGREN; PARSCH, 2007; REINIUS et al., 2008).

Muitas evidências sugerem a existência de doenças sexo-específicas na prevalência, idade de início e/ou gravidade. Exemplos clássicos incluem: 1) doença cardiovascular, que é predominante no sexo masculino durante toda a vida adulta, mas, em mulheres, tem maior taxa de ocorrência na pós-menopausa (CHOI; MCLAUGHLIN, 2007); 2) a asma, o que é mais frequente entre meninos na infância (CHOI; MCLAUGHLIN, 2007); e 3) doenças auto-imunes, que são mais frequentes nas mulheres ao longo da vida, em especial doenças que começam durante ou imediatamente após a fase reprodutiva (LOCKSHIN, 2006; MCCOMBE et al., 2009). Meninas apresentam maior incidência de defeitos no tubo neural, luxação congênita do quadril e escoliose, enquanto autismo, gagueira e estenose pilórica são mais comuns entre meninos (HARPER et al., 1998). Na idade adulta, a depressão maior e a doença de Alzheimer incidem mais em mulheres (ANDERSEN, 1997; GATER et al., 1998), enquanto que esquizofrenia, doença de Parkinson e câncer colorretal são

mais frequentes em homens (ALEMAN et al., 2003; MCDAVID et al., 2004; WOOTEN et al., 2004)

Diferenças biológicas, especialmente as de caráter endócrino, são sugestivas não só da autenticidade da distinção entre depressões de homens e de mulheres, mas também levam a pensar que parte da diferença seja devida a hormônios sexuais (PITYCHOUTIS et al., 2009a; WU et al., 2009).

Dados experimentais com animais confirmam estas observações. Neste sentido, já foram relatadas diferenças sexualmente dimórficas tanto na resposta imune humoral como celular, as quais são mais ativas em fêmeas que em machos. Os hormônios esteróides gonadais desempenhariam papel importante na regulação destas respostas.

O estrógeno e suas múltiplas ações no SNC relacionam-se com crescimento e diferenciação de dendritos e axônios no cérebro em desenvolvimento, com arborização dendrítica e sinaptogênese no cérebro maduro, com a modulação da produção e liberação de neurotransmissores e como protetor contra citotoxicidade glutamatérgica (LI; SHEN, 2005). A progesterona parece interferir de modo aproximadamente oposto ao estrogênio, aumentando a atividade da monoaminoxidase (PARKER; BROTHIE, 2004).

Assim, os hormônios gonadais circulantes modulam os fenômenos de neurotransmissão cerebral e participam da regulação dos estados de humor em diferentes situações que envolvem sintomas depressivos.

Spitzer (SPITZER, 1999) documentou estas diferenças em diversos aspectos das funções de neutrófilos e macrófagos estimulados pelo LPS e / ou pela intoxicação aguda com etanol. Spinedi et al. (SPINEDI et al., 1992) também verificaram que os hormônios sexuais endógenos modulam a ativação produzida pelo LPS na adrenal e respostas imunes em camundongos Balb/C. Nolan e O'Connell (NOLAN; O'CONNELL, 1965) descreveram experimentos nos quais o sangue feminino normal alterou respostas vasoconstritoras à endotoxina em fígados isolados de ratos expostos ao LPS bacteriano. NOLAN então em 1967 (NOLAN, 1967) demonstrou que o pré-tratamento com doses farmacológicas de estrógenos

conjugados até 1 hora antes da exposição ao LPS tornava ratos castrados protegidos contra os efeitos letais da endotoxina. Um estudo mais recente mostrou que estradiol exógeno, diminui a percentagem de mortes provocadas pela endotoxina em ratos machos em uma maneira dose-dependente (CHRISTEFF et al., 1994). Outro estudo demonstrou que o estradiol exógeno dado 1 hora após LPS restaurou o débito cardíaco em ratos do sexo masculino (PALACIOS; PANG, 1998). Assim, o estrógeno parece ser protetor quando administrado antes ou imediatamente após a exposição à endotoxina.

Estudos comportamentais sobre a susceptibilidade de ratos machos e fêmeas em modelos de depressão e na neuroquímica cerebral de regiões envolvidas com a fisiopatologia de transtornos afetivos dos mesmos após desafio com LPS mostraram maior susceptibilidade em fêmeas (PITYCHOUTIS et al, 2009).

As características eletroencefalográficas, denotando alterações de funcionamento em certas áreas cerebrais, nos transtornos de humor como a ansiedade e depressão, também são apontadas como possíveis indicadores das diferenças destes transtornos entre homens e mulheres (HELLER, 1993).

Lacerda et al (LACERDA et al., 2004) examinou o córtex orbitofrontal em 31 pacientes com depressão maior, não medicados, e comparou com o daqueles de 34 pacientes saudáveis por ressonância magnética. Verificou-se que os pacientes com depressão maior apresentaram volume reduzido de substância cinzenta no córtex orbitofrontal, sendo que apenas os pacientes do sexo masculino exibiram volumes do córtex orbitofrontal medial direito e esquerdo menores que os do grupo controle do mesmo sexo.

Hastings et al. (HASTINGS et al., 2004) observaram que mulheres deprimidas apresentavam um volume menor da amígdala quando comparadas com seus controles sendo que tal alteração não foi constatada em homens deprimidos. Estes estudos sugerem diferenças sexualmente dimórficas na biologia dos transtornos de humor.

1.6. Sistema Imune e Período Neonatal

Devido ao aumento no número de nascimentos bem como da sobrevivência de crianças nascidas pré-termo com baixo peso extremo torna-se de extrema importância avaliar e melhorar os resultados em longo prazo associados com a prematuridade (REEDY, 2007).

Atualmente, sabe-se que a ativação do SI em períodos precoces da vida leva a alterações comportamentais e na susceptibilidade da prole a doenças em períodos mais tardios da vida. Em estudo realizado por Stoll et al. (STOLL et al., 2002b) com 5447 prematuros nascidos nos centros da rede de pesquisa neonatal do *Instituto Nacional de Saúde da Criança e Desenvolvimento Humano dos Estados Unidos* entre os anos de 1998 e 2000 que apresentaram pelo menos uma cultura positiva para bactérias nos primeiros três dias de vida mostraram que 60,7% das infecções eram causadas por bactérias Gram negativas as quais 44% representadas por *Escherichia coli*. Em países em desenvolvimento bactérias Gram negativas são as mais frequentes causas de sepse em neonatos (STOLL et al., 2002a).

A ativação neonatal do SI por *Escherichia coli*, IL-1 β ou mesmo pelo LPS levam a maior reatividade ao estresse, alterações no SI, além de alterações comportamentais na idade adulta (SHANKS et al., 2000; BOISSE et al., 2004; BILBO et al., 2006; SPENCER et al., 2006a; SPENCER et al., 2006b; SPENCER et al., 2006c; SPENCER et al., 2007).

Leonard e Myint (LEONARD; MYINT, 2009) sugeriram que as citocinas liberadas pela resposta inflamatória ao LPS seriam responsáveis pela ativação do eixo HPA, estando, pelo menos parcialmente envolvidas nas lesões promovidas pela inflamação no cérebro de ratos.

Além disto, a ativação do SI no período perinatal influencia as respostas endócrinas na idade adulta. Algumas evidências mostram que esta ativação produz em ratos aumento nos níveis de corticosterona, bem como naqueles pós-estresse avaliados na idade adulta (SHANKS et al., 1995; SHANKS et al., 2000; NILSSON et al., 2002). No entanto, outros trabalhos não observaram aumento neste hormônio (BILBO et al., 2006; WALKER et al., 2006) ou apenas aumento pouco significativo (ELLIS et al., 2005). Diversas evidências mostram que a infecção perinatal pode favorecer o desenvolvimento de esquizofrenia (BROWN et al., 2004a; BROWN et al., 2004b; FATEMI et al., 2005), autismo (HORNIG; LIPKIN, 2001) e outras doenças

neuroológicas (YOLKEN, 2004). Já está também bastante estabelecido que processos inflamatórios e infecções bacterianas ou virais em gestantes levam a interferência no ambiente fetal, podendo resultar em diversos danos a prole.

É fato conhecido que bebês muito prematuros apresentam maiores riscos de apresentarem deficiências físicas, sensoriais e de aprendizagem (JOHNSON et al., 2009a; JOHNSON et al., 2009b) .

Stoll et al. (STOLL et al., 2004) mostraram que recém-nascidos de baixo peso com episódios de infecção e cultura positivas tiveram as taxas de crescimento prejudicadas bem como maiores taxas de efeitos adversos no neurodesenvolvimento tais como paralisia cerebral e pontuações menores nas Escalas Bayley de Desenvolvimento Infantil II e Tabela de Desenvolvimento Psicomotor e Mental assim como deficiência visual e auditiva.

Wood et al. (WOOD et al., 2000) concluiu baseado em seus estudos com 283 crianças nascidas prematuras (entre 20 e 25 semanas de gravidez) e avaliadas aos 10 meses de idade que deficiências no domínio do desenvolvimento mental, psicomotor, função neuromotora e sensorial e a comunicação estavam presentes na metade dos indivíduos sendo um quarto destas deficiências consideradas por critérios pré-estabelecidos como incapacidades graves. Não houve relação entre o padrão de morbidade e de qualquer idade gestacional ou a presença de nascimentos múltiplos, mas os meninos eram mais propensos a deficiências que meninas ($P= 0.009$ para paralisia cerebral).

Diversos distúrbios neuroanatômicos foram encontrados em várias populações de indivíduos que sofrem de diferentes transtornos psiquiátricos (BRAAK; DEL TREDICI, 2009; DAMSA et al., 2009; KOENIGS; GRAFMAN, 2009; SMITH, G. S. et al., 2009). Estudos de neuroimagem detectaram mudanças volumétricas de estruturas específicas do cérebro, alterações vasculares dentro da substância branca e cinzenta e também mudanças volumétricas da substância branca e cinzenta (ABE et al.).

Ao coordenar as diferentes informações sensitivas e sensoriais projetadas pelos tálamos sobre diferentes áreas neocorticais, o córtex pré frontal constitui o

principal centro de organização e planejamento de ações e emoções, possui extensa conexão com os circuitos corticais e subcorticais, que podem reforçar sua importância nas funções cognitivas e na modulação da atividade límbica. As principais estruturas subcorticais participantes desse circuito são os núcleos da base, o tálamo, o hipotálamo, o tronco cerebral e os tratos da substância branca que conectam essas estruturas, entre elas e o córtex cerebral. Um circuito límbico-tálamo-cortical que consiste da amígdala, núcleo mediodorsal do tálamo e o córtex pré-frontal ventrolateral e medial e um circuito límbico-estriatal-palidaltalâmico compreendendo o estriado, o pálido ventral e os componentes do outro circuito são os principais circuitos neuroanatômicos que têm sido propostos na fisiopatologia dos transtornos de humor (BRODY et al., 2001; FAW, 2003; HEIMER; VAN HOESEN, 2006; SOTRES-BAYON et al., 2009).

Além disso, o cerebelo, por meio de conexões com o tronco e estruturas límbicas, pode também estar envolvido na regulação do humor (SOARES; MANN, 1997; DREVETS et al., 2008).

Portanto, é possível afirmar que anormalidades nessas regiões do cérebro, ou em áreas contíguas que afetem a conexão entre essas regiões, refletem mal funcionamento desses circuitos, associado com o desenvolvimento de transtornos de humor.

Nosarti et al. (NOSARTI et al., 2007) em estudo realizado com dois grupos de jovens que haviam nascidos prematuramente (entre 28 e 33 semanas de gravidez), sendo o primeiro formado por 221 indivíduos nascidos entre os anos de 1979 e 1982 e na faixa etária dos 14 a 15 anos e o segundo por 147 indivíduos nascidos entre 1983 e 1984 e com a mesma faixa etária e comparados com o grupo controle composto por 128 indivíduos nascidos a termo entre os anos de 1979 e 1983, concluiu que os prematuros comparados aos controles mostraram redução da substância cinzenta nos lobos temporal, frontal, córtex occipital e cerebelo, incluindo o putamen, ínsula, cuneus, giro fusiforme, tálamo e núcleo caudado, e aumento da substância cinzenta predominantemente nos lobos temporais e frontal, incluindo cíngulo e giros fusiforme e cerebelo. Regiões com perda de substância branca estavam concentradas no tronco cerebral, cápsula interna, temporal e frontal, e os

fascículos principais. Foram observados maiores volumes de substância branca nas regiões temporal, parietal e frontal. Os adolescentes que nasceram prematuros obtiveram escores mais baixos do que os controles na avaliação de linguagem e função executiva e tiveram mais chances de mostrar comprometimento cognitivo em comparação aos controles (27% versus 14%, respectivamente).

Soares et al. (SOARES; MANN, 1997) concluíram que as influências genética, ambiental e de fatores degenerativos durante o desenvolvimento dessas estruturas cerebrais, podem determinar o início dos transtornos de humor.

O rato, diferentemente do ser humano, nasce imaturo, sendo que sua primeira semana de vida representa os últimos estágios da vida de um bebê humano (BERNARDI, 2006). Assim a figura 8, retirada de Morgane et al. (MORGANE et al., 2002) ilustra os índices relativos, a duração e a sequência temporal dos processos específicos de desenvolvimento dos cérebros de ratos e humanos. O surto de crescimento do cérebro (curvas de taxas de variação de peso do cérebro) é sobreposto (curva em negrito) em relação aos eventos de desenvolvimento subjacente no cérebro. Observa-se a gênese precoce da astrogliia e células piramidais no ser humano, resultando na aquisição de aproximadamente 27% do peso do cérebro adulto no momento do nascimento, em comparação com os 12% do peso do cérebro adulto em ratos no nascimento. A chamada curva de surto de crescimento do cérebro do rato é deslocada para a direita, em comparação com a de humanos.

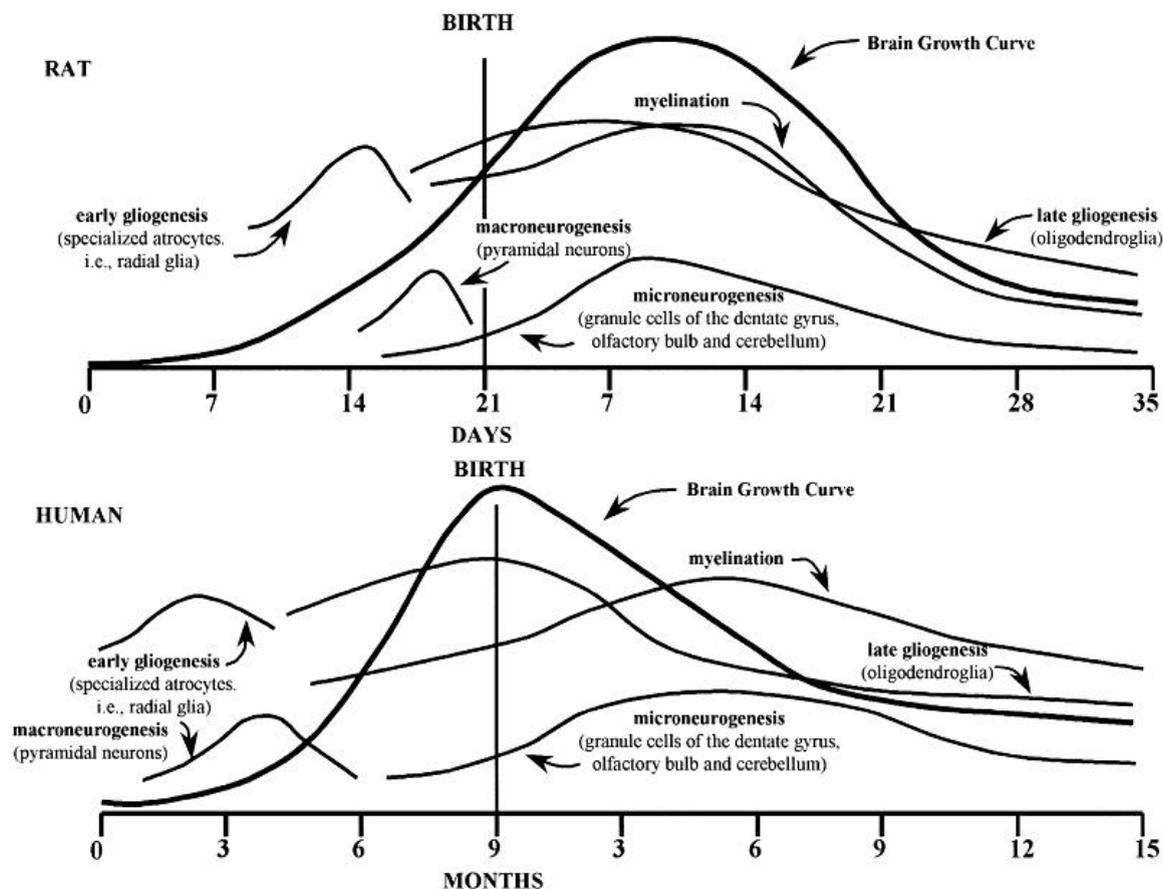


Figura 8 – Comparação do desenvolvimento pré e pós-natal do cérebro de ratos e humanos. Retirado de Morgane (MORGANE et al., 2002).

Neurônios da placa de conexão são cruciais para o desenvolvimento do córtex e tálamo, lesões podem levar a anormalidades neuronais, eles atingem seu pico de abundância em bebês humanos durante o período gestacional da prematuridade humana, particularmente no período de vulnerabilidade ou seja, entre a 22^o e 34^o semanas de vida (KOSTOVIC et al., 1991; KOSTOVIC; JUDAS, 1998; 2002; 2006). Essas células servem como ligações transitórias locais podendo orientar os axônios a atingirem alvos corticais e subcorticais e estão envolvidos na maturação estrutural e funcional do córtex cerebral e do tálamo (VOLPE, 1996; HAYNES et al., 2005; VOLPE, 2009).

Embora os axônios sejam claramente detectáveis a partir de 23^o semana de vida, marcadores específicos indicaram que estes axônios são claramente imaturos. Dados parecem definir o período prematuro humano como um período crítico no

desenvolvimento axonal. É provável que estes axônios imaturos sejam altamente vulneráveis a insultos como os causados por isquemia e inflamação (TEKKOK; RANSOM, 2004) . No mais, interações axônio-oligodendrogliais são críticas para a sobrevivência, maturação e função dos axônios (BJARTMAR et al., 1994; BJARTMAR, 1996; BJARTMAR; TRAPP, 2003). Anormalidades na substância branca são compatíveis (embora não especificamente) com prejuízos no desenvolvimento axonal (DYET et al., 2006; KRISHNAN et al., 2007; COUNSELL et al., 2008).

A tabela 1 mostra os efeitos de citocinas inflamatórias na função neural os quais podem estar envolvidos com os prejuízos decorrentes do processo inflamatório no período neonatal.

Efeito	Citocina	Referência
Citotóxico para oligodendrócitos e induz a desmielinização	TNF α	(SELMAJ, K. et al., 1991a)
Aumento da Neurite e diminuição da sobrevivência neuronal	IL6	(RHODES et al., 2002)
Proliferação Astrocitária	TNF α IL6	(BARNA et al., 1990) (SELMAJ, K. et al., 1991b)
Redução da acetilcolina extracelular no hipocampo	IL-1 β	(BARNA et al., 1990)
Aumentam a secreção de glicocorticóides via eixo HPA	IL-1, IL2, IL6 e TNF α	(HERMUS; SWEEP, 1990)

Tabela 1 – Efeitos de Citocinas Inflamatórias na Função Neural.

Neste sentido, poucos trabalhos se preocuparam em examinar os efeitos sexualmente dimórficos da ativação do sistema imune em períodos precoces da vida de ratos e suas consequências no comportamento e nas respostas imunes destes animais na idade adulta. Somente Tenk et al (TENK et al., 2008) estudaram os efeitos da administração pós-natal de LPS no comportamento exploratório de ratos machos e fêmeas quando desafiados pela mesma endotoxina na idade adulta. Neste caso, os autores relataram maior susceptibilidade da prole masculina.

Estudos sobre a fisiopatologia das desordens de humor envolvem a genética, os sistemas neurotransmissores, transdução de sinal intracelular, fatores neurotróficos, neuroimagem, anormalidades endócrinas, neurodegeneração, como também estudos comportamentais e da função imunológica que são o foco do presente trabalho e como diversos estudos já comprovaram exercem influência direta sobre os fatores acima citados.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Pretendeu-se investigar os efeitos da ativação do sistema imune pelo LPS em período precoce da vida da prole feminina e masculina de ratas em modelos comportamentais ligados à ansiedade e depressão e avaliar os parâmetros do sistema imune nas proles na idade adulta frente a um desafio imune com a mesma endotoxina

2.2 Objetivos Específicos

Estudar os efeitos da exposição neonatal no 2º dia de vida da prole feminina e masculina de ratas à endotoxina LPS frente a um desafio com a mesma endotoxina na idade adulta em:

a) Parâmetros Comportamentais

- Atividade geral observada no teste de Campo Aberto;
- Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado;
- Comportamento no teste de Natação Forçada.

b) Parâmetros Imunes

- Determinação do número total de leucócitos circulantes no sangue;
- Determinação do número total de células na medula óssea;
- Quantificação de mediadores inflamatórios IL-1 β e TNF α ;
- Avaliação dos níveis séricos de corticosterona.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos e ratas Wistar adultos, pesando, em média, 250 e 200 gramas, respectivamente, obtidos de cruzamentos sucessivos no biotério da disciplina Farmacologia Aplicada a Toxicologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, medindo 32X38X16cm, com tampas gradeadas de alumínio, acondicionadas em sala apropriada, com temperatura ambiente ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) controlada por meio de aparelho de ar condicionado e com ciclo de 12 horas de claro e escuro, sendo a luz acesa às 6 horas. Água e comida foram fornecidas *ad libitum* aos animais durante todo o procedimento experimental.

Duas ratas e um rato foram alojados por gaiola, para permitir o acasalamento. Considerou-se a presença de espermatozóides no lavado vaginal indicativo de prenhes, registrando-se como primeiro dia de gestação. Ao nascimento, os filhotes foram examinados macroscopicamente e realizaram-se a sexagem e a padronização das ninhadas em 8 filhotes por rata (sendo quatro machos e quatro fêmeas).

O período de amamentação foi de 21 dias, sendo, posteriormente, os filhotes separados por sexo e tratamento e alojados nas mesmas condições laboratoriais de seus pais, em número de 4 animais/gaiola.



Figura 9 - Rato Wistar e Gaiola de Polipropileno. Retirado de <http://www.criver.com/enUS/ProdServ/ByType/ResModOver/ResMod/Pages/WistarFurth.aspx> e <http://insightltda.com.br/insight-equipamento-cientifico-133>
Caixa%20de%20Polipropileno%20Completa%2030%20x%2019%20x%2013%20cm.



Figura 10 - Padronização das Ninhadas em 4 machos e 4 fêmeas. Retirado de <http://www.folkcatart.com/blogs/jen/?cat=63>.



Figura 11 - Rata Wistar com filhotes. Cedido gentilmente por BERNARDI M.M.

3.2 Drogas e Soluções

- a) LPS (SIGMA)
- b) Solução Salina
- c) Ketamina® (AGENER)
- d) Rompum® (BAYER)

LPS: lipopolissacarídeo obtido por extração fenólica a partir da *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8. Solução Salina: solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%. Uma solução anestésica, constituída de Rompum® + Ketamina® (1:1), foi utilizada em todos os procedimentos cirúrgicos, em volume de 1,0ml/300g de peso corpóreo de animal, por via intra peritoneal (i.p.).



Figura 12 - Solução Salina à 0,9%. Arquivo pessoal.



Figura 13 - Eppendorfs com LPS. Arquivo pessoal.



Figura 14 - Ketamina® (AGENER) e Rompum® (BAYER) Retirado de <http://mercado.ruralcentro.com.br/categoria/790/produtosveterinarios/anestestico-e-sedativo/anestestico-e-sedativo-injetavel>.

3.3 Tratamento e Procedimentos Neonatais

No segundo dia pós natal (DPN) as proles feminina e masculina das ratas receberam solução salina ou 50 µg/kg de LPS, por via (i.p.) O DPN2 foi escolhido baseado em literatura anterior em que um modelo semelhante de infecção neonatal foi utilizada (TENK et al., 2008), e representa o período relativamente comparável ao do terceiro trimestre da gestação nos seres humanos, quando ocorre o crescimento significativo do cérebro (SANDS et al., 1979; RODIER, 1980). Durante esse período, os ratos recém-nascidos exibem uma resposta ligada à corticosterona endotoxina LPS específica, em contraste a outros efeitos estressores (SCHAPIRO et al., 1962b; a), proporcionando um modelo ideal para investigar o impacto potencial da exposição à endotoxina no desenvolvimento do cérebro de ratos.



Figura 15 – Rato Wistar DPN2. Arquivo pessoal.

3.4 Tratamento e Procedimentos na Idade Adulta

Após o desmame, os filhotes foram separados por sexo e tratamento, e alojados em gaiolas de polipropileno, mantidos nas mesmas condições laboratoriais de seus pais até o DPN70, quando foram submetidos aos experimentos comportamentais e imunes.



Figura 16 - Contenção física e injeção (i.p.) em rato Wistar. Retirado de Assessing the Health and Welfare of Laboratory Animals. Disponível em: <http://www.ahwla.org.uk/site/tutorials/BVA/BVA06-Rat/Rat.html>

3.5 Determinação no Ciclo Estral

A avaliação da fase do ciclo estral foi feita por meio do lavado vaginal. Esse procedimento consiste em introduzir uma pipeta plástica contendo salina (cloreto de sódio 0,9%) na vagina da rata, colhendo a secreção vaginal como demonstrado na Figura 15. Logo após essa etapa, o conteúdo líquido da pipeta é colocado em uma lâmina de vidro e observado ao microscópio óptico (MARCONDES et al., 2002). A Figura 16 indica os tipos celulares do lavado vaginal de ratas e a proporção entre elas, permitindo ao observador definir a fase do ciclo estral em que o animal se encontra. O pró-estro consiste na predominância de células epiteliais nucleadas (Figura 16a e 16b); o estro caracteriza-se por células queratinizadas cornificadas anucleadas (Figura 16c e 16d); o meta-estro consiste na mesma proporção entre leucócitos, células queratinizadas cornificadas e células epiteliais nucleadas (Figura 16e e 16f) e finalmente o diestro consiste na predominância de leucócitos (Figura 16g e 16h). Nestes experimentos, as fêmeas foram padronizadas e todas se encontravam em estro ou pró-estro.



Figura 17 - Coleta do lavado vaginal com 10 μ L de salina. Retirado de Marcondes (MARCONDES et al., 2002).

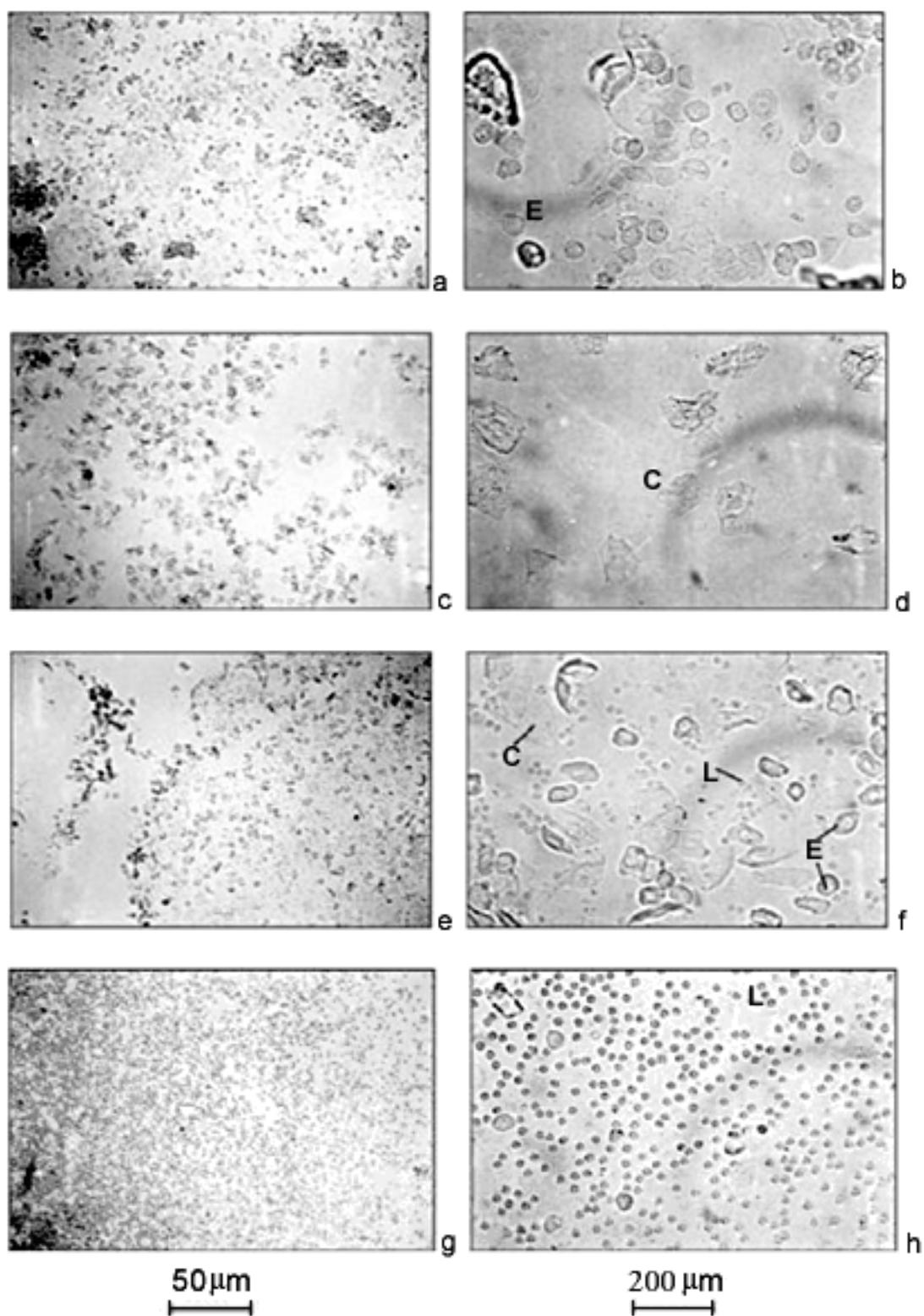


Figura 18 - Fotomicrografia de lavado vaginal de rata L= Leucócitos, E= Células Epiteliais, C= Células Queratinizadas. Retirado de Marcandes et al (MARCONDES et al., 2002).

3.6 MÉTODOS COMPORTAMENTAIS

3.6.1 Atividade Geral em Campo Aberto

Neste teste, os animais são colocados em um campo aberto, sempre durante um mesmo período (manhã ou tarde). Cada animal escolhido (1 fêmea e 1 macho/ninhada) foi colocado individualmente no centro do aparelho de campo aberto, e observado por 3 minutos. Esse campo aberto é construído segundo o modelo descrito por Broadhurst (BROADHURST, 1960). O campo aberto é constituído de uma arena com 97 cm de diâmetro, paredes de 33 cm de altura, pintado de branco e o fundo dividido em 19 partes aproximadamente iguais. Entre um animal e outro, o aparelho é limpo com solução de álcool a 5% para evitar a interferência do odor do animal anterior.

Observa-se a frequência de locomoção, de levantar e o tempo de imobilidade do animal. Define-se unidade de locomoção o ato de o animal penetrar com as quatro patas em uma das divisões do chão da arena; unidade de levantar corresponde à postura de o animal permanecer apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima, podendo ou não tocar com as patas dianteiras as paredes do campo aberto. O registro da frequência dos parâmetros é feito por intermédio de um contador manual. O tempo de imobilidade (*freezing*) é definido quando o animal não apresenta locomoção nem movimentos de farejar. Este parâmetro é medido com o auxílio de um cronômetro.

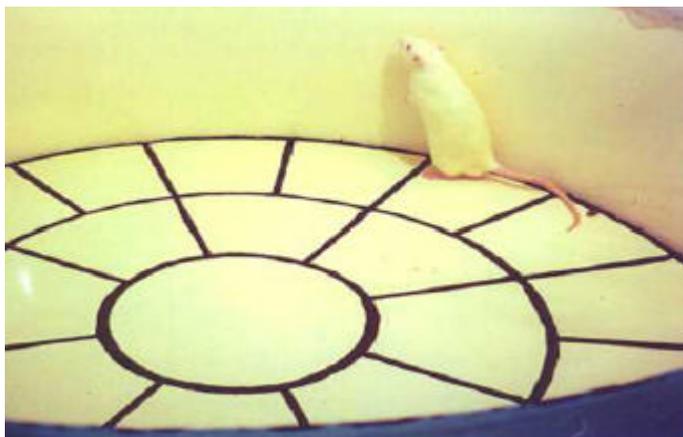


Figura 19 – Rato Wistar em sessão do teste de Atividade Geral em Campo Aberto. Gentilmente cedido por BERNARDI M.M.

3.6.2 Comportamento de Ratos no Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é constituído de 2 braços abertos, opostos, medindo 50 X 10 cm e 2 braços fechados, medindo 50 X 10 X 40 cm com o teto aberto, de tal forma que os braços fechados e abertos ficam dispostos em um ângulo de 90 graus; o piso do labirinto é de madeira pintada de branco e a sala iluminada artificialmente por meio de lâmpadas fosforescentes (1200 lux). O experimentador permanece na sala a uma distância de 1,5 m da extremidade do braço aberto proximal durante os registros. O LCE fica suspenso a uma altura de 50 cm do assoalho da sala por meio de um suporte de madeira.

Para as observações comportamentais, o rato foi retirado de sua gaiola moradia e colocado no centro do LCE no início das sessões, e observado por 5 minutos.

Os parâmetros medidos foram:

- Número de entradas nos braços abertos, sendo considerada uma entrada quando o animal colocava as quatro patas dentro desse compartimento.
- Número de entradas nos braços fechados, sendo considerada uma entrada seguindo o mesmo critério acima citado, porém agora no braço fechado.
- Tempo de permanência nos braços abertos, em segundos.
- Tempo de permanência nos braços fechados, em segundos.
- Tempo no centro

Com os dados obtidos pôde-se calcular, para cada animal, o número total de cruzamentos (soma do número de entradas nos braços abertos e fechados) e porcentagem de entradas e de tempo dispendido nos braços abertos conforme mostrado a seguir:

% de entrada em braço aberto = n° de entradas no braço aberto X 100/ Total de entrada em braço aberto + fechado

% de tempo no braço aberto = tempo no braço aberto X 100/ tempo no braço aberto + fechado

Os animais dos grupos controle e experimental foram observados intercaladamente, durante a fase clara do ciclo de luz. Entre as observações de cada animal, o LCE foi limpo com uma solução de álcool a 5% com intuito de se diminuir a interferência do odor deixado por outros animais nesse aparelho.

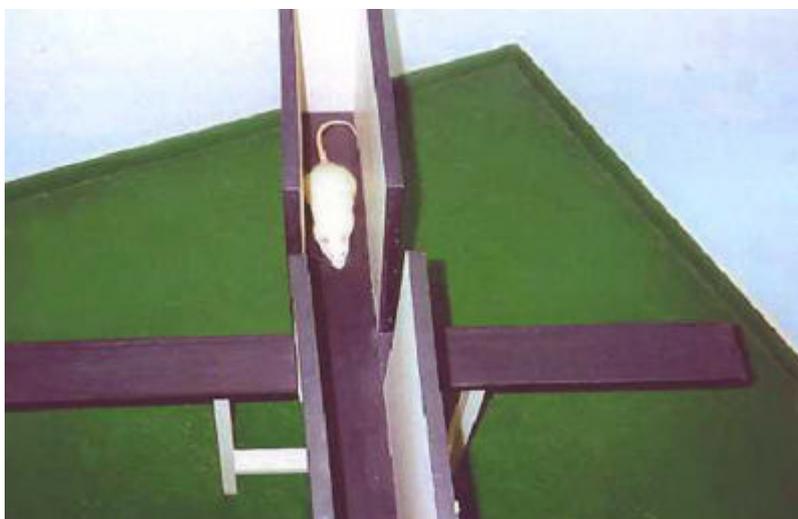


Figura 20 – Rato Wistar em sessão do teste do Labirinto em Cruz Elevado. Gentilmente cedido por BERNARDI M.M.

3.6.3 Natação Forçada

Para o teste de natação forçada foi utilizado um recipiente de vidro medindo 22 cm de diâmetro por 40 cm de altura com 19 cm de água, a uma temperatura média de 20° C (PORSOLT, 1979). Cada rato foi retirado de gaiola moradia e colocado no interior do recipiente para natação, sendo mantido aí por 15 minutos (sessão de treinamento). Após este período de tempo, o animal foi retirado, seco e aquecido por 15 minutos. Vinte e quatro horas após este procedimento, o animal foi recolocado neste recipiente por 5 minutos (sessão de teste) (PORSOLT, 1979).

Tanto na sessão teste como na sessão treinamento, o pesquisador acompanhou o animal para evitar possíveis afogamentos. Os parâmetros analisados no teste são a latência para flutuar que corresponde a quantidade de tempo dispersa antes da primeira flutuação; o número de flutuações e o tempo de flutuação.

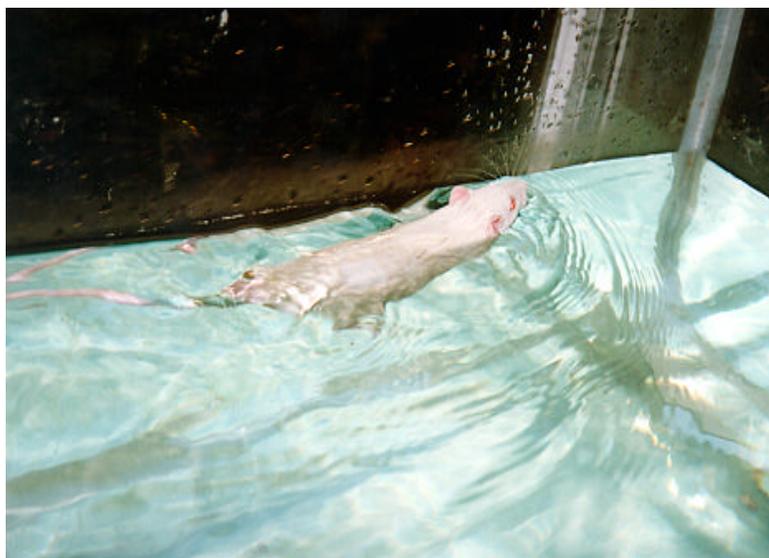


Figura 21 - Rato Wistar em sessão do teste de Natação Forçada. Retirado de Bianchi et al (BIANCHI et al., 2002).

3.7 MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

3.7.1 Determinação do Número de Leucócitos Circulantes

Amostras de sangue foram obtidas da aorta abdominal após a eutanásia dos animais. Foram coletadas em pipeta automática (10 μ l) acrescidas de 190 μ l de líquido de Turk a 3% e a contagem total foi realizada em câmara de Neubauer por microscopia óptica. A contagem diferencial dos leucócitos circulantes foi realizada por esfregaço e corada segundo o kit Instant-Prove, sendo a seguir, contadas 100 células.

3.7.2 Determinação do Número Total de Células na Medula Óssea Após a *Eutanásia*

O fêmur esquerdo dos animais foi cirurgicamente removido, ambas as extremidades foram abertas e o canal medular foi perfundido a partir da extremidade distal, com 1 ml de tampão fosfato salino (PBS) , usando uma agulha com espessura de 23G. A suspensão medular foi homogeneizada como o auxílio de uma pipeta de 1ml, e a seguir, as células totais foram contadas em câmara de Neubauer por microscopia óptica. Para tanto, 90 µl da amostra foi acrescida de 10 µl de cristal violeta, seguido de uma segunda diluição de 1:100 em PBS e as células foram expressas $\times 10^6/\text{ml}$.

3.7.3 Quantificação de Mediadores Inflamatórios

As citocinas IL-1 β e TNF-a foram quantificadas no soro, baço e linfonodo por ELISA, por meio de Kits Duo Set (R & D System[®]), disponíveis comercialmente, em alíquotas de soro. Os ensaios foram conduzidos, seguindo as especificações do fabricante. O limite de detecção dos ensaios foi: IL-1 β : 31,3 - 2000 pg/ml; TNFa: 31,3 - 1000 pg/ml.

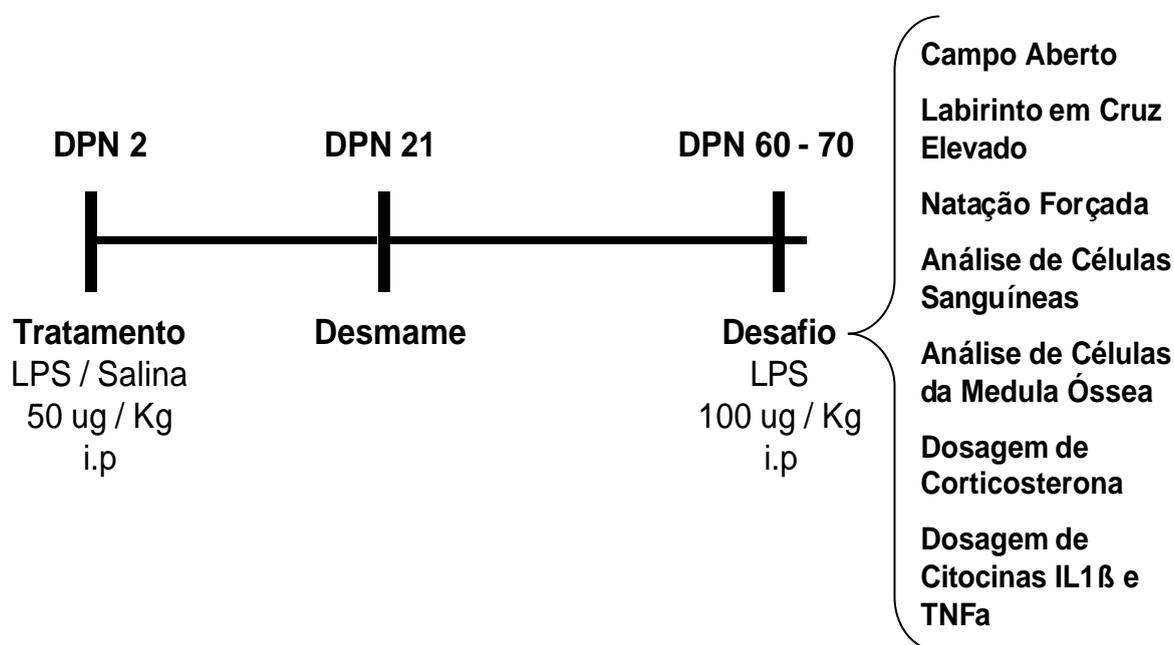
3.7.4 Avaliação dos Níveis Séricos de Corticosterona

Alíquotas de soro foram armazenadas a -70 °C para determinação da corticosterona. A determinação foi feita sem extração química ou purificação, usando kit comercial (Diagnostic Products Co), seguindo as devidas instruções. O limite de detecção de corticosterona foi 0,011 pg/ml. Com a finalidade de diminuir a variabilidade, as amostras de sangue foram coletadas no mesmo horário do dia (entre 9:00 am e 12:00 pm).

3.8 Delineamento Experimental

Foram utilizadas 26 ratas prenhes divididas em 2 grupos iguais: um controle e outro experimental. Ao nascimento, as proles foram pesadas e padronizadas em

número (4 machos e 4 fêmeas). No DPN2, as proles masculina e feminina das ratas do grupo experimental receberam, i.p., 50 µg/Kg de LPS. Na idade adulta (entre 60 e 70 dias de idade), os animais dos dois grupos e dos dois sexos receberam uma dose de 100 µg/Kg de LPS e duas horas após foram encaminhados para os experimentos segundo ilustrado pelo esquema 1. Foram utilizados 1 animal de cada sexo e de ninhadas diferentes para cada experimento. Nos experimentos comportamentais sempre foram empregados 13 animais/grupo. Nas avaliações do sangue, medula óssea, níveis de citocinas e de corticosterona foram empregados 6 animais/grupo.



Esquema 1 - Delineamento experimental.

Descrição dos Grupos Experimentais

Grupos	Tratamento Neonatal	Tratamento na Idade Adulta
SLM	Salina	LPS
LLM	LPS	LPS
SLF	Salina	LPS
LLF	LPS	LPS

Tabela 2 - S= Salina, L= Lipopolissacarídeo, M= Macho, F= Fêmeas.

Análise Estatística

A ANOVA de uma via foi empregada para análise dos dados da corticosterona plasmática, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Foi empregada a ANOVA de duas vias, tendo como fatores o sexo e tratamento. Quando houve interações entre os fatores, foi aplicada a ANOVA de uma via. No caso de ausência de interações aplicou-se o teste *post hoc* de Bonferroni. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada capaz de revelar diferenças significantes entre os resultados. Foram apresentados as médias e respectivos erros-padrão.

RESULTADOS

Experimento 1- Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 µg/Kg) na atividade geral observada em campo aberto de ratos machos e fêmeas desafiados com 100µg/Kg da mesma endotoxina na idade adulta.

A figura 22 ilustra os resultados obtidos de ratos machos e fêmeas, que receberam no DPN2 50µg/Kg de LPS, desafiados, na idade adulta, com a mesma endotoxina (100µg/Kg) na atividade geral observada em campo aberto. A ANOVA de duas vias indicou a existência de diferenças significantes na frequência de locomoção quanto aos fatores tratamento [$F(1/48) = 4,05$, $P=0,049$] e na interação entre os fatores [$F(1/48) = 5,80$, $p = 0,019$].

Não houve diferenças significantes com relação ao fator sexo [$F(1/48)= 0,54$, $p = 0,468$]. O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que a frequência de locomoção das fêmeas do grupo experimental foi menor que daquelas do grupo controle ($p<0,05$).

Com relação à frequência de levantar, não foram observadas diferenças quer quanto ao sexo quer com relação ao tratamento. A duração de imobilidade foi diferente entre os grupos quanto ao tratamento [$F(1/48) = 4,58$, $p= 0, 0378$], não havendo diferenças entre os sexos ([$F(1/48) = 0,54$, $p = 0,84$] e tampouco interação entre os fatores [$F(1/48) = 2,07$, $p = 0,15$]. A duração de limpeza não mostrou diferenças entre os tratamentos [$F (1/48) = 1,32$, $p = 0,25$] e sexo [$F(1/48) = 0,03$, $p = 0,87$] porém, mostrou interação significante entre os fatores [$f(1/48) = 5,35$, $p= 0,02$], expresso por redução no parâmetro em fêmeas do grupo experimental.

CAMPO ABERTO

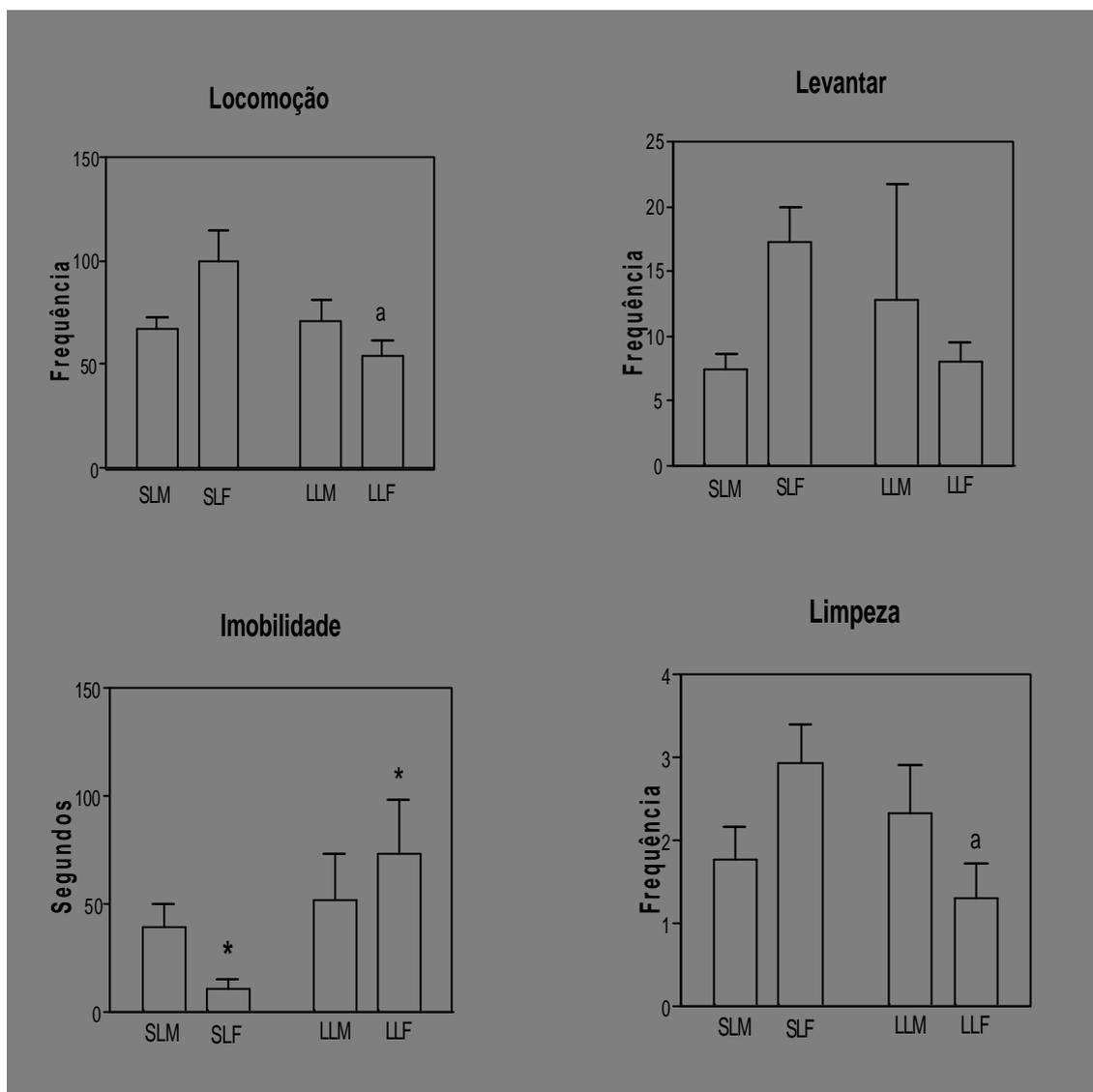


Figura 22 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) na atividade geral observada em campo aberto de ratos machos e fêmeas, desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta. ^a $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle; * $p < 0,05$ em relação ao sexo. $N = 13/\text{grupo}$. ANOVA de 2 vias seguida pelo teste de Bonferroni. SLM = machos tratados com solução salina no período neonatal e desafiados com LPS na idade adulta; LLM = machos tratados no período neonatal com LPS e desafiados na idade adulta com a mesma endotoxina; SLF = fêmeas tratadas no período neonatal com solução salina e desafiadas com LPS na idade adulta; LLF = fêmeas tratadas no período neonatal com LPS e desafiadas com a mesma endotoxina na idade adulta.

Experimento 2- Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) no labirinto em cruz elevado de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta.

A figura 23 ilustra os resultados obtidos no labirinto em cruz elevado de ratos machos e fêmeas que receberam no DPN2 50µg/Kg de LPS, desafiados com a mesma endotoxina (100µg/Kg) na idade adulta.

A ANOVA de duas vias mostrou a existência de diferenças no número de entradas nos braços fechados nos fatores tratamento [$F(1/48) = 8,54$, $P < 0,005$] e sexo [$F(1/48) = 5,12$, $P < 0,02$]; não houve interação entre os fatores. Assim, o teste *post hoc* mostrou, em relação ao tratamento, os animais do grupo LLM apresentaram redução significativa nesse parâmetro; por outro lado, não houve diferenças entre as fêmeas do grupo SLF e LLF. O mesmo teste feito entre os sexos indicou a existência de diferenças significantes entre os animais dos grupos LLM e LLF; não foram detectadas diferenças entre os animais dos grupos SLM e SLF.

A análise do número de entradas no braço aberto indicou diferenças significantes com relação ao tratamento [$F(1/48) = 3,87$, $p < 0,05$], não havendo diferenças quanto ao sexo [$F(1/48) = 1,33$, $p = 0,25$]; não houve interação entre os fatores [$F(1/48) = 0,36$, $p = 0,55$]. O teste *post hoc* mostrou que fêmeas LLF entraram mais no braço aberto em relação às aquelas do grupo SLF ($p < 0,05$).

Não houve diferenças, tanto no tempo de permanência nos braços abertos como nos fechados, com relação aos tratamentos e sexo.

Com relação ao tempo no centro do labirinto em cruz elevado verificou-se que tanto o tratamento [$F(1/48) = 7,58$, $p = 0,008$] como o sexo [$F(1/48) = 7,87$] alteraram os resultados; não houve interação entre os fatores. O teste *post hoc* indicou que o desafio com LPS reduziu o tempo no centro tanto de animais do grupo LLM como LLF em relação aos grupos SLM e SLF. Por outro lado, verificou-se que fêmeas do grupo SLF apresentaram maior tempo de centro que fêmeas do grupo LLF, o mesmo acontecendo entre os grupos SLM e LLM.

LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

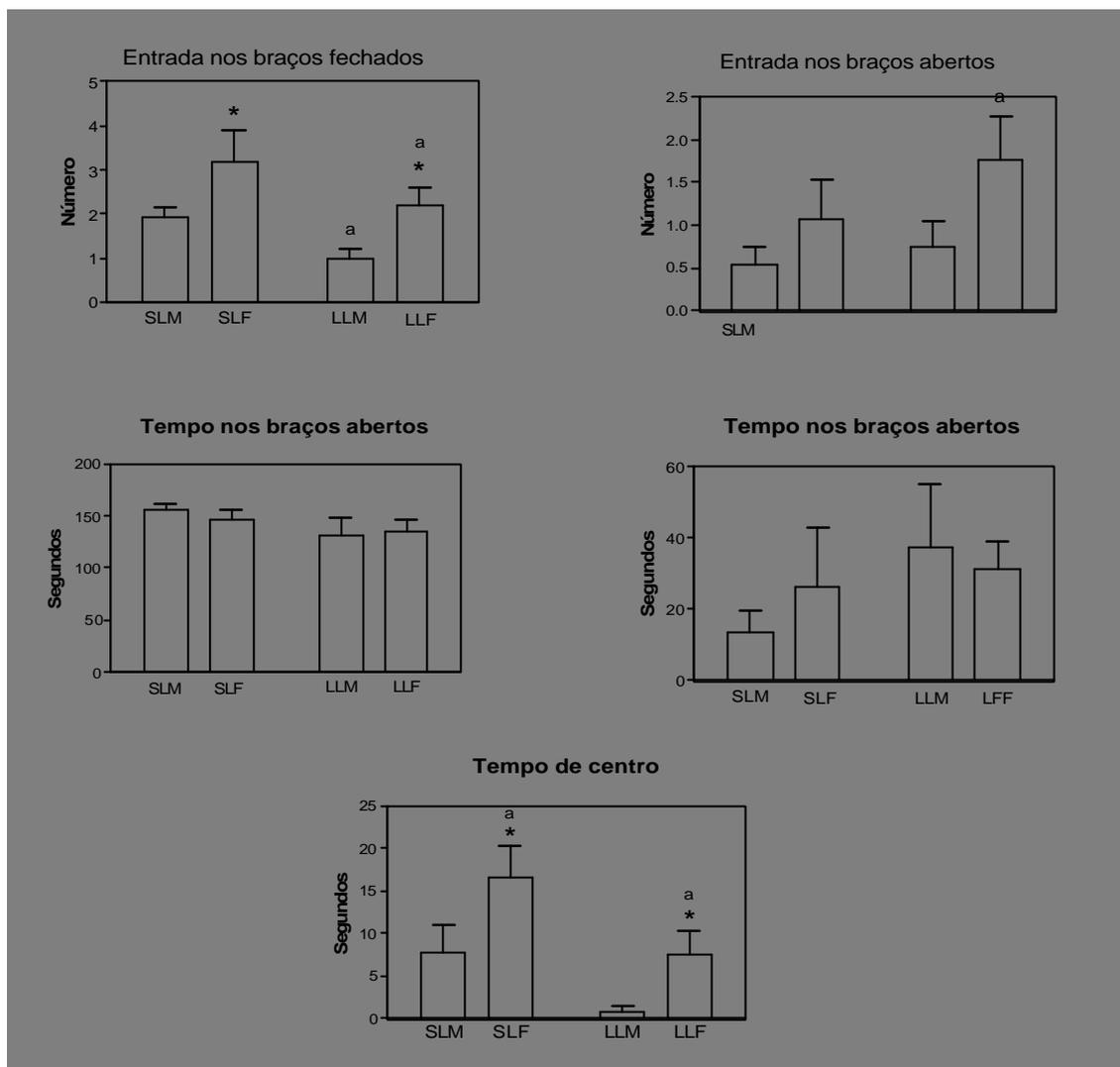


Figura 23 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) no labirinto em cruz elevado de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta. ^a $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle; * $p < 0,05$ em relação ao sexo. $N = 13/\text{grupo}$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. SLM = machos tratados com solução salina no período neonatal e desafiados com LPS na idade adulta; LLM = machos tratados no período neonatal com LPS e desafiados na idade adulta com a mesma endotoxina; SLF = fêmeas tratadas no período neonatal com solução salina e desafiadas com LPS na idade adulta; LLF = fêmeas tratadas no período neonatal com LPS e desafiadas com a mesma endotoxina na idade adulta.

Experimento 3 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) no teste de natação forçada de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta.

A figura 24 ilustra os resultados obtidos no teste de natação forçada de ratos machos e fêmeas que receberam no DPN2 50µg/KG de LPS, desafiados com a mesma endotoxina (100µg/Kg) na idade adulta.

Com relação à latência para flutuar, a ANOVA de duas vias não mostrou diferenças entre tratamento e sexo, porém indicou interação entre os fatores [F(1/48) = 7,98, p = 0,007]. O teste de Bonferroni mostrou que a latência para flutuar do grupo LLF foi menor que do grupo LLM.

Com relação ao número de flutuações, a ANOVA de duas vias indicou diferenças significantes no fator sexo [F(1/48)= 6,36, p= 0,01]. Não houve alterações com relação ao tratamento e, na interação entre os fatores.

A ANOVA de duas vias mostrou que, no tempo de flutuação, o tratamento alterou os resultados [F(1/48) = 4, 07, p= 0,049]. Não houve alterações quanto ao sexo e também na interação entre os fatores.

NATAÇÃO FORÇADA

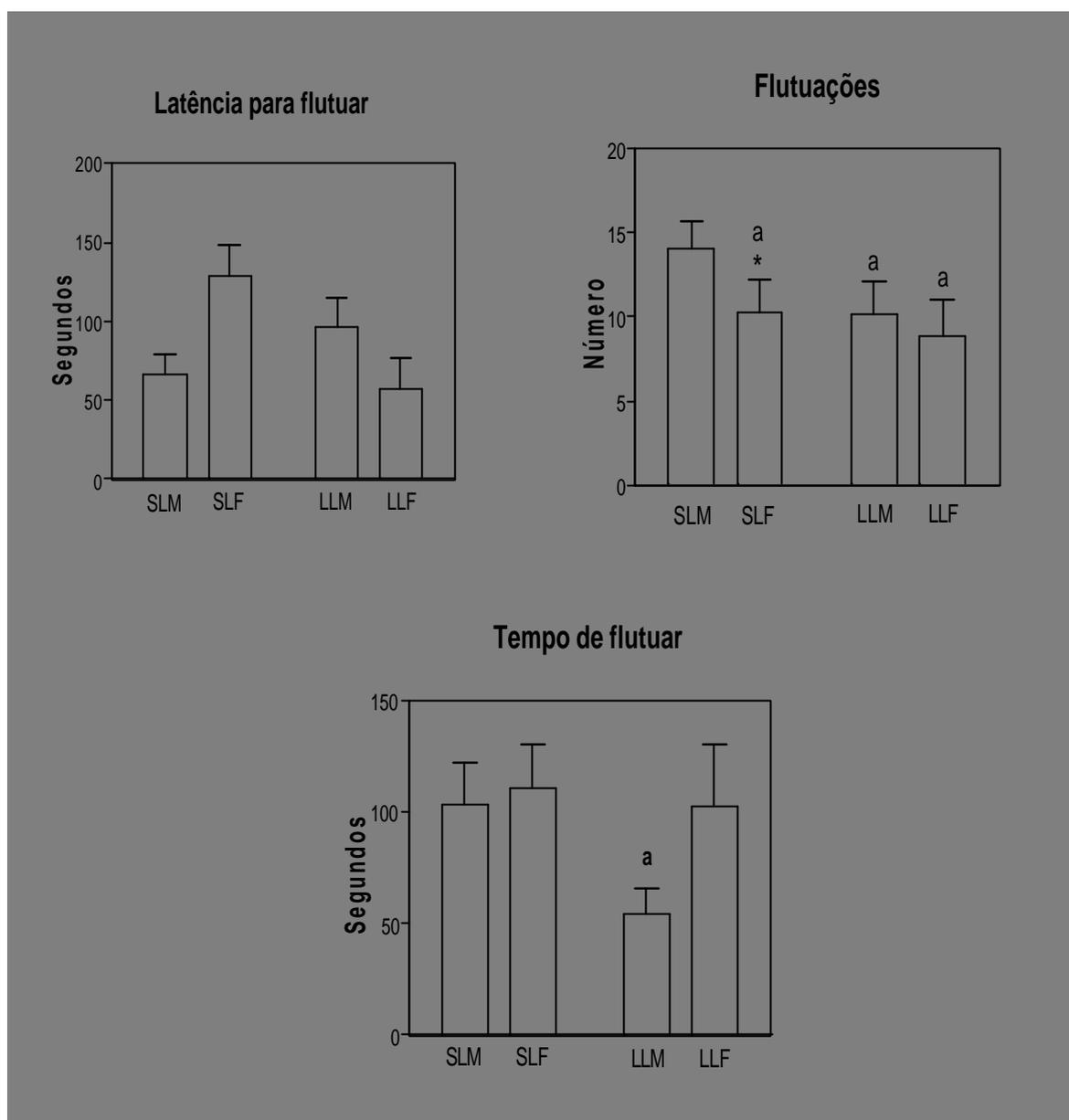


Figura 24 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) no teste de natação forçada de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta. ^a $p < 0,05$ e em relação ao respectivo grupo controle; * $p < 0,05$ em relação ao sexo. $N = 13/\text{grupo}$. ANOVA de 2 vias. SLM = machos tratados com solução salina no período neonatal e desafiados com LPS na idade adulta; LLM = machos tratados no período neonatal com LPS e desafiados na idade adulta com a mesma endotoxina; SLF = fêmeas tratadas no período neonatal com solução salina e desafiadas com LPS na idade adulta; LLF = fêmeas tratadas no período neonatal com LPS e desafiadas com a mesma endotoxina na idade adulta.

Experimento 4 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) no número de leucócitos circulantes de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta.

A figura 25 ilustra o número de leucócitos circulantes de ratos machos e fêmeas expostos ao LPS no DPN2 , desafiados na idade adulta com 100µg/Kg da mesma endotoxina na idade adulta.

A ANOVA de 2 vias indicou a existência de diferenças significantes no fator sexo [$F(1/20) = 3,68$, $p = 0,001$] e não no tratamento. Uma vez que houve interação entre os fatores [$F(1/20) = 13,83$, $p = 0,001$], aplicou-se nos dados uma ANOVA de uma via.

Houve diferenças significantes entre os resultados dos animais dos grupos SLM e LLM ($p < 0,001$), SLF e LLM ($p < 0,01$) bem como LLF e LLM.

A análise diferencial das células sanguíneas mostrou que não ocorreram diferenças nos fatores sexo e tratamento nas células polimorfonucleares (PMN- Figura 22A.), porém verificou-se interação entre os fatores. Aplicada a ANOVA de 1 via, esta não mostrou diferenças entre os grupos. Os mesmos resultados foram observados para as células mononucleares do sangue (MN- Figura 22 B).

CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

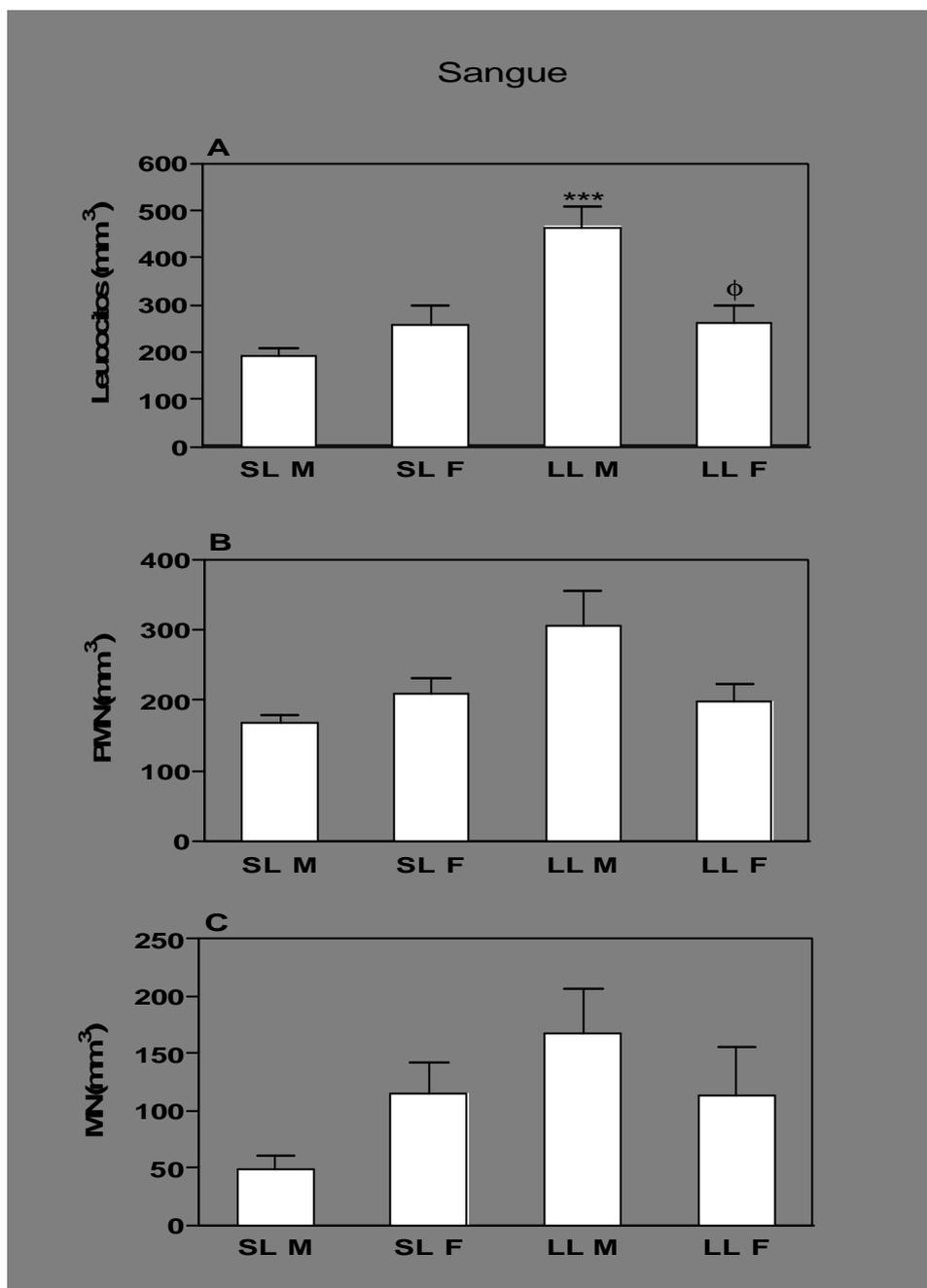


Figura 25 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) no número leucócitos circulantes totais (A), polimorfonucleares (B) e mononucleares (C) de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta. SLM = machos tratados com solução salina no período neonatal e desafiados com LPS na idade adulta; LLM = machos tratados no período neonatal com LPS e desafiados na idade adulta com a mesma endotoxina; SLF = fêmeas tratadas no período neonatal com solução salina e desafiadas com LPS na idade adulta; LLF = fêmeas tratadas no período neonatal com LPS e desafiadas com a mesma endotoxina na idade adulta. N= 6/ grupo. ANOVA de 2 vias. *** $p < 0.001$ em relação aos animais dos demais grupos.

Experimento 5 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 µg/Kg) no número total de células da medula óssea de ratos machos e fêmeas desafiados com 100µg/Kg da mesma endotoxina na idade adulta.

A figura 26 ilustra os efeitos da ativação precoce do sistema imune com LPS (50 µg/Kg) no número total de células da medula óssea de ratos machos e fêmeas desafiados com 100µg/Kg da mesma endotoxina na idade adulta.

A ANOVA de 2 vias mostrou que ambos fatores, tratamento ([F(1/20) = 50,53, p < 0,0001] e sexo [F(1/20) = 5,35, p = 0,03] foram alterados; não houve interação entre os fatores. O teste *post hoc* indicou que o tratamento aumentou o número de células do lavado femoral da medula óssea de ratos machos e que, tanto animais do grupo SLF como LLF, apresentaram menor número de células no lavado da medula óssea em relação aos machos de ambos grupos.

CONTAGEM TOTAL DO NÚMERO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA APÓS EUTANÁSIA

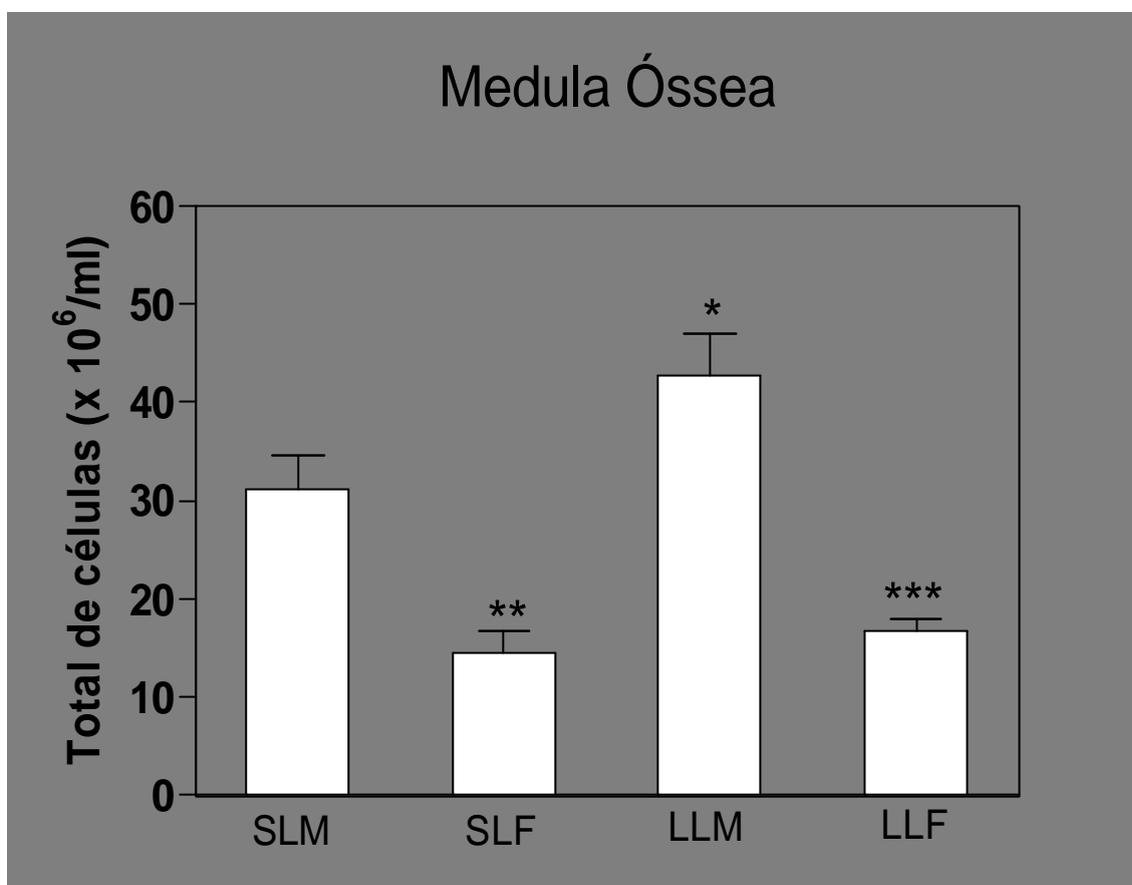


Figura 26 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 µg/Kg) no número total de células da medula óssea de ratos machos e fêmeas desafiados com 100µg/Kg da mesma endotoxina na idade adulta. SLM = machos tratados com solução salina no período neonatal e desafiados com LPS na idade adulta; LLM = machos tratados no período neonatal com LPS e desafiados na idade adulta com a mesma endotoxina; SLF = fêmeas tratadas no período neonatal com solução salina e desafiadas com LPS na idade adulta; LLF = fêmeas tratadas no período neonatal com LPS e desafiadas com a mesma endotoxina na idade adulta. N= 6/ grupo. ANOVA de 2 vias. * p< 0.05, **p< 0.01, p< 0.001 em relação ao sexo.

Experimento 6 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 µg/Kg) nos níveis de citocinas do soro, baço e linfonodos (IL-1 β E TNFa) de ratos machos e fêmeas desafiadas com 100µg/Kg da mesma endotoxina na idade adulta.

A figura 27 ilustra os efeitos da ativação precoce do sistema imune com LPS (50 µg/Kg) nos níveis de IL-1 β E TNFa do soro de ratos machos e fêmeas desafiados com 100µg/Kg da mesma endotoxina na idade adulta. Nesse caso, como houve interação entre os dados foi aplicada a ANOVA de uma via, indicando a existência de diferenças significantes nos níveis de IL-1 β [F(3/17)=4,33, P=0,023]. O teste *post hoc* indicou que os níveis dessa citocina foram reduzidos significantemente nos animais do grupo LLM em relação aos dos grupos SLF e LLF. A ANOVA de 1 via não indicou diferenças significantes entre os níveis de TNFa no soro de todos os grupos.

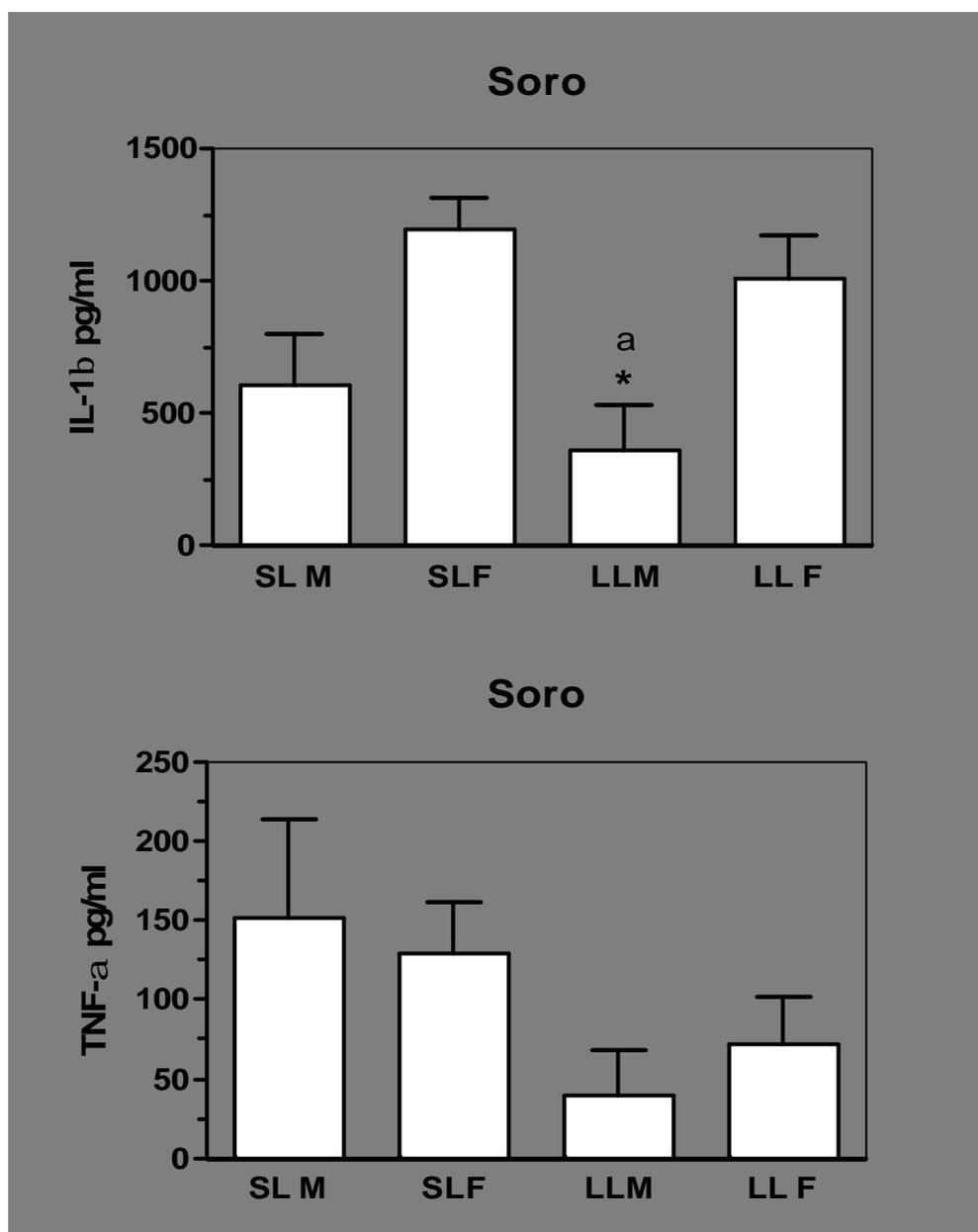
DOSAGEM DE IL-1 β e TNF α NO SORO

Figura 27 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 μ g/Kg) nos níveis IL-1 β E TNF α no soro de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 μ g/Kg da mesma endotoxina na idade adulta. SLM = machos tratados com solução salina no período neonatal e desafiados com LPS na idade adulta; LLM = machos tratados no período neonatal com LPS e desafiados na idade adulta com a mesma endotoxina; SLF = fêmeas tratadas no período neonatal com solução salina e desafiadas com LPS na idade adulta; LLF = fêmeas tratadas no período neonatal com LPS e desafiadas com a mesma endotoxina na idade adulta. N= 4-5 grupo. ANOVA de 2 vias. $a < p < 0,05$ em relação ao grupo SLF, * $p < 0,05$ em relação ao grupo LLF.

A figura 28 ilustra os efeitos da ativação precoce do sistema imune com LPS (50 µg/Kg) nos níveis de IL-1β E TNFα do baço de ratos machos e fêmeas desafiados com 100µg/Kg da mesma endotoxina na idade adulta. Nesse caso, como houve interação entre os dados foi aplicada a ANOVA de uma via. Não foram detectadas alterações nos níveis de IL-1β dos diferentes grupos. No entanto, essa análise indicou a existência de diferenças nos níveis de TNFα do baço [F(3/22) = 6,55, P= 0,003].O teste *post hoc* indicou que os níveis dessa citocina foram significativamente maiores nas fêmeas do grupo LLF em relação aos machos do grupo LLM.

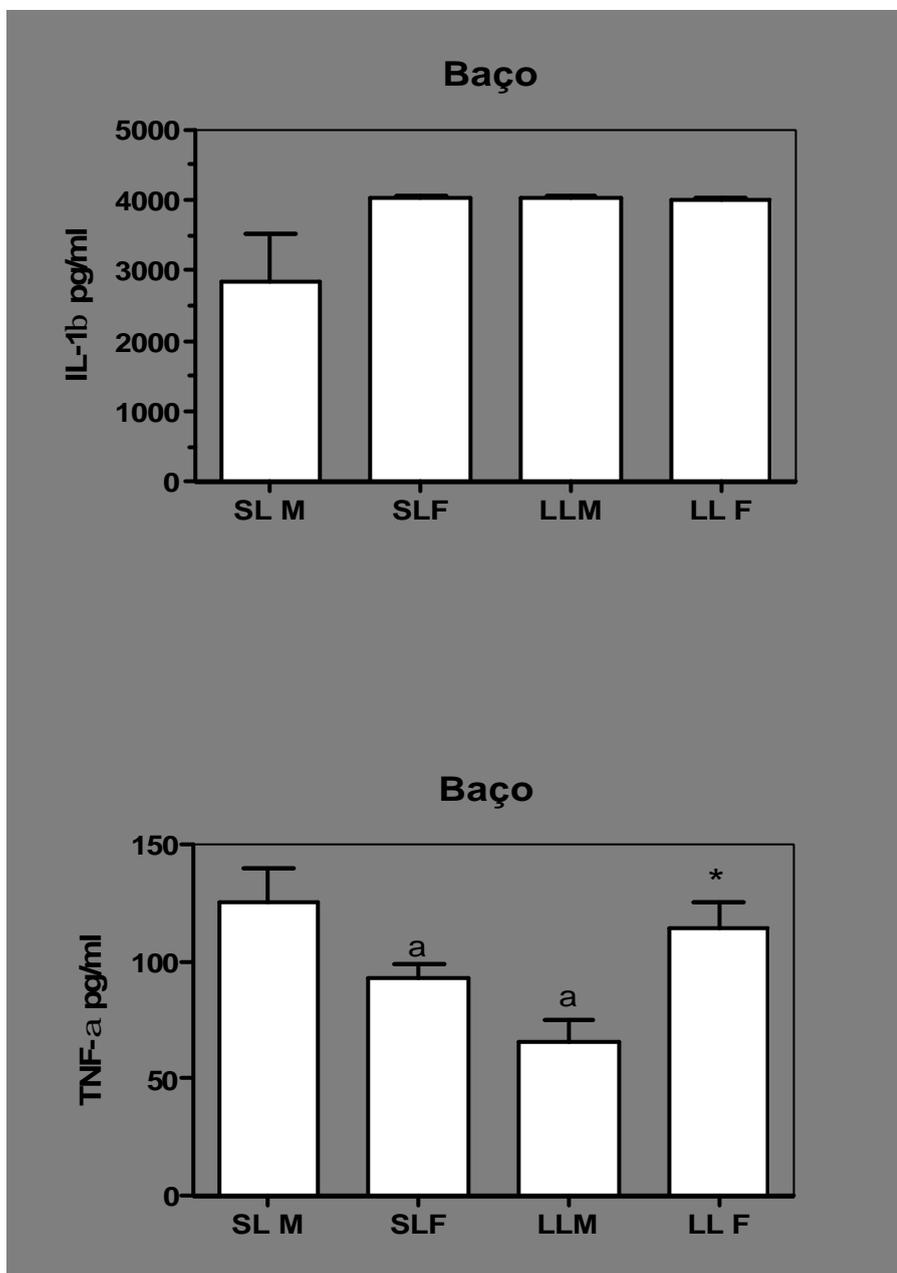
DOSAGEM DE IL-1 β e TNFa NO BAÇO

Figura 28 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 μ g/Kg) nos níveis IL-1 β E TNFa no baço de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 μ g/Kg da mesma endotoxina na idade adulta. SLM = machos tratados com solução salina no período neonatal e desafiados com LPS na idade adulta; LLM = machos tratados no período neonatal com LPS e desafiados na idade adulta com a mesma endotoxina; SLF = fêmeas tratadas no período neonatal com solução salina e desafiadas com LPS na idade adulta; LLF = fêmeas tratadas no período neonatal com LPS e

desafiadas com a mesma endotoxina na idade adulta. N= 4-5 grupo. ANOVA de 2 vias. $a < p < 0,05$ em relação ao grupo SLM, * $p < 0,05$ em relação ao grupo LLM.

A figura 29 ilustra os efeitos da ativação precoce do sistema imune com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) nos níveis de IL-1 β E TNFa dos linfonodos de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta. Nesse caso também, como houve interação entre os dados, foi aplicada a ANOVA de uma via. E o teste mostrou que houve diferenças significantes entre os níveis de IL-1 β dos diferentes grupos [F(3/9)= 125,4, P<0,001]. O teste *post hoc* indicou que os níveis dessa citocina foram maiores nos animais do grupo LLF em relação aos demais grupos. Não foram detectadas alterações nos níveis de TNFa dos diferentes grupos.

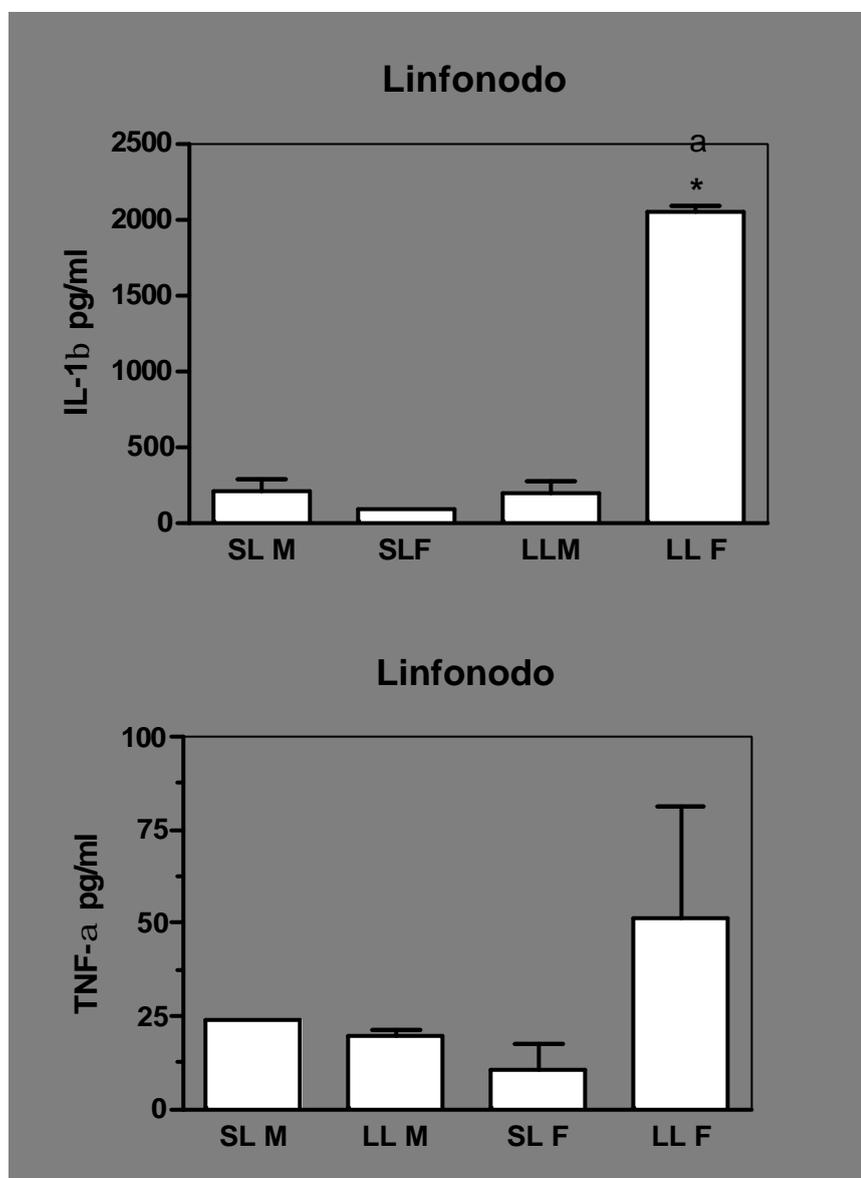
DOSAGEM DE IL-1 β E TNF α NO LINFONODO

Figura 29 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 μ g/Kg) nos níveis IL-1 β E TNF α nos linfonodos de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 μ g/Kg da mesma endotoxina na idade adulta. SLM = machos tratados com solução salina no período neonatal e desafiados com LPS na idade adulta; LLM = machos tratados no período neonatal com LPS e desafiados na idade adulta com a mesma endotoxina; SLF = fêmeas tratadas no período neonatal com solução salina e desafiadas com LPS na idade adulta; LLF = fêmeas tratadas no período

neonatal com LPS e desafiadas com a mesma endotoxina na idade adulta. N= 4-5 grupo. ANOVA de 1 via. $a < p < 0,05$ em relação ao grupo SLM, * $p < 0,05$ em relação aos grupos SLF e LLM.

Experimento 7 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) nos níveis de corticosterona plasmática de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta.

A ANOVA de 1 via indicou a existência de diferenças entre os grupos ($p < 0.0001$) e o teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls indicou que houve aumento nos níveis do hormônio nos animais do grupo SLF em relação àqueles do grupo SLM. Além disso, verificou-se que os níveis do hormônio foram menores nos animais do grupo LLF em relação àqueles do grupo SLF.

DOSAGEM DE CORTICOSTERONA NO SORO

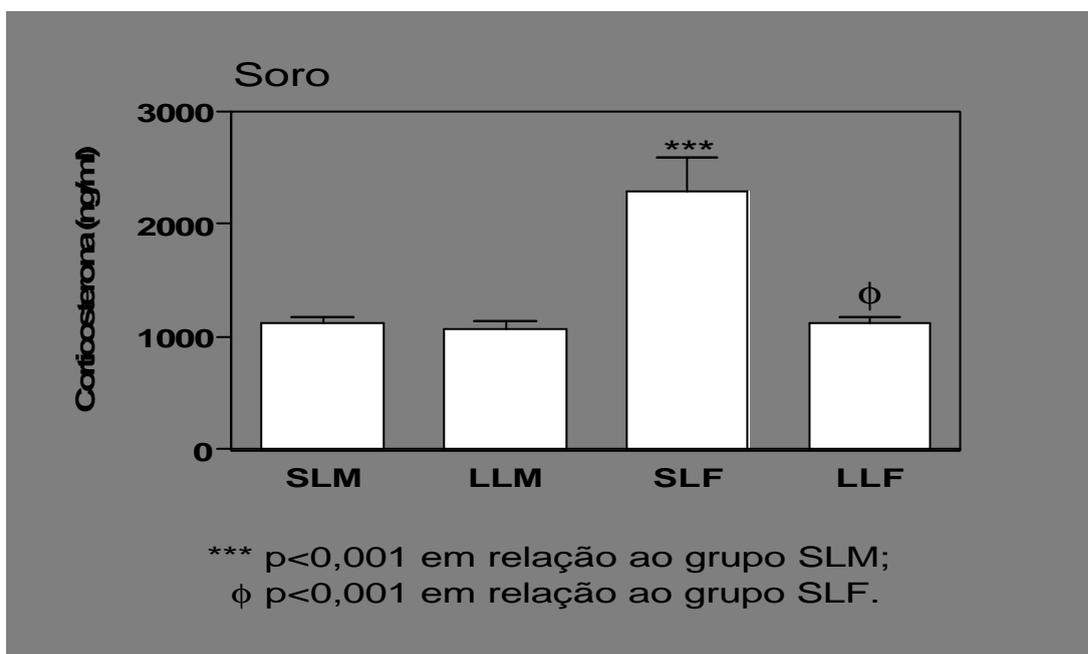


Figura 30 - Efeitos da ativação precoce do sistema imune (DPN2) com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) nos níveis de corticosterona plasmática de ratos machos e fêmeas desafiados com 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ da mesma endotoxina na idade adulta. SLM = machos tratados com solução salina no período neonatal e desafiados com LPS na idade adulta; LLM = machos tratados no período neonatal com LPS e desafiados na idade adulta com a mesma endotoxina; SLF = fêmeas tratadas no período neonatal com solução salina e desafiadas com LPS na idade adulta; LLF = fêmeas tratadas no período neonatal com LPS e desafiadas com a mesma endotoxina na idade adulta. N= 4-5 grupo. ANOVA de

1 via seguida pelo teste de Newman-Keuls $? < p, 0,05$ em relação ao grupo SLM, * $p < 0,05$ em relação ao grupo LLM.

DISCUSSÃO

A ativação precoce do sistema imune no DPN2 promoveu uma série de alterações comportamentais, tanto devidas ao tratamento quanto ao sexo, nos animais desafiados ou não, na idade adulta com a mesma endotoxina.

Há mais de 20 anos, está bem documentado que infecções e inflamações causam o comportamento doentio nos animais. Esse comportamento está presente em diferentes espécies como roedores e humanos, sendo importante para lutar contra o microorganismo invasor, buscando a cura. Isso é possível graças à modulação do SI na atividade do sistema nervoso (PAVLOV; TRACEY, 2004; HAVA et al., 2006a; DANTZER; KELLEY, 2007b). Esse comportamento apresenta uma sintomatologia bastante variada, incluindo a diminuição na atividade exploratória e na ingestão de alimentos (LARSON; DUNN, 2001).

O campo aberto foi introduzido por Calvin Hall (HALL, 1934), esse teste foi primeiramente usado para avaliar a emocionalidade. Hall define, em seu trabalho, o termo *emocionalidade* como um estado emocional formado por um grupo de reações orgânicas e expressivas que denotam uma condição de excitação no animal. Walsh e Cummings (WALSH; CUMMINS, 1976) reformularam o conceito passando a defini-lo como uma entidade com componentes afetivos não-específicos do comportamento.

Em seus experimentos, Hall (HALL, 1936) mostrou que quando ratos eram expostos a um ambiente estranho, a defecação e o ato de urinar seriam índices de um estado emocional. Um roedor assustado e submetido a um estímulo estressor, representado por uma arena aberta, tenderia a “congelar”, defecar e urinar. Em 1936, realizou um novo experimento no campo aberto para examinar a relação existente entre a emocionalidade (medida pelos níveis de defecação) e a velocidade na atividade locomotora (medida pela distância atravessada por unidade de tempo). Como resultado, os ratos que mais se locomoviam, defecavam menos (HALL, 1936).

Nos anos seguintes, esses experimentos foram reproduzidos por outros pesquisadores e a maioria confirmou os resultados anteriormente obtidos Ossenkopp e Mazmanian (OSSENKOPP; MAZMANIAN, 1985). Todavia, outros trabalhos que tentavam relacionar locomoção e defecação não foram consistentes, como o experimento realizado por PARÉ (PARE, 1964), que demonstrou que os dois parâmetros comportamentais avaliados no teste do campo aberto eram independentes.

Whimbey e Denenberg (WHIMBEY; DENENBERG, 1967) decidiram avaliar os dados que tinham sido obtidos anteriormente nesse modelo, tendo em mente alguns critérios considerados por vários autores, que acreditavam que a atividade aumentada nos ratos expostos ao aparato poderia representar uma tentativa de fuga ao invés de exploração do ambiente novo. Seus experimentos demonstraram que uma correlação negativa entre atividade locomotora e defecação parecia estar restrita ao primeiro dia de exposição ao campo aberto.

Apesar das controvérsias, quase 30 anos após o experimento inicial de Hall, Broadhurst (BROADHURST, 1960) selecionou ratos geneticamente para alta e baixa defecação no teste do campo aberto, obtendo as linhagens de ratos Maudsley reativas e não-reativas. Essa seleção levou a outro resultado: os animais que defecavam mais eram menos ativos. Outras hipóteses foram criadas, levando em conta o trabalho de Broadhurst, entre elas a de que um substrato genético forte poderia atuar para gerar essa correlação negativa entre as duas variáveis comportamentais avaliadas no teste do campo aberto (FLINT, 2004).

Outro aspecto considerado por alguns autores, e que talvez explicasse a variedade de resultados, é a influência do ambiente e do procedimento aplicado no comportamento dos animais submetidos a esse modelo experimental de ansiedade. O teste do campo aberto representaria não somente um ambiente novo e aversivo, mas também envolveria variáveis como separação social, linhagem, sexo e idade dos animais testados (isto é, geralmente as fêmeas apresentam os maiores níveis de locomoção em relação aos machos) (PALANZA, 2001), contato com o experimentador, tempo de duração do teste, iluminação, entre outras (SUÁREZ; GALLUP, 1981), que poderiam estar, de alguma forma, gerar resultados contrastantes (WALSH; CUMMINS, 1976).

A despeito dos resultados contraditórios obtidos ao longo das últimas décadas, o teste do campo aberto é considerado como um bom modelo animal de ansiedade por sua sensibilidade bidirecional a tratamentos farmacológicos, avaliando o comportamento semelhante à ansiedade em várias espécies, incluindo animais transgênicos e camundongos knockout (CAROLA et al., 2002).

O comportamento de roedores no campo aberto é sexualmente dimórfico, fêmeas exploram mais o campo aberto que machos. Analisando-se a atividade geral em campo aberto de fêmeas e machos dos grupos SLM e SLF verifica-se que o LPS administrado na idade adulta não alterou o dimorfismo sexual desses animais. De fato, as fêmeas apresentaram maior atividade locomotora e menor imobilidade que os machos, fato já conhecido na literatura. Por outro lado, nos animais dos grupos LLF e LLM, fêmeas apresentaram redução na frequência de locomoção, aumento na imobilidade e menores taxas de limpeza que aquelas do grupo SMF. O dimorfismo sexual não ocorreu na locomoção, mas permaneceu na imobilidade. As fêmeas do grupo LLM apresentaram aumento da duração do tempo parado e redução na frequência de limpeza com relação aos grupos SLM e SLF. Estes dados indicam que ratas expostas neonatalmente ao LPS e desafiadas na idade adulta com a mesma endotoxina desenvolvem maior comportamento doentio que ratos machos na mesma condição.

Pitychoutis et al. (PITYCHOUTIS et al., 2009b) mostram diferenças entre a susceptibilidade de ratos e ratas a 100 µg/Kg de LPS na idade adulta quanto à atividade exploratória. Nesse sentido, machos são mais sensíveis à endotoxina que fêmeas. No presente trabalho, verificou-se o contrário. É, pois, possível que fêmeas expostas na infância a doenças respondam mais às doenças na idade adulta. Este fato não ocorre na prole masculina.

Por outro lado, Tenk et al. (TENK et al., 2008) mostram que a ativação imune por LPS nos DPN 3 e DPN 5 reduz de forma significativa a atividade geral de ratos machos e não de fêmeas quando expostos novamente na idade adulta à mesma endotoxina. É, pois, possível que as diferenças encontradas entre o presente estudo e esses autores provavelmente, se devam ao dia de tratamento pós-natal.

Eventos perinatais têm efeitos em longo prazo no desenvolvimento do sistema nervoso e no comportamento. Além da origem genética das anomalias, fatores ambientais estão correlacionados, e eventos estressantes durante os períodos pré e pós-natal podem causar desenvolvimento deletério de funções cerebrais (KOEHL et al., 2001). Manipulações estressantes nesse período demonstram ser indutoras de alterações persistentes, levando a prejuízos cognitivos e emocionais, quando a prole se torna adulta (KOFMAN, 2002). A sensibilidade aumentada do eixo HPA, o sistema endócrino que controla a secreção de hormônios do estresse (corticóides), aparece como sendo o maior elemento dessas patologêneses.

O rato, diferentemente do ser humano, nasce imaturo, sua primeira semana de vida representa os últimos estágios da vida de um bebê humano (MORGANE et al., 2002; BERNARDI, 2006). Então, seu eixo HPA não está pronto nos primeiros dias de vida e não pode responder da maneira esperada a um estímulo estressor. Dessa forma, a exposição precoce ao LPS pode ter alterado as respostas a um estresse na idade adulta, levando a alterações nos níveis de ansiedade. Um dos sinais do comportamento doentio é, sem dúvida, o aumento de ansiedade. Knox et al. (KNOX et al., 2009) mostram que o desafio imunológico em períodos precoces da vida, leva a efeitos de longo prazo nas respostas programadas do eixo HPA, inclusive em processos ligados à puberdade.

O LCE é um modelo animal validado do ponto de vista farmacológico, bioquímico e comportamental como teste de ansiedade no rato (PELLOW et al., 1985). Sua funcionalidade como um modelo animal de ansiedade baseia-se na atividade exploratória espontânea e na aversão natural do animal pelos braços abertos. O número de entradas e tempo gasto nos braços abertos são usados como indicadores inversamente relacionados à ansiedade (PELLOW et al., 1985; HOGG, 1996): quanto mais intensa a exploração dos braços abertos, menor a ansiedade.

Várias manipulações são capazes de alterar o comportamento do rato nesse teste, observando-se aumentos seletivos na exploração dos braços abertos após a administração de ansiolíticos, como clordiazepóxido e diazepam (PELLOW et al.,

1985). Consistentemente, agentes farmacológicos que provocam ansiedade diminuem a atividade exploratória nos braços abertos (PELLOW et al., 1985).

A maioria dos trabalhos que utiliza o LCE relata redução na frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos de ratos submetidos à privação social, sugerindo que tal manipulação pode induzir ansiedade, tal como é medida por esse modelo (MOTTA et al., 1992; IMHOF et al., 1993; DA SILVA et al., 1996). Outros fatores também parecem influenciar a atividade exploratória no labirinto, entre eles a idade em que é introduzido o isolamento e a duração do mesmo (FRUSSA-FILHO et al., 1991; MAISONNETTE et al., 1993).

Em relação aos ratos do grupo SLM, no LCE, as ratas do grupo SLF apresentaram maior número de entradas no braço fechado e ficaram mais tempo no centro do aparelho, fato indicativo do dimorfismo sexual entre os grupos. A primeira vista esses dados sugeririam maior ansiedade das fêmeas em relação aos machos de mesmo tratamento. No entanto, não foram observadas alterações no tempo despendido tanto no braço aberto como fechado desses animais. Desde que as fêmeas do grupo SLF apresentaram maior atividade geral no campo aberto que machos do grupo SLM, pode-se sugerir que esses resultados sejam indicativos da maior atividade exploratória das fêmeas em questão.

Por outro lado, nos animais dos grupos tratados neonatalmente com o LPS, verifica-se que a endotoxina reduziu o número de entradas no braço fechado dos dois sexos em relação aos não tratados neonatalmente. O dimorfismo sexual nesse caso foi preservado. Fêmeas do grupo LLF entram mais vezes no braço aberto em relação às fêmeas do grupo SLF, provavelmente, em razão de sua maior atividade exploratória observada em campo aberto. Os resultados da avaliação no LCE refletem as alterações promovidas pelo comportamento doentio na atividade geral dos animais. Importante, é que, nesse aparelho, o dimorfismo sexual não foi alterado pelo tratamento neonatal. Além disso, os resultados observados para o tempo de centro concordam com a hipótese do presente trabalho.

O teste da natação forçada é considerado um teste farmacologicamente válido para avaliar a síndrome depressiva. É baseado na observação de que os ratos seguem, inicialmente, movimentos de fuga orientada e, posteriormente,

desenvolvimento de postura de flutuação imóvel no cilindro de água, na sessão de treinamento. Quando os animais são colocados de volta no cilindro de experimentação, 24 horas depois, retornam a essa postura rapidamente (ZANGEN et al., 2005). Essa postura foi interpretada por Porsolt et al. (PORSOLT et al., 1977) como a que leva o animal a um estado de desespero, que é induzido pela situação inescapável aprendida durante a primeira sessão do teste, a sessão de treinamento. A soma total do tempo que o animal demonstra esse comportamento é registrada e depois avaliada. Porsolt et al. (PORSOLT et al., 1977) descrevem a postura de imobilidade como a manutenção somente dos movimentos necessários para manter o animal com a cabeça acima da água.

Animais estressados no período pré-natal são caracterizados por altos níveis de ansiedade e alterações do tipo depressivas como aumento do sono paradoxal (DUGOVIC et al., 1999) e da imobilidade no teste de natação forçada (MORLEY-FLETCHER et al., 2003). A diminuição na latência para parar de nadar e não no tempo de imobilidade sugere que isso seja causado por alterações motoras dos animais (LAZARINI et al., 2001).

As ratas do grupo SLF não mostraram diferenças entre o tempo de flutuação quando comparadas aos ratos do grupo SLM. No entanto, observa-se dimorfismo sexual na latência para flutuar e no número de flutuações.

No teste de natação forçada, o tempo de flutuação corresponde ao tempo de duração de imobilidade dos animais, sendo esse parâmetro denominado de *behavioral despair* ou *desespero comportamental* e pode ser considerado como uma resposta depressiva à impossibilidade de escapar (LAZARINI et al., 2001).

No presente estudo, a administração neonatal de LPS e mesmo da endotoxina na idade adulta não causou alteração nesse parâmetro, exceto nos animais do grupo LLM. Nesse último caso, pode-se aventar que em machos a administração neonatal de LPS produziu sinais menores de depressão aguda frente ao desafio com a endotoxina, fato que não ocorreu com as fêmeas.

No caso do número de flutuações, o dimorfismo sexual não ocorreu e todos os grupos apresentaram menores resultados que daqueles animais do grupo SLM.

Drossopouleou et al. (DROSSOPOULOU et al., 2004) investigaram a existência de diferenças nas respostas comportamentais sexualmente dimórficas, na atividade da serotonina e no eixo HPA. Estes autores mostram dimorfismo sexual na ativação do eixo HPA, mais pronunciada em machos em alguns aspectos comportamentais. Entre os vários parâmetros medidos verificaram que fêmeas flutuaram mais que machos, sendo o comportamento sexualmente dimórfico. Nesse sentido, dados deste estudo concordam com os achados dos autores.

Na literatura já é fato bem estabelecido a maior sensibilidade de fêmeas à depressão em relação aos machos, havendo proporção de 1:2 (NESTLER et al., 2002; BERTON; NESTLER, 2006), de acordo com os presentes resultados.

A administração a ratos adultos de LPS produz alterações sexualmente dimórficas na serotonina e no eixo HPA. As fêmeas foram mais reativas que machos ao LPS (PITYCHOUTIS et al., 2009b) . É, pois, possível sugerir que a exposição neonatal ao LPS tenha reduzido a sensibilidade de machos ao LPS nesse modelo comportamental. Evidentemente, não se podem descartar possíveis influências de hormônios sexuais, como a testosterona e estrógeno, nesses resultados. Adiante essa hipótese será discutida.

Resumidamente, os dados comportamentais deste trabalho mostraram que fêmeas expostas neonatalmente ao LPS, quando desafiadas na idade adulta com a mesma endotoxina, desenvolveram redução na atividade geral, característico de comportamento doentio e nenhuma alteração no modelo de depressão. Por outro lado, machos na mesma situação, não apresentaram alteração na atividade geral, mostraram maior ansiedade e redução de respostas similar à depressão na natação forçada. Estes dados são reforçados pelos resultados obtidos nos níveis de corticosterona.

Vanbesien-Mailliot et al. e Viltart; Vanbesien-Mailliot et al. (VANBESIEN-MAILLIOT et al., 2007; VILTART; VANBESIEN-MAILLIOT, 2007) descrevem que ocorre uma reorganização permanente dos sistemas fisiológicos, em consequência de um evento inflamatório isolado que ocorre no início da vida. Esse fenômeno foi denominado *de programação perinatal* e tem relações com os presentes achados.

Fêmeas tratadas pré-natalmente com o LPS, ao receberem o desafio mostram menores níveis deste hormônio com relação àquelas fêmeas não desafiadas demonstrando que houve uma sensibilização ou programação perinatal ligada à resposta destes animais. A diminuição de corticosterona sérica no grupo LLF corrobora com a aumentada liberação de IL-1 β observada no linfonodo desse grupo.

Segundo Pezeshki et al. (PEZESHKI et al., 1996) durante a inflamação o comportamento doentio e a síntese de IL-1 β são controladas pela corticosterona. Smyth et al. (SMYTH et al., 2004) demonstrou que macrófagos de ratos expostos anteriormente aos glicocorticóides produzidos em resposta a um estímulo imune gerado pela endotoxina LPS apresentaram aumento na secreção de citocinas inflamatórias num segundo desafio com a mesma endotoxina demonstrando o papel dos glicocorticóides na regulação tardia de macrófagos. Goujon et al. (GOUJON et al., 1995) observou o aumento da IL-1 β no cérebro de ratos adrenalectomizados depois de um desafio com LPS. É fato conhecido o papel imunossupressor dos hormônios glicocorticóides (CLARK, 2007; KAINUMA et al., 2009; ZIMMERMANN et al., 2009).

O aumento dos níveis de corticosterona no soro dos animais SLF corrobora com a reduzida liberação de IL-1 β no Infonodo observada neste grupo, concorda com a literatura no que se refere à imunossupressão e reafirma a programação perinatal sofrida pelas fêmeas do grupo LLF. Por outro lado, verifica-se que este fato não ocorreu em machos, o que confirma o dimorfismo sexual observado no comportamento.

Finalmente, comentando ainda os presentes resultados, existem poucos trabalhos sobre os efeitos sexualmente dimórficos do LPS administrado no período neonatal investigado à luz do comportamento. Em particular Tenk et al. (TENK et al., 2008), apresentam maior redução na locomoção que fêmeas. Como já comentado, é possível que os dados contrários obtidos neste e no trabalho de Tenk et al. (2008) sejam consequência do período e frequência de exposição neonatal. Por outro lado, não foram encontrados até o momento estudos que investiguem alterações na ansiedade e depressão como em nosso trabalho.

No início de 1980, as citocinas foram caracterizadas como moléculas de comunicação entre as células imunes e células endoteliais. O seu papel é fundamental na regulação da resposta imune e da coordenação da resposta do hospedeiro à infecção (OPAL; DEPALO, 2000).

Citocinas no SNC estão envolvidas em diferentes mecanismos de regulação: início da atividade imune no SNC durante um processo inflamatório; regulação da barreira hematoencefálica; desenvolvimento de mecanismos de reparo após a lesão; regulação do sistema endócrino no eixo HPA; diferentes influências estimuladoras e inibidoras de neurotransmissores dopaminérgicos, serotoninérgicos, noradrenérgicos e colinérgicos. (ANISMAN; MERALI, 2003) .

Ratas exibem maior sensibilidade comportamental ao LPS/citocinas que machos, observando-se inclusive alterações no comportamento sexual e na resposta de reforço ao açúcar. (AVITSUR; YIRMIYA, 1999; ANISMAN; MERALI, 2003). No entanto, experimentos *in vitro* relatam que macrófagos de machos desafiados com LPS produzem níveis mais altos de citocinas inflamatórias do que as células oriundas de fêmeas tratadas do mesmo modo (MARRIOTT et al., 2006), sugerindo que machos são mais susceptíveis a doenças produzidas por bactérias que fêmeas (ENGELAND et al., 2003). Ratas desenvolvem tolerância ao LPS administrado repetidamente de forma mais rápida que machos (ENGELAND et al., 2003), sendo esse fenômeno dependente do ciclo estral (ENGELAND et al., 2006).

Os presentes resultados mostram que a prole masculina de ratas exposta ao LPS respondeu de forma exacerbada ao desafio com LPS, evidenciado pelo aumento na celularidade do sangue e medula óssea, porém os níveis de 1L-1 β e TNFa foram diminuídos. Por outro lado, nos dois parâmetros celulares não foram observadas alterações nas fêmeas do mesmo grupo, embora os níveis de citocinas 1L-1 β e TNFa se apresentassem maiores.

Por outro lado, em machos os dados são instigantes. Esses animais quando tratados neonatalmente com LPS apresentam aumento na celularidade do sangue e medula óssea em relação a ratos não tratados neonatalmente e respostas no teste de natação forçada compatível com depressão.

Assim, neste trabalho, embora as fêmeas neonatalmente expostas ao LPS não tenham apresentado alterações na celularidade do sangue e medula óssea, observou-se que em relação à dosagem de citocinas no linfonodo, as fêmeas do grupo LLF secretaram mais IL-1 β que machos de mesmo tratamento e muito mais que fêmeas do grupo SLF; resultados similares foram vistos quando da dosagem de TNFa, porém sem significância estatística. Isso mostra que as células do linfonodo de fêmeas estão mais ativadas que machos, sugerindo que fêmeas do grupo LLF respondem mais rapidamente a injúria que machos dos grupos SFM e LLM e fêmeas do grupo SLF.

No baço não foram observadas alterações entre os grupos nos níveis de IL-1 β , porém, fêmeas do grupo LLF secretaram mais TNFa que fêmeas e machos dos grupos não tratados neonatalmente; no grupo LLM houve menor secreção de TNFa. Logo, é possível que a exposição neonatal aumente a resposta de TNFa na idade adulta, ou seja, também produz alteração na *programação perinatal*.

Verifica-se que no soro existe dimorfismo sexual nas secreções de IL-1 β e TNFa. O tratamento com LPS na idade adulta aumentou a secreção de IL-1 β em relação aos machos de grupo de mesmo tratamento. No soro não houve diferenças estatisticamente significantes entre todos os grupos.

Resultados de estudos anteriores constataram que a tolerância a ambos os efeitos fisiológicos e comportamentais ao LPS formam-se muito rapidamente, muitas vezes após uma única exposição (LANGHANS et al., 1991; ROTH et al., 1997; PORTER et al., 1998). Esse desenvolvimento da tolerância parece estar relacionado à prevenção de processos inflamatórios excessivos (ZIEGLER-HEITBROCK, 1995), e é mediada pela diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatória pelos macrófagos (KNOPF et al., 1994; ZEISBERGER; ROTH, 1998) e, em parte, por uma diminuição da capacidade de resposta para as citocinas por eles próprios (HE et al., 1992).

Chelvarajan et al. (CHELVARAJAN et al., 2004) mostraram, pela primeira vez, que macrófagos de ratos neonatais, apesar de presentes em números comparáveis com os dos adultos, são qualitativamente diferentes de macrófagos de adultos e apresentam falhas na secreção de uma variedade de citocinas. Em particular,

macrófagos de neonatos são falhos na secreção de IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNFa. O defeito na produção de algumas citocinas resulta da supressão de IL-10, cuja produção é elevada no recém-nascido. Essas falhas na produção de citocinas por macrófagos neonatais podem ainda estar relacionadas a defeitos na expressão dos *Toll-like Receptors* como o TLR-2, TLR-4 e CD14, os mediadores-chave da ativação dos macrófagos por bactérias fato que pode gerar uma determinada *programação perinatal*.

A susceptibilidade a infecções bacterianas comumente observada em neonatos, parece estar relacionada, principalmente como resultado de uma redução da secreção de citocinas como TNFa, IL-1 β , e IL-6, em comparação com animais adultos (CHRISTENSEN et al., 1991; SCHIBLER et al., 1992; LIECHTY et al., 1993; SCHIBLER et al., 1993). Sugerindo que o cérebro de neonatos é muito mais sensível a citocinas que o de adultos, pois mesmo com a deficiência característica desse período de desenvolvimento ocorrem sérias lesões no sistema nervoso de animais submetidos a infecções no período neonatal.

Stoll et al. (STOLL et al., 2002a) demonstraram em estudo que as infecções em prematuros predispõem a complicações severas como a leucomalácia periventricular e hemorragia severa intraventricular. Relataram que de 84 casos de sepse ocorridos em crianças prematuras 60,7% eram causadas por bactérias Gram-negativas e a *Escherichia coli* era responsável por 44% de todas as infecções.

Receptores de IL-1 β estão distribuídos por todo o cérebro, com maior densidade no hipocampo (SCHNEIDER et al., 1998). Por essa razão, o hipocampo é reconhecido por ser particularmente vulnerável a alterações relacionadas à ativação do sistema imune (LYNCH, A. M. et al., 2004; LYNCH, N. J. et al., 2004) e a ativação imune periférica por agentes como o LPS aumentam a proteína IL-1 β dentro do hipocampo (SCHOBITZ et al., 1994).

O hipocampo, suas projeções e estrutura final desenvolvem-se nas primeiras semanas pós-natal e são extremamente sensíveis a sinais neuroquímicos como citocinas ou hormônios nesse período (LOY; MILNER, 1983; MILNER et al., 1983; ROSKODEN et al., 2004).

Bilbo et al. (BILBO et al., 2005) relatam que a arquitetura básica astrogliar no hipocampo é alterada pela infecção neonatal por *E.coli*. Astrócitos fornecem suporte nutricional, estrutural e homeostático aos neurônios, e desempenham um papel fundamental na resposta do CNS a ferimentos ou infecções e é uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias (KOPNISKY et al., 1997). Astrócitos desempenham um papel importante na determinação do número e da conectividade das sinapses neuronais no CNS durante o desenvolvimento, particularmente durante a primeira semana pós-natal (ULLIAN et al., 2001).

Bilbo et al. (BILBO et al., 2005) ainda sugerem que astrócitos parecem ser mais sensíveis e reativos a estímulos inflamatórios em ratos tratados neonatalmente com *E. coli*, em comparação a ratos tratados com PBS. Infecções neonatais podem induzir mudanças de longo prazo, no estado de ativação de células gliais no cérebro, de tal forma que a resposta a um sinal inflamatório subsequente é alterada. Qualquer alteração na reatividade glial durante o período neonatal pode, então, ter consequências significativas para o curso e amplitude da produção de citocinas na idade adulta.

Pang et al. (PANG et al., 2003) descobriram que a injeção intracerebral de LPS em ratos neonatos induzia grande aumento das concentrações de IL-1 β e TNF α no cérebro e resultou em lesão seletiva da substância branca. Dados experimentais indicam que citocinas inflamatórias podem ser neurotóxicas *in vitro* e *in vivo* e podem aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica de prematuros (JEOHN et al., 1998; MALAEB; DAMMANN, 2009) .

Os efeitos protetores do receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra) e anticorpos anti TNF α em lesões cerebrais induzidas por hipóxia/isquemia forneceram evidências de que as citocinas inflamatórias têm um papel importante na mediação da lesão cerebral neonatal (BARONE et al., 1997; BARONE et al., 1998). Estudos *in vitro* mostram que a IL-1 β promove morte de oligodendrócitos através da excitotoxicidade do glutamato (TAKAHASHI et al., 2003). TNF α induz danos à barreira hematoencefálica *in vivo* (MEGYERI et al., 1992; ABRAHAM et al., 1996; MEGYERI et al., 1999) e causa a morte de oligodendrócitos *in vitro* (SELMAJ, K. W.; RAINE, 1988; SELMAJ, K. W. et al., 1990).

O TNFa também foi relatado por atenuar a neurotoxicidade induzida por N-metil-Daspartase (ALLEN, 1999), promover a proliferação de células progenitoras de oligodendrócitos e remielinização *in vivo* (ARNETT et al., 2001), e proteger os neurônios contra a toxicidade peptídico-amilóide *in vitro* (BARGER et al., 1995).

Cai et al. (CAI et al., 2004) demonstrou que a IL-1 β também pode induzir a morte por apoptose em células do cérebro de ratos recém-nascidos. Além disso, demonstraram que a IL-1 β causa diretamente prejuízo ao desenvolvimento de oligodendrócitos no cérebro de ratos recém-nascidos.

Leucócitos infiltrados e micróglia ativados foram propostos como contribuintes dos danos induzidos por hipóxia/isquemia e inflamação na substância branca em bebês extremamente prematuros (DAMMANN et al., 2003; DAMMANN; LEVITON, 2004). Essa hipótese é apoiada pela observação de que lesões mais graves estavam nos cérebros de ratos tratados com IL-1 β em comparação com os dos ratos tratados com TNFa (ALY et al., 2006).

Bilbo et al. (BILBO et al., 2005) observaram mudanças de astrócitos no cérebro em resposta a um desafio imune periférico e não observaram diferenças de citocinas ou níveis de endotoxina no soro, sugerindo que as mudanças induzidas neonatalmente foram específicas para o CNS e não foram simplesmente o resultado de uma alteração na depuração do LPS na periferia o que também pode ser a justificativa para o não aumento dos níveis de citocinas nas dosagens feitas no sangue, baço e linfonodos do presente trabalho.

Estudos histoquímicos revelaram que a IL-1, IL-6, e TNFa são expressos em neurônios e células gliais dentro do sistema nervoso central em condições não inflamatórias. Após a infecção ou trauma, as citocinas são expressas em quantidades muito maiores. Destacam-se para o entendimento da depressão maior que a aquela é acompanhada por uma ativação moderada do sistema de resposta inflamatória (ADLER et al., 2008; MISENER et al., 2008). Alguns estudos têm mostrado aumento da secreção de IL-6 e IL-8 e aumento da indução mitógena na produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6 e INF na depressão (BOB et al.; MAES, 1999; VAN WEST; MAES, 1999; BONACCORSO et al., 2001; MAES, 2001b; a; MAES et al., 2001; WICHERS, M.; MAES, 2002; BONACCORSO

et al., 2003; SCHIEPERS et al., 2005; WICHERS, M. C. et al., 2007; MAES, 2008) o que corrobora com os presentes resultados já que fêmeas apresentaram maior secreção das citocinas IL-1 β e TNFa e como proposto pela literatura, fêmeas apresentam uma tendência maior a depressão que machos.

Relevantes para esse ponto, foi demonstrado recentemente que camundongos deficientes em receptores de TNFa mostraram tempo de imobilidade reduzido no teste de natação forçada, confirmando o papel do TNFa nas respostas comportamentais da depressão (SIMEN et al., 2006). De fato, os machos do presente trabalho apresentaram menores dosagens de TNFa circulante e apresentaram tempo de imobilidade reduzido.

Diversos estudos de neuroimagem têm relatado uma diminuição dos núcleos da base em pacientes com depressão, sugerindo que anormalidades anatômicas e neurodegenerativas podem participar da patofisiologia da depressão (LACERDA et al., 2003).

Já é bem estabelecido também o dimorfismo sexual na resposta imune. Tanto a imunidade humoral e a mediada por células são mais ativas em fêmeas que em machos e estudos confirmam que hormônios gonadais desempenham um papel importante na regulação da função imune (NUNN et al., 2009; DE LEON-NAVA; MORALES-MONTOR, 2006).

O estradiol apresenta efeitos imunoestimulantes sobre a imunidade humoral e efeitos imunossupressores sobre imunidade celular, enquanto a testosterona demonstra efeitos imunossupressores sobre a proliferação das células B e T e na ativação de macrófagos em ratos e camundongos (GIGLIO et al., 1994; WICHMANN et al., 1997). Leon-Nava e Morales-Montor (DE LEON-NAVA; MORALES-MONTOR, 2006) relatam um achado interessante em seus estudos, havia dimorfismo sexual apenas no percentual de macrófagos, e estavam presentes no sexo masculino em número quase três vezes superior em relação as fêmeas. Os dados desse estudo assemelham-se aos achados no presente trabalho no que se refere a dosagem sanguínea de células mononucleares em machos do grupo LLM em relação a fêmeas SLF e LLF.

Receptores de estrógeno foram detectados não somente no clássico tecido reprodutivo, mas também em populações de células imunes, incluindo linfócitos, monócitos e macrófagos (DANEL et al., 1981) e até mesmo dentro da glia, micróglia e astrócitos (BEYER et al., 2002; BEYER et al., 2003). Em conjunto, essas observações sugerem que o estrógeno pode afetar diretamente a função celular, incluindo a expressão de genes de citocinas (CZLONKOWSKA et al., 2005).

Esse fato explicaria a maior produção de citocinas nas fêmeas do presente trabalho, embora na avaliação da imunidade celular não se tenha observado modificações. O estrógeno não conseguiu diminuir a produção de IL-1 β e TNFa nos experimentos deste estudo, pois as fêmeas estavam em pró-estro e estro, quando se tem maior concentração de estrógeno circulante.

O 17 β -estradiol é o principal estrógeno circulante nas fêmeas e estudos têm demonstrado que a função cardiovascular e imunológica de roedoras fêmeas é preservada quando estão em fase de pró-estro, após trauma e insulto hemorrágico (ANGELE et al., 1999; JARRAR et al., 2000; KNOFERL et al., 2000; ANGELE et al., 2001; SAMY et al., 2001; KNOFERL et al., 2002). O estrógeno controla ainda a diferenciação e plasticidade das distintas populações neuronais no cérebro em desenvolvimento, aumenta a neurogênese, modula a sinaptogênese e influencia a proliferação axonal (PICAZO et al.; GARCIA-SEGURA et al., 1999). O estrógeno também regula a atividade dos neurotransmissores dentro de diversas populações neuronais (SUMNER; FINK, 1993; FINK et al., 1996; SUMNER et al., 2007). Junto ao efeito de reforço do estrógeno sobre a imunidade mediada por células, foi demonstrada que o mesmo reduz a quimiotaxia de neutrófilos (MIYAGI et al., 1992) o que pode justificar a não alteração de leucócitos polimorfonucleares nas fêmeas deste trabalho, já que os neutrófilos não migraram da circulação.

Assim, pode-se sugerir que embora a quimiotaxia das fêmeas não esteja alterada, essas células estariam mais ativadas. Pode-se pensar sobre o fato de tanto a IL-1 β como o TNFa inibirem a síntese de hormônios sexuais (CANNON et al., 1998). Como o estrógeno pode ser inibido pela IL-1 β , bastante aumentada nas fêmeas do presente trabalho, a diminuição da síntese do hormônio feminino pode determinar também a diminuição de um possível efeito protetor, o que promove o aumento do comportamento doentio e a maior liberação de IL-1 β explicado por um

mecanismo de *feedback*. Neste trabalho, no período neonatal, quando as fêmeas foram sensibilizadas, não havia a interferência hormonal, porém no desafio na idade adulta todas estavam sob o efeito do estrógeno (pró-estro e estro). Esse fato pode também justificar os resultados nos níveis de corticosterona em fêmeas deste estudo.

Contrariamente, evidências têm indicado que o estrógeno diminui a produção de TNF α , IL-1 β e IL-6 em diversas linhagens celulares. Os hormônios sexuais inibem a produção e/ou liberação de TNF α em monócitos periféricos derivados da medula óssea (BERNARD-POENARU et al., 2001). As proteínas e os níveis de RNA mensageiro para essas citocinas pró-inflamatórias aumentam após a menopausa natural ou cirúrgica e diminuem com a reposição de estrógeno. No entanto, a capacidade do estrógeno em reprimir a indução de genes de citocinas pode variar conforme o tecido (DESWAL et al., 2001).

Em contrapartida, a testosterona exerce efeitos imunossupressores sobre as funções imunológicas (ANGELE et al., 1997; ANGELE et al., 1998; ANGELE et al., 2000). O LPS tem um impacto inibidor nos níveis de esteróides masculinos. Essa inibição é mediada pela produção de IL-1 β e TNF α são responsáveis pela redução das concentrações plasmáticas de testosterona circulante em ratos (CANNON et al., 1998). No presente caso, ocorreu aumento na celularidade sem ativação dessas células, pois os níveis de citocinas não estavam alterados.

Em relação aos machos, a IL-1 β , que não está aumentada neste experimento, não inibiu a produção de testosterona e, assim, permitiu que o hormônio desempenhasse seu papel anti-inflamatório. A testosterona parece não interferir na proliferação celular, já que machos do grupo SLM apresentam maior celularidade que fêmeas do grupo SLF. Pode-se pensar então, na ação desse hormônio na ativação dessas células, pois, apesar do aumento na celularidade do sangue e da medula óssea os níveis de citocinas não foram alterados. Neste mesmo sentido podemos pensar na possibilidade do estrógeno não estar sendo inibido pela IL-1 β mas sim, promovendo um efeito pró inflamatório, já que as fêmeas do grupo SLM não apresentaram aumento da celularidade, mas demonstraram ativação celular com altas taxas de produção de citocinas, principalmente IL-1 β .

Uma explicação para os dados conflitantes nos resultados dos machos no presente trabalho, poderia ser explicado por problemas temporais na avaliação dos níveis das citocinas. Assim, o fato de machos do grupo LLM não demonstrarem alterações significativas nas dosagens de IL-1 β e TNFa pode estar relacionado ao momento em que a dosagem dessas citocinas foi feita, ou seja, duas horas após o desafio, o que pode não refletir o pico de suas secreções. Dosagens de citocinas na 4^o, 6^o e 12^o horas pós-desafio poderiam constatar o aumento dessas citocinas. Nesse sentido, machos parecem apresentar uma resposta mais lenta a injúria e fêmeas uma resposta mais rápida, pois ratas deste experimento apresentaram altas taxas de liberação de citocinas já na 2^o hora pós-desafio.

Além disso, Walker et al. (WALKER et al., 2004a; WALKER et al., 2004b) relataram que ratos adultos tratados com LPS prenatalmente exibem atraso significativo no pico de IL-1 β em resposta ao LPS na idade adulta, em comparação aos ratos controle o que justifica estes resultados.

Outra possível explicação é o dimorfismo sexual, influenciando a sinalização estimulada por LPS. Pode-se especular que moléculas de LPS da via sinalizadora, como a LBP, MD-2, CD14, Toll-like Receptor 4, resposta de diferenciação primária do gene 88 ou do receptor de IL-1 associados à quinase podem ser influenciadas por hormônios sexualmente dimórficos, ou estes hormônios influenciem fatores de estabilidade do RNA mensageiro das citocinas. Entretanto, outras explicações poderiam estar nas vias de sinalização das citocinas (MARRIOTT et al., 2006).

O comportamento doentio é mediado centralmente. Como receptores específicos para citocinas como a IL-1 β e o TNFa existem em todo o cérebro e a administração periférica de IL-1 β ou TNFa induz a expressão central destas citocinas (HOPKINS; ROTHWELL, 1995; ROTHWELL; HOPKINS, 1995; LUHESHI et al., 1997), que, por sua vez, podem alterar tanto a atividade neural como a comportamental (DANTZER, 2001a; HOPKINS, 1995) Assim, o comportamento doentio esta diretamente relacionado aos níveis de citocinas inflamatórias.

Presentemente, as fêmeas tratadas neonatalmente com LPS mostraram maiores níveis de citocinas que machos e, paralelamente, maior comportamento doentio que os mesmos. Por outro lado, não se observou alteração na celularidade

sangue-medula óssea, mas estas ratas apresentaram maiores níveis de corticosterona que fêmeas não tratadas neonatalmente. Esse conjunto de respostas das fêmeas seria uma estratégia comportamental para evitar a transmissão de doenças a sua prole e sua comunidade (AVITSUR et al., 1997a; AVITSUR et al., 1997b; AVITSUR; YIRMIYA, 1999). O “*imprinting*” neonatal com LPS facilitou esta estratégia.

Ao contrário, os machos não apresentaram alterações nos níveis de citocinas, porém apresentaram maior proliferação celular, o que não leva ao comportamento doentio. É fato conhecido que entre machos a competição para acasalar bem como para manter a hierarquia social é grande e a expressão do comportamento doentio levaria o animal à inferioridade dentro do seu grupo (YIRMIYA et al., 1995; AVITSUR; YIRMIYA, 1999).

A exposição neonatal ao LPS não promoveu comportamento doentio nesses animais frente ao desafio na idade adulta o que concorda com o acima proposto, porém, levou esses animais à redução da depressão no modelo de natação forçada, o que contribui para a estratégia de defesa dentro do grupo, embora esteja sob a ação da endotoxina (AVITSUR et al., 1995).

Finalmente, desde que estudos sobre os efeitos da ativação no período perinatal relacionados ao dimorfismo sexual são raros ainda, e podem ter implicações clínicas, esses resultados poderão contribuir para a etiologia de doenças ligadas ao sexo.

CONCLUSÃO

Os presentes resultados permitem concluir que:

1) A exposição neonatal no 2º dia de vida da prole feminina e masculina de ratas à solução salina e que receberam o desafio com LPS na idade adulta:

- Não alterou o dimorfismo sexual no modelo do campo aberto, pois as fêmeas apresentaram maiores freqüências de locomoção e levantar que machos, embora sem significância estatística. No entanto, o tratamento neonatal reduziu a imobilidade de fêmeas em relação aos machos do mesmo grupo.
- No labirinto em cruz elevado verificou-se nestes animais aumento na entrada nos braços fechados e no tempo de centro das fêmeas em relação aos machos do mesmo grupo.

- No teste de natação forçada notou-se que neste grupo as fêmeas flutuaram menos que machos do mesmo grupo.
- No número de leucócitos circulantes no sangue verificou-se não houve alterações entre o número de células de fêmeas e machos do mesmo grupo;
- No número total de células da medula óssea verificou-se redução significativa em fêmeas com relação aos machos do mesmo grupo;
- Nos níveis de IL-1 β e TNF α do soro, baço e linfonodo e nos níveis de corticosterona plasmática não foram observadas diferenças entre fêmeas e machos do mesmo grupo.

Estes resultados permitem sugerir que fêmeas expostas somente na idade adulta ao LPS apresentaram maior atividade motora que machos e menores sinais *depressão-like* no modelo de natação forçada. Com relação aos parâmetros imunes notou-se que houve redução da celularidade da medula de fêmeas em relação a machos do mesmo grupo. Os demais parâmetros imunes não foram modificados bem como os níveis de corticosterona plasmática que expressam alterações ligadas ao estresse.

2) A exposição neonatal no 2^o dia de vida da prole feminina e masculina de ratas à endotoxina LPS e que receberam o desafio com a mesma endotoxina na idade adulta:

- Alterou o dimorfismo sexual no modelo do campo aberto, pois as fêmeas não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos machos do mesmo grupo. No entanto, o tratamento neonatal associado ao desafio com LPS aumentou a imobilidade de fêmeas em relação aos machos do mesmo grupo.
- No labirinto em cruz elevado houve preservação do dimorfismo sexual, porém verifica-se que fêmeas apresentaram menor atividade neste modelo que machos. Por outro lado, os ratos machos apresentaram redução nas entradas do braço fechado e no tempo de centro.

- No teste de natação forçada machos desafiados com a endotoxina apresentaram menor tempo de flutuar sugerindo menores sinais de depressão que as fêmeas. Neste teste o dimorfismo sexual foi preservado;
- No número de leucócitos circulantes no sangue verificou-se houve aumento no número de células de machos desafiados em relação a fêmeas do mesmo grupo e dos demais grupos;
- No número total de células da medula óssea verificou-se aumento significativo em machos desafiados com a endotoxina em relação aos demais grupos;
- Nos níveis de IL-1 β do soro houve redução nos machos desafiados com a endotoxina não havendo diferença significativa no baço e linfonodo e nos níveis de corticosterona plasmática. Por outro lado, nestes animais não se observou diferenças significantes nos níveis de TNFa do soro, baço e linfonodo em relação ao próprio grupo controle e às fêmeas dos dois grupos. Com relação á corticosterona não se verificou alterações nestes níveis.
- Nas fêmeas desafiadas com o LPS não se observou alterações nos níveis das citocinas no soro. No baço nota-se aumento nos níveis de TNFa e de IL-1 β no linfonodo. Nestas fêmeas desafiadas com o LPS verificou-se redução nos níveis de corticosterona plasmática em relação ao seu respectivo grupo controle.

Estes resultados sugerem que a exposição neonatal ao LPS associada na idade adulta a um desafio com a mesma endotoxina produz maior comportamento doentio em fêmeas e aumento dos níveis de citocinas no linfonodo, porém não se observaram alterações nos demais tecidos. Por outro lado, estas fêmeas apresentaram menores níveis de corticosterona plasmática que seu controle fêmea.

Portanto, pode-se concluir que a exposição neonatal ao LPS promove alterações comportamentais, imunes e bioquímicas que são sexualmente dimórficas na idade adulta. Por outro lado, estes animais quando expostos á uma segunda

infecção experimental pela endotoxina apresentam sensibilização ou alteração na programação perinatal ligada à resposta ao LPS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, O.; YAMASUE, H.; KASAI, K.; YAMADA, H.; AOKI, S.; INOUE, H.; TAKEI, K.; SUGA, M.; MATSUO, K.; KATO, T.; MASUTANI, Y.; OHTOMO, K. Voxel-based analyses of gray/white matter volume and diffusion tensor data in major depression. **Psychiatry Research**, v. 181, n. 1, p. 64-70.

ABRAHAM, C. S.; DELI, M. A.; JOO, F.; MEGYERI, P.; TORPIER, G. Intracarotid tumor necrosis factor-alpha administration increases the blood-brain barrier permeability in cerebral cortex of the newborn pig: quantitative aspects of double-labelling studies and confocal laser scanning analysis. **Neuroscience Letters**, v. 208, n. 2, p. 85-88, 1996.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.

ADLER, U. C.; MARQUES, A. H.; CALIL, H. M. Inflammatory aspects of depression. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 7, n. 1, p. 19-23, 2008.

AGUIAR, M. S.; BRANDAO, M. L. Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the plus-maze test. **Physiology & Behavior**, v. 60, n. 4, p. 1183-1186, 1996.

AIURA, K.; CLARK, B. D.; DINARELLO, C. A.; MARGOLIS, N. H.; KAPLANSKI, G.; BURKE, J. F.; TOMPKINS, R. G.; GELFAND, J. A. Interaction with autologous platelets multiplies interleukin-1 and tumor necrosis factor production in mononuclear cells. **Journal of Infectious Diseases**, v. 175, n. 1, p. 123-129, 1997.

ALEMAN, A.; KAHN, R. S.; SELTEN, J. P. Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. **Archives of General Psychiatry**, v. 60, n. 6, p. 565-571, 2003.

ALLAN, S. M.; ROTHWELL, N. J. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 10, p. 734-744, 2001.

ALLAN, S. M.; TYRRELL, P. J.; ROTHWELL, N. J. Interleukin-1 and neuronal injury. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 8, p. 629-640, 2005.

ALLEN, R. D. Polymorphism of the human TNF-alpha promoter--random variation or functional diversity? **Molecular Immunology**, v. 36, n. 15-16, p. 1017-1027, 1999.

ALY, H.; KHASHABA, M. T.; EL-AYOUTY, M.; EL-SAYED, O.; HASANEIN, B. M. IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha and outcomes of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. **Brain & Development**, v. 28, n. 3, p. 178-182, 2006.

ANDERSEN, G. Post-stroke depression: Diagnosis and incidence. **European Psychiatry**, v. 12 Suppl 3, n., p. 255s-260s, 1997.

ANGELE, M. K.; AYALA, A.; MONFILS, B. A.; CIOFFI, W. G.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Testosterone and/or low estradiol: normally required but harmful immunologically for males after trauma-hemorrhage. **J Trauma**, v. 44, n. 1, p. 78-85, 1998.

ANGELE, M. K.; KNOFERL, M. W.; AYALA, A.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Testosterone and estrogen differently effect Th1 and Th2 cytokine release following trauma-haemorrhage. **Cytokine**, v. 16, n. 1, p. 22-30, 2001.

ANGELE, M. K.; KNOFERL, M. W.; SCHWACHA, M. G.; AYALA, A.; CIOFFI, W. G.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Sex steroids regulate pro- and anti-inflammatory cytokine release by macrophages after trauma-hemorrhage. **American Journal of Physiology**, v. 277, n. 1 Pt 1, p. C35-42, 1999.

ANGELE, M. K.; SCHWACHA, M. G.; AYALA, A.; CHAUDRY, I. H. Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock. **Shock**, v. 14, n. 2, p. 81-90, 2000.

ANGELE, M. K.; WICHMANN, M. W.; AYALA, A.; CIOFFI, W. G.; CHAUDRY, I. H. Testosterone receptor blockade after hemorrhage in males. Restoration of the depressed immune functions and improved survival following subsequent sepsis. **Arch Surg**, v. 132, n. 11, p. 1207-1214, 1997.

ANISMAN, H. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 34, n. 1, p. 4-20, 2009.

ANISMAN, H.; MERALI, Z. Cytokines, stress and depressive illness: brain-immune interactions. **Annals of Medicine**, v. 35, n. 1, p. 2-11, 2003.

ARNETT, H. A.; MASON, J.; MARINO, M.; SUZUKI, K.; MATSUSHIMA, G. K.; TING, J. P. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. **Nature Neuroscience**, v. 4, n. 11, p. 1116-1122, 2001.

ASTON-JONES, G.; RAJKOWSKI, J.; KUBIAK, P.; VALENTINO, R. J.; SHIPLEY, M. T. Role of the locus coeruleus in emotional activation. **Progress in Brain Research**, v. 107, n., p. 379-402, 1996.

AVITSUR, R.; COHEN, E.; YIRMIYA, R. Effects of interleukin-1 on sexual attractiveness in a model of sickness behavior. **Physiology & Behavior**, v. 63, n. 1, p. 25-30, 1997a.

AVITSUR, R.; DONCHIN, O.; BARAK, O.; COHEN, E.; YIRMIYA, R. Behavioral effects of interleukin-1 beta: modulation by gender, estrus cycle, and progesterone. **Brain Behavior and Immunity**, v. 9, n. 3, p. 234-241, 1995.

AVITSUR, R.; POLLAK, Y.; YIRMIYA, R. Different receptor mechanisms mediate the effects of endotoxin and interleukin-1 on female sexual behavior. **Brain Research**, v. 773, n. 1-2, p. 149-161, 1997b.

AVITSUR, R.; YIRMIYA, R. The immunobiology of sexual behavior: gender differences in the suppression of sexual activity during illness. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 64, n. 4, p. 787-796, 1999.

BARGER, S. W.; HORSTER, D.; FURUKAWA, K.; GOODMAN, Y.; KRIEGLSTEIN, J.; MATTSON, M. P. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 20, p. 9328-9332, 1995.

BARNA, B. P.; ESTES, M. L.; JACOBS, B. S.; HUDSON, S.; RANSOHOFF, R. M. Human astrocytes proliferate in response to tumor necrosis factor alpha. **Journal of Neuroimmunology**, v. 30, n. 2-3, p. 239-243, 1990.

BARONE, F. C.; ARVIN, B.; WHITE, R. F.; MILLER, A.; WEBB, C. L.; WILLETTE, R. N.; LYSKO, P. G.; FEUERSTEIN, G. Z. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. **Stroke**, v. 28, n. 6, p. 1233-1244, 1997.

BARONE, F. C.; WHITE, R. F.; SPERA, P. A.; ELLISON, J.; CURRIE, R. W.; WANG, X.; FEUERSTEIN, G. Z. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1

receptor antagonist and early gene expression. **Stroke**, v. 29, n. 9, p. 1937-1950; discussion 1950-1931, 1998.

BASSO, A. S.; PINTO, F. A.; RUSSO, M.; BRITTO, L. R.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 140, n. 1-2, p. 69-77, 2003.

BEHAN, D. P.; GRIGORIADIS, D. E.; LOVENBERG, T.; CHALMERS, D.; HEINRICHS, S.; LIAW, C.; DE SOUZA, E. B. Neurobiology of corticotropin releasing factor (CRF) receptors and CRF-binding protein: implications for the treatment of CNS disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 1, n. 4, p. 265-277, 1996.

BENVENISTE, E. N. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. **American Journal of Physiology**, v. 263, n. 1 Pt 1, p. C1-16, 1992.

BERNARD-POENARU, O.; ROUX, C.; BLANQUE, R.; GARDNER, C.; DE VEMEJOU, M. C.; COHEN-SOLAL, M. E. Bone-resorbing cytokines from peripheral blood mononuclear cells after hormone replacement therapy: a longitudinal study. **Osteoporos Int**, v. 12, n. 9, p. 769-776, 2001.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: H. S. Spinosa, S. L. Górnjak, *et al* (Ed.). **Book title**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p.807-816

BERRIOS, G. E. Melancholia and depression during the 19th century: a conceptual history. **British Journal of Psychiatry**, v. 153, n., p. 298-304, 1988.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 137-151, 2006.

BEUTLER, B. TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 270, n., p. 109-120, 2002.

BEUTLER, B.; RIETSCHEL, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 169-176, 2003.

BEYER, C.; IVANOVA, T.; KAROLCZAK, M.; KUPPERS, E. Cell type-specificity of nonclassical estrogen signaling in the developing midbrain. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 81, n. 4-5, p. 319-325, 2002.

BEYER, C.; PAWLAK, J.; KAROLCZAK, M. Membrane receptors for oestrogen in the brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 87, n. 3, p. 545-550, 2003.

BIANCHI, M.; MOSER, C.; LAZZARINI, C.; VECCHIATO, E.; CRESPI, F. Forced swimming test and fluoxetine treatment: in vivo evidence that peripheral 5-HT in rat platelet-rich plasma mirrors cerebral extracellular 5-HT levels, whilst 5-HT in isolated platelets mirrors neuronal 5-HT changes. **Experimental Brain Research**, v. 143, n. 2, p. 191-197, 2002.

BILBO, S. D.; LEVKOFF, L. H.; MAHONEY, J. H.; WATKINS, L. R.; RUDY, J. W.; MAIER, S. F. Neonatal infection induces memory impairments following an immune challenge in adulthood. **Behavioral Neuroscience**, v. 119, n. 1, p. 293-301, 2005.

BILBO, S. D.; RUDY, J. W.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. A behavioural characterization of neonatal infection-facilitated memory impairment in adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 169, n. 1, p. 39-47, 2006.

BJARTMAR, C. Oligodendroglial sheath lengths in developing rat ventral funiculus and corpus callosum. **Neuroscience Letters**, v. 216, n. 2, p. 85-88, 1996.

BJARTMAR, C.; HILDEBRAND, C.; LOINDER, K. Morphological heterogeneity of rat oligodendrocytes: electron microscopic studies on serial sections. **Glia**, v. 11, n. 3, p. 235-244, 1994.

BJARTMAR, C.; TRAPP, B. D. Axonal degeneration and progressive neurologic disability in multiple sclerosis. **Neurotox Res**, v. 5, n. 1-2, p. 157-164, 2003.

BLALOCK, J. E. The immune system as a sensory organ. **Journal of Immunology**, v. 132, n. 3, p. 1067-1070, 1984.

BOB, P.; RABOCH, J.; MAES, M.; SUSTA, M.; PAVLAT, J.; JASOVA, D.; VEVERA, J.; UHROVA, J.; BENAKOVA, H.; ZIMA, T. Depression, traumatic stress and interleukin-6. **Journal of Affective Disorders**, v. 120, n. 1-3, p. 231-234.

BOISSE, L.; MOUIHATE, A.; ELLIS, S.; PITTMAN, Q. J. Long-term alterations in neuroimmune responses after neonatal exposure to lipopolysaccharide. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 21, p. 4928-4934, 2004.

BONACCORSO, S.; MAIER, S. F.; MELTZER, H. Y.; MAES, M. Behavioral changes in rats after acute, chronic and repeated administration of interleukin-1beta: relevance for affective disorders. **Journal of Affective Disorders**, v. 77, n. 2, p. 143-148, 2003.

BONACCORSO, S.; PUZELLA, A.; MARINO, V.; PASQUINI, M.; BIONDI, M.; ARTINI, M.; ALMERIGHI, C.; LEVRERO, M.; EGYED, B.; BOSMANS, E.; MELTZER, H. Y.; MAES, M. Immunotherapy with interferon-alpha in patients affected by chronic hepatitis C induces an intercorrelated stimulation of the cytokine network and an increase in depressive and anxiety symptoms. **Psychiatry Research**, v. 105, n. 1-2, p. 45-55, 2001.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease. **Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology**, v. 201, n., p. 1-119, 2009.

BROADHURST, P. L. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. **Fortschr Psychosom Med**, v. 1, n., p. 63-69, 1960.

BRODY, A. L.; BARSOM, M. W.; BOTA, R. G.; SAXENA, S. Prefrontal-subcortical and limbic circuit mediation of major depressive disorder. **Semin Clin Neuropsychiatry**, v. 6, n. 2, p. 102-112, 2001.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Estrutura celular. In: G. F. Brooks, J. S. Butel, *et al* (Ed.). **Book title**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p.6-30

BROWN, A. S.; BEGG, M. D.; GRAVENSTEIN, S.; SCHAEFER, C. A.; WYATT, R. J.; BRESNAHAN, M.; BABULAS, V. P.; SUSSER, E. S. Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. **Archives of General Psychiatry**, v. 61, n. 8, p. 774-780, 2004a.

BROWN, A. S.; HOOTON, J.; SCHAEFER, C. A.; ZHANG, H.; PETKOVA, E.; BABULAS, V.; PERRIN, M.; GORMAN, J. M.; SUSSER, E. S. Elevated maternal interleukin-8 levels and risk of schizophrenia in adult offspring. **American Journal of Psychiatry**, v. 161, n. 5, p. 889-895, 2004b.

CAI, Z.; LIN, S.; PANG, Y.; RHODES, P. G. Brain injury induced by intracerebral injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in the neonatal rat. **Pediatric Research**, v. 56, n. 3, p. 377-384, 2004.

CANNON, J. G.; ANGEL, J. B.; ABAD, L. W.; O'GRADY, J.; LUNDGREN, N.; FAGIOLI, L.; KOMAROFF, A. L. Hormonal influences on stress-induced neutrophil mobilization in health and chronic fatigue syndrome. **Journal of Clinical Immunology**, v. 18, n. 4, p. 291-298, 1998.

CAROBREZ, A. P.; SCHENBERG, L. C.; GRAEFF, F. G. Neuroeffector mechanisms of the defense reaction in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 31, n. 4, p. 439-444, 1983.

CAROLA, V.; D'OLIMPIO, F.; BRUNAMONTI, E.; MANGIA, F.; RENZI, P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural Brain Research**, v. 134, n. 1-2, p. 49-57, 2002.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, n., p. 259-284, 2005.

CHELVARAJAN, R. L.; COLLINS, S. M.; DOUBINSKAIA, I. E.; GOES, S.; VAN WILLIGEN, J.; FLANAGAN, D.; DE VILLIERS, W. J.; BRYSON, J. S.; BONDADA, S. Defective macrophage function in neonates and its impact on unresponsiveness of neonates to polysaccharide antigens. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 6, p. 982-994, 2004.

CHOI, B. G.; MCLAUGHLIN, M. A. Why men's hearts break: cardiovascular effects of sex steroids. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 36, n. 2, p. 365-377, 2007.

CHRISTEFF, N.; AUCLAIR, M. C.; THOBIE, N.; FERTIL, B.; CARLI, A.; NUNEZ, E. A. Effect of estradiol on endotoxin-induced changes in steroid hormone levels and lethality in male rats. **Circ Shock**, v. 44, n. 3, p. 154-159, 1994.

CHRISTENSEN, R. D.; LIECHTY, K. W.; KOENIG, J. M.; SCHIBLER, K. R.; OHLS, R. K. Administration of erythropoietin to newborn rats results in diminished neutrophil production. **Blood**, v. 78, n. 5, p. 1241-1246, 1991.

CLAES, S. Glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1179, n., p. 216-228, 2009.

CLARK, A. R. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 275, n. 1-2, p. 79-97, 2007.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885-891, 2002.

COSTA-PINTO, F. A.; BASSO, A. S.; BRITTO, L. R.; MALUCELLI, B. E.; RUSSO, M. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. **Brain Behavior and Immunity**, v. 19, n. 1, p. 52-60, 2005.

COUNSELL, S. J.; EDWARDS, A. D.; CHEW, A. T.; ANJARI, M.; DYET, L. E.; SRINIVASAN, L.; BOARDMAN, J. P.; ALLSOP, J. M.; HAJNAL, J. V.; RUTHERFORD, M. A.; COWAN, F. M. Specific relations between neurodevelopmental abilities and white matter microstructure in children born preterm. **Brain**, v. 131, n. Pt 12, p. 3201-3208, 2008.

CZLONKOWSKA, A.; CIESIELSKA, A.; GROMADZKA, G.; KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, I. Estrogen and cytokines production - the possible cause of gender differences in neurological diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 8, p. 1017-1030, 2005.

DA SILVA, N. L.; FERREIRA, V. M.; CAROBREZ ADE, P.; MORATO, G. S. Individual housing from rearing modifies the performance of young rats on the elevated plus-maze apparatus. **Physiology & Behavior**, v. 60, n. 6, p. 1391-1396, 1996.

DAMMANN, O.; ALLRED, E. N.; GENEST, D. R.; KUNDSIN, R. B.; LEVITON, A. Antenatal mycoplasma infection, the fetal inflammatory response and cerebral white matter damage in very-low-birthweight infants. **Paediatr Perinat Epidemiol**, v. 17, n. 1, p. 49-57, 2003.

DAMMANN, O.; LEVITON, A. Inflammatory brain damage in preterm newborns--dry numbers, wet lab, and causal inferences. **Early Human Development**, v. 79, n. 1, p. 1-15, 2004.

DAMSA, C.; KOSEL, M.; MOUSSALLY, J. Current status of brain imaging in anxiety disorders. **Curr Opin Psychiatry**, v. 22, n. 1, p. 96-110, 2009.

DANEL, L.; MARTIN, P.; ESCRICH, E.; TUBIANA, N.; FIERE, D.; SAEZ, S. Androgen, estrogen and progestin binding sites in human leukemic cells. **International Journal of Cancer**, v. 27, n. 6, p. 733-741, 1981.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 933, n., p. 222-234, 2001a.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? **Brain Behavior and Immunity**, v. 15, n. 1, p. 7-24, 2001b.

DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. **Brain Behavior and Immunity**, v. 21, n. 2, p. 153-160, 2007a.

DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. **Brain Behavior and Immunity**, v. 21, n. 2, p. 153-160, 2007b.

DE LEON-NAVA, M. A.; MORALES-MONTOR, J. [Immune sexual dimorphism: can sex steroids affect the Th1/Th2 cytokine profile?]. **Rev Invest Clin**, v. 58, n. 2, p. 161-169, 2006.

DEKEYSER, F. G.; LEKER, R. R.; WEIDENFELD, J. Activation of the adrenocortical axis by surgical stress: involvement of central norepinephrine and interleukin-1. **Neuroimmunomodulation**, v. 7, n. 4, p. 182-188, 2000.

DESWAL, A.; PETERSEN, N. J.; FELDMAN, A. M.; YOUNG, J. B.; WHITE, B. G.; MANN, D. L. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). **Circulation**, v. 103, n. 16, p. 2055-2059, 2001.

DIMATTEO, M. R.; LEPPER, H. S.; CROGHAN, T. W. Depression is a risk factor for noncompliance with medical treatment: meta-analysis of the effects of anxiety and depression on patient adherence. **Archives of Internal Medicine**, v. 160, n. 14, p. 2101-2107, 2000.

DREVETS, W. C.; PRICE, J. L.; FUREY, M. L. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. **Brain Struct Funct**, v. 213, n. 1-2, p. 93-118, 2008.

DROSSOPOULOU, G.; ANTONIOU, K.; KITRAKI, E.; PAPATHANASIOU, G.; PAPALEXI, E.; DALLA, C.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats. **Neuroscience**, v. 126, n. 4, p. 849-857, 2004.

DUGOVIC, C.; MACCARI, S.; WEIBEL, L.; TUREK, F. W.; VAN REETH, O. High corticosterone levels in prenatally stressed rats predict persistent paradoxical sleep alterations. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 19, p. 8656-8664, 1999.

DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H.; DE BEAUREPAIRE, R. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 891-909, 2005.

DYET, L. E.; KENNEA, N.; COUNSELL, S. J.; MAALOUF, E. F.; AJAYI-OBE, M.; DUGGAN, P. J.; HARRISON, M.; ALLSOP, J. M.; HAJNAL, J.; HERLIHY, A. H.; EDWARDS, B.; LAROCHE, S.; COWAN, F. M.; RUTHERFORD, M. A.; EDWARDS,

A. D. Natural history of brain lesions in extremely preterm infants studied with serial magnetic resonance imaging from birth and neurodevelopmental assessment. **Pediatrics**, v. 118, n. 2, p. 536-548, 2006.

ELLEGREN, H.; PARSCH, J. The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 9, p. 689-698, 2007.

ELLIS, S.; MOUIHATE, A.; PITTMAN, Q. J. Early life immune challenge alters innate immune responses to lipopolysaccharide: implications for host defense as adults. **FASEB Journal**, v. 19, n. 11, p. 1519-1521, 2005.

ENGELAND, C. G.; KAVALIERS, M.; OSSENKOPP, K. P. Sex differences in the effects of muramyl dipeptide and lipopolysaccharide on locomotor activity and the development of behavioral tolerance in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 74, n. 2, p. 433-447, 2003.

ENGELAND, C. G.; KAVALIERS, M.; OSSENKOPP, K. P. Influence of the estrous cycle on tolerance development to LPS-induced sickness behaviors in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 31, n. 4, p. 510-525, 2006.

FATEMI, S. H.; PEARCE, D. A.; BROOKS, A. I.; SIDWELL, R. W. Prenatal viral infection in mouse causes differential expression of genes in brains of mouse progeny: a potential animal model for schizophrenia and autism. **Synapse**, v. 57, n. 2, p. 91-99, 2005.

FAW, B. Pre-frontal executive committee for perception, working memory, attention, long-term memory, motor control, and thinking: a tutorial review. **Conscious Cogn**, v. 12, n. 1, p. 83-139, 2003.

FENTON, M. J.; GOLENBOCK, D. T. LPS-binding proteins and receptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, n. 1, p. 25-32, 1998.

FINK, G.; SUMNER, B. E.; ROSIE, R.; GRACE, O.; QUINN, J. P. Estrogen control of central neurotransmission: effect on mood, mental state, and memory. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 16, n. 3, p. 325-344, 1996.

FLINT, J. The genetic basis of neuroticism. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 307-316, 2004.

FRUSSA-FILHO, R.; OTOBONI, J. R.; UEMA, F. T.; SA-ROCHA, L. C. Evaluation of memory and anxiety in rats observed in the elevated plus-maze: effects of age and isolation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 7, p. 725-728, 1991.

FUKUHARA, K.; KVETNANSKY, R.; CIZZA, G.; PACAK, K.; OHARA, H.; GOLDSTEIN, D. S.; KOPIN, I. J. Interrelations between sympathoadrenal system and hypothalamo-pituitary-adrenocortical/thyroid systems in rats exposed to cold stress. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 8, n. 7, p. 533-541, 1996.

GARCIA-SEGURA, L. M.; WOZNIAK, A.; AZCOITIA, I.; RODRIGUEZ, J. R.; HUTCHISON, R. E.; HUTCHISON, J. B. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. **Neuroscience**, v. 89, n. 2, p. 567-578, 1999.

GATER, R.; TANSELLA, M.; KORTEN, A.; TIEMENS, B. G.; MAVREAS, V. G.; OLATAWURA, M. O. Sex differences in the prevalence and detection of depressive and anxiety disorders in general health care settings: report from the World Health Organization Collaborative Study on Psychological Problems in General Health Care. **Archives of General Psychiatry**, v. 55, n. 5, p. 405-413, 1998.

GHOSH, S.; BALTIMORE, D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. **Nature**, v. 344, n. 6267, p. 678-682, 1990.

GIGLIO, T.; IMRO, M. A.; FILACI, G.; SCUDELETTI, M.; PUPPO, F.; DE CECCO, L.; INDIVERI, F.; COSTANTINI, S. Immune cell circulating subsets are affected by gonadal function. **Life Sciences**, v. 54, n. 18, p. 1305-1312, 1994.

GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J. K. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 3, p. 243-251, 2005.

GOLD, P. W.; GOODWIN, F. K.; CHROUSOS, G. P. Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (2). **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 7, p. 413-420, 1988.

GOUJON, E.; PARNET, P.; AUBERT, A.; GOODALL, G.; DANTZER, R. Corticosterone regulates behavioral effects of lipopolysaccharide and interleukin-1 beta in mice. **American Journal of Physiology**, v. 269, n. 1 Pt 2, p. R154-159, 1995.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 4, p. 811-829, 1994.

GRAEFF, F. G.; SILVEIRA, M. C.; NOGUEIRA, R. L.; AUDI, E. A.; OLIVEIRA, R. M. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behavioural Brain Research**, v. 58, n. 1-2, p. 123-131, 1993.

GREENBERG, P. E.; SISITSKY, T.; KESSLER, R. C.; FINKELSTEIN, S. N.; BERNDT, E. R.; DAVIDSON, J. R.; BALLENGER, J. C.; FYER, A. J. The economic burden of anxiety disorders in the 1990s. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 60, n. 7, p. 427-435, 1999.

GUTIERREZ, E. G.; BANKS, W. A.; KASTIN, A. J. Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. **Journal of Neuroimmunology**, v. 47, n. 2, p. 169-176, 1993.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, 18: 385-403; 1934.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. **Journal of Comparative Psychology**, 22: 345-352; 1936.

HANSEL, A.; HONG, S.; CAMARA, R. J.; VON KANEL, R. Inflammation as a psychophysiological biomarker in chronic psychosocial stress. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v., n., p., 2009.

HARPER, J.; PERGAMENT, E.; DELHANTY, J. Recent advances in molecular and molecular cytogenetic techniques have enabled the diagnosis of some inherited diseases from a single cell. **Prenat Diagn**, v. 18, n. 13, p. 1343-1344, 1998.

HARRO, J.; VASAR, E.; BRADWEJN, J. CCK in animal and human research on anxiety. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 14, n. 6, p. 244-249, 1993.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 12, n. 2, p. 123-137, 1988.

HASTINGS, R. S.; PARSEY, R. V.; OQUENDO, M. A.; ARANGO, V.; MANN, J. J. Volumetric analysis of the prefrontal cortex, amygdala, and hippocampus in major depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 5, p. 952-959, 2004.

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

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

HAYNES, R. L.; BORENSTEIN, N. S.; DESILVA, T. M.; FOLKERTH, R. D.; LIU, L. G.; VOLPE, J. J.; KINNEY, H. C. Axonal development in the cerebral white matter of the human fetus and infant. **Journal of Comparative Neurology**, v. 484, n. 2, p. 156-167, 2005.

HE, W.; FONG, Y.; MARANO, M. A.; GERSHENWALD, J. E.; YURT, R. W.; MOLDAWER, L. L.; LOWRY, S. F. Tolerance to endotoxin prevents mortality in infected thermal injury: association with attenuated cytokine responses. **Journal of Infectious Diseases**, v. 165, n. 5, p. 859-864, 1992.

HEIMER, L.; VAN HOESEN, G. W. The limbic lobe and its output channels: implications for emotional functions and adaptive behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 2, p. 126-147, 2006.

HELLER, W. Gender differences in depression: perspectives from neuropsychology. **Journal of Affective Disorders**, v. 29, n. 2-3, p. 129-143, 1993.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 2, p. 78-84, 1997.

HERMUS, A. R.; SWEEP, C. G. Cytokines and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 6, p. 867-871, 1990.

HEUSER, I.; BISSETTE, G.; DETTLING, M.; SCHWEIGER, U.; GOTTHARDT, U.; SCHMIDER, J.; LAMMERS, C. H.; NEMEROFF, C. B.; HOLSBOER, F. Cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing hormone, vasopressin, and somatostatin in depressed patients and healthy controls: response to amitriptyline treatment. **Depress Anxiety**, v. 8, n. 2, p. 71-79, 1998.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 21-30, 1996.

HOPKINS, S. J.; ROTHWELL, N. J. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. **Trends in Neurosciences**, v. 18, n. 2, p. 83-88, 1995.

HORNIG, M.; LIPKIN, W. I. Infectious and immune factors in the pathogenesis of neurodevelopmental disorders: epidemiology, hypotheses, and animal models. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev**, v. 7, n. 3, p. 200-210, 2001.

IMHOF, J. T.; COELHO, Z. M.; SCHMITT, M. L.; MORATO, G. S.; CAROBREZ, A. P. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. **Behavioural Brain Research**, v. 56, n. 2, p. 177-180, 1993.

JARRAR, D.; WANG, P.; KNOFERL, M. W.; KUEBLER, J. F.; CIOFFI, W. G.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Insight into the mechanism by which estradiol improves organ functions after trauma-hemorrhage. **Surgery**, v. 128, n. 2, p. 246-252, 2000.

JEHON, G. H.; KONG, L. Y.; WILSON, B.; HUDSON, P.; HONG, J. S. Synergistic neurotoxic effects of combined treatments with cytokines in murine primary mixed neuron/glia cultures. **Journal of Neuroimmunology**, v. 85, n. 1, p. 1-10, 1998.

JEZOVA, D.; OCHEDALSKI, T.; GLICKMAN, M.; KISS, A.; AGUILERA, G. Central corticotropin-releasing hormone receptors modulate hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity during stress. **Neuroscience**, v. 94, n. 3, p. 797-802, 1999.

JOHNSON, S.; FAWKE, J.; HENNESSY, E.; ROWELL, V.; THOMAS, S.; WOLKE, D.; MARLOW, N. Neurodevelopmental disability through 11 years of age in children born before 26 weeks of gestation. **Pediatrics**, v. 124, n. 2, p. e249-257, 2009a.

JOHNSON, S.; HENNESSY, E.; SMITH, R.; TRIKIC, R.; WOLKE, D.; MARLOW, N. Academic attainment and special educational needs in extremely preterm children at 11 years of age: the EPICure study. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 94, n. 4, p. F283-289, 2009b.

KAINUMA, E.; WATANABE, M.; TOMIYAMA-MIYAJI, C.; INOUE, M.; KUWANO, Y.; REN, H.; ABO, T. Association of glucocorticoid with stress-induced modulation of body temperature, blood glucose and innate immunity. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 10, p. 1459-1468, 2009.

KATON, W.; SULLIVAN, M.; WALKER, E. Medical symptoms without identified pathology: relationship to psychiatric disorders, childhood and adult trauma, and personality traits. **Annals of Internal Medicine**, v. 134, n. 9 Pt 2, p. 917-925, 2001.

KELLER, M. B.; LAVORI, P. W.; MUELLER, T. I.; ENDICOTT, J.; CORYELL, W.; HIRSCHFELD, R. M.; SHEA, T. Time to recovery, chronicity, and levels of psychopathology in major depression. A 5-year prospective follow-up of 431 subjects. **Archives of General Psychiatry**, v. 49, n. 10, p. 809-816, 1992.

KELLER, S.; KESSLER, T.; MEUSER, T.; FOGEL, W.; BREMEN, D.; JOST, W. H. [Analysis of direct costs in therapy of Parkinson disease]. **Nervenarzt**, v. 74, n. 12, p. 1105-1109, 2003.

KELLEY, K. W.; BLUTHE, R. M.; DANTZER, R.; ZHOU, J. H.; SHEN, W. H.; JOHNSON, R. W.; BROUSSARD, S. R. Cytokine-induced sickness behavior. **Brain Behavior and Immunity**, v. 17 Suppl 1, n., p. S112-118, 2003.

KENDLER, K. S.; HEATH, A. C.; MARTIN, N. G.; EAVES, L. J. Symptoms of anxiety and symptoms of depression. Same genes, different environments? **Archives of General Psychiatry**, v. 44, n. 5, p. 451-457, 1987.

KENT, S.; BLUTHE, R. M.; DANTZER, R.; HARDWICK, A. J.; KELLEY, K. W.; ROTHWELL, N. J.; VANNICE, J. L. Different receptor mechanisms mediate the pyrogenic and behavioral effects of interleukin 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 19, p. 9117-9120, 1992a.

KENT, S.; BLUTHE, R. M.; KELLEY, K. W.; DANTZER, R. Sickness behavior as a new target for drug development. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, n. 1, p. 24-28, 1992b.

KESSLER, R. C. The epidemiology of pure and comorbid generalized anxiety disorder: a review and evaluation of recent research. **Acta Psychiatr Scand Suppl**, v., n. 406, p. 7-13, 2000.

KESSLER, R. C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; KORETZ, D.; MERIKANGAS, K. R.; RUSH, A. J.; WALTERS, E. E.; WANG, P. S. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **JAMA**, v. 289, n. 23, p. 3095-3105, 2003.

KESSLER, R. C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; MERIKANGAS, K. R.; WALTERS, E. E. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 593-602, 2005a.

KESSLER, R. C.; CHIU, W. T.; DEMLER, O.; MERIKANGAS, K. R.; WALTERS, E. E. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 617-627, 2005b.

KESSLER, R. C.; MCGONAGLE, K. A.; ZHAO, S.; NELSON, C. B.; HUGHES, M.; ESHLEMAN, S.; WITTCHEN, H. U.; KENDLER, K. S. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. **Archives of General Psychiatry**, v. 51, n. 1, p. 8-19, 1994.

KHAIROVA, R. A.; MACHADO-VIEIRA, R.; DU, J.; MANJI, H. K. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 561-578, 2009.

KIMCHI, T.; XU, J.; DULAC, C. A functional circuit underlying male sexual behaviour in the female mouse brain. **Nature**, v. 448, n. 7157, p. 1009-1014, 2007.

KIMURA, K.; OTE, M.; TAZAWA, T.; YAMAMOTO, D. Fruitless specifies sexually dimorphic neural circuitry in the Drosophila brain. **Nature**, v. 438, n. 7065, p. 229-233, 2005.

KNOFERL, M. W.; ANGELE, M. K.; SCHWACHA, M. G.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Preservation of splenic immune functions by female sex hormones after trauma-hemorrhage. **Crit Care Med**, v. 30, n. 4, p. 888-893, 2002.

KNOFERL, M. W.; DIODATO, M. D.; ANGELE, M. K.; AYALA, A.; CIOFFI, W. G.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Do female sex steroids adversely or beneficially affect the depressed immune responses in males after trauma-hemorrhage? **Arch Surg**, v. 135, n. 4, p. 425-433, 2000.

KNOPF, H. P.; OTTO, F.; ENGELHARDT, R.; FREUDENBERG, M. A.; GALANOS, C.; HERRMANN, F.; SCHUMANN, R. R. Discordant adaptation of human peritoneal macrophages to stimulation by lipopolysaccharide and the synthetic lipid A analogue SDZ MRL 953. Down-regulation of TNF-alpha and IL-6 is paralleled by an up-regulation of IL-1 beta and granulocyte colony-stimulating factor expression. **Journal of Immunology**, v. 153, n. 1, p. 287-299, 1994.

KNOX, A. M.; LI, X. F.; KINSEY-JONES, J. S.; WILKINSON, E. S.; WU, X. Q.; CHENG, Y. S.; MILLIGAN, S. R.; LIGHTMAN, S. L.; O'BYRNE, K. T. Neonatal lipopolysaccharide exposure delays puberty and alters hypothalamic Kiss1 and Kiss1r mRNA expression in the female rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 8, p. 683-689, 2009.

KOCSIS, J. H.; DAVIS, J. M.; KATZ, M. M.; KOSLOW, S. H.; STOKES, P. E.; CASPER, R.; REDMOND, D. E. Depressive behavior and hyperactive adrenocortical function. **American Journal of Psychiatry**, v. 142, n. 11, p. 1291-1298, 1985.

KOEHL, M.; LEMAIRE, V.; VALLEE, M.; ABROUS, N.; PIAZZA, P. V.; MAYO, W.; MACCARI, S.; LE MOAL, M. Long term neurodevelopmental and behavioral effects of perinatal life events in rats. **Neurotox Res**, v. 3, n. 1, p. 65-83, 2001.

KOENIGS, M.; GRAFMAN, J. The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. **Behavioural Brain Research**, v. 201, n. 2, p. 239-243, 2009.

KOFMAN, O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 457-470, 2002.

KOPCHIA, K. L.; ALTMAN, H. J.; COMMISSARIS, R. L. Effects of lesions of the central nucleus of the amygdala on anxiety-like behaviors in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 43, n. 2, p. 453-461, 1992.

KOPNISKY, K. L.; SUMNERS, C.; CHANDLER, L. J. Cytokine- and endotoxin-induced nitric oxide synthase in rat astroglial cultures: differential modulation by angiotensin II. **Journal of Neurochemistry**, v. 68, n. 3, p. 935-944, 1997.

KOSTOVIC, I.; JUDAS, M. Transient patterns of organization of the human fetal brain. **Croatian Medical Journal**, v. 39, n. 2, p. 107-114, 1998.

KOSTOVIC, I.; JUDAS, M. Correlation between the sequential ingrowth of afferents and transient patterns of cortical lamination in preterm infants. **Anatomical Record**, v. 267, n. 1, p. 1-6, 2002.

KOSTOVIC, I.; JUDAS, M. Prolonged coexistence of transient and permanent circuitry elements in the developing cerebral cortex of fetuses and preterm infants. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 48, n. 5, p. 388-393, 2006.

KOSTOVIC, I.; STEFULJ-FUCIC, A.; MRZLJAK, L.; JUKIC, S.; DELALLE, I. Prenatal and perinatal development of the somatostatin-immunoreactive neurons in the human prefrontal cortex. **Neuroscience Letters**, v. 124, n. 2, p. 153-156, 1991.

KRISHNAN, M. L.; DYET, L. E.; BOARDMAN, J. P.; KAPELLOU, O.; ALLSOP, J. M.; COWAN, F.; EDWARDS, A. D.; RUTHERFORD, M. A.; COUNSELL, S. J. Relationship between white matter apparent diffusion coefficients in preterm infants at term-equivalent age and developmental outcome at 2 years. **Pediatrics**, v. 120, n. 3, p. e604-609, 2007.

KRONFOL, Z.; REMICK, D. G. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 5, p. 683-694, 2000.

LACERDA, A. L.; KESHAVAN, M. S.; HARDAN, A. Y.; YORBIK, O.; BRAMBILLA, P.; SASSI, R. B.; NICOLETTI, M.; MALLINGER, A. G.; FRANK, E.; KUPFER, D. J.;

SOARES, J. C. Anatomic evaluation of the orbitofrontal cortex in major depressive disorder. **Biological Psychiatry**, v. 55, n. 4, p. 353-358, 2004.

LACERDA, A. L.; NICOLETTI, M. A.; BRAMBILLA, P.; SASSI, R. B.; MALLINGER, A. G.; FRANK, E.; KUPFER, D. J.; KESHAVAN, M. S.; SOARES, J. C. Anatomical MRI study of basal ganglia in major depressive disorder. **Psychiatry Research**, v. 124, n. 3, p. 129-140, 2003.

LANG, P. J.; DAVIS, M.; OHMAN, A. Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. **Journal of Affective Disorders**, v. 61, n. 3, p. 137-159, 2000.

LANGHANS, W.; BALKOWSKI, G.; SAVOLDELLI, D. Differential feeding responses to bacterial lipopolysaccharide and muramyl dipeptide. **American Journal of Physiology**, v. 261, n. 3 Pt 2, p. R659-664, 1991.

LARSON, S. J.; DUNN, A. J. Behavioral effects of cytokines. **Brain Behavior and Immunity**, v. 15, n. 4, p. 371-387, 2001.

LAZARINI, C. A.; FLORIO, J. C.; LEMONICA, I. P.; BERNARDI, M. M. Effects of prenatal exposure to deltamethrin on forced swimming behavior, motor activity, and striatal dopamine levels in male and female rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 23, n. 6, p. 665-673, 2001.

LEONARD, B. E.; MYINT, A. The psychoneuroimmunology of depression. **Human Psychopharmacology**, v. 24, n. 3, p. 165-175, 2009.

LEPINE, J. P. Epidemiology, burden, and disability in depression and anxiety. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 62 Suppl 13, n., p. 4-10; discussion 11-12, 2001.

LEVITON, A.; DAMMANN, O.; DURUM, S. K. The adaptive immune response in neonatal cerebral white matter damage. **Annals of Neurology**, v. 58, n. 6, p. 821-828, 2005.

LI, R.; SHEN, Y. Estrogen and brain: synthesis, function and diseases. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, n., p. 257-267, 2005.

LIANG, M. D.; BAGCHI, A.; WARREN, H. S.; TEHAN, M. M.; TRIGILIO, J. A.; BEASLEY-TOPLIFFE, L. K.; TESINI, B. L.; LAZZARONI, J. C.; FENTON, M. J.; HELLMAN, J. Bacterial peptidoglycan-associated lipoprotein: a naturally occurring toll-like receptor 2 agonist that is shed into serum and has synergy with lipopolysaccharide. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 6, p. 939-948, 2005.

LIECHTY, K. W.; SCHIBLER, K. R.; OHLS, R. K.; PERKINS, S. L.; CHRISTENSEN, R. D. The failure of newborn mice infected with *Escherichia coli* to accelerate neutrophil production correlates with their failure to increase transcripts for granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-6. **Biology of the Neonate**, v. 64, n. 5, p. 331-340, 1993.

LOCKSHIN, M. D. Sex differences in autoimmune disease. **Lupus**, v. 15, n. 11, p. 753-756, 2006.

LOY, R.; MILNER, T. A. Neonatal steroid treatment alters axonal sprouting in adult hippocampus: sexually dimorphic development of cholinergic target neurons. **Birth Defects Original Article Series**, v. 19, n. 4, p. 417-423, 1983.

LUHESHI, G. N.; STEFFERL, A.; TURNBULL, A. V.; DASCOMBE, M. J.; BROUWER, S.; HOPKINS, S. J.; ROTHWELL, N. J. Febrile response to tissue inflammation involves both peripheral and brain IL-1 and TNF-alpha in the rat. **American Journal of Physiology**, v. 272, n. 3 Pt 2, p. R862-868, 1997.

LYNCH, A. M.; WALSH, C.; DELANEY, A.; NOLAN, Y.; CAMPBELL, V. A.; LYNCH, M. A. Lipopolysaccharide-induced increase in signalling in hippocampus is abrogated by IL-10--a role for IL-1 beta? **Journal of Neurochemistry**, v. 88, n. 3, p. 635-646, 2004.

LYNCH, N. J.; WILLIS, C. L.; NOLAN, C. C.; ROSCHER, S.; FOWLER, M. J.; WEIHE, E.; RAY, D. E.; SCHWAEBLE, W. J. Microglial activation and increased synthesis of complement component C1q precedes blood-brain barrier dysfunction in rats. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 10, p. 709-716, 2004.

MAES, M. Major depression and activation of the inflammatory response system. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 461, n., p. 25-46, 1999.

MAES, M. Interleukin-1beta and the etiology of depression. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 103, n. 3, p. 161-162, 2001a.

MAES, M. Psychological stress and the inflammatory response system. **Clinical Science (London)**, v. 101, n. 2, p. 193-194, 2001b.

MAES, M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 29, n. 3, p. 287-291, 2008.

MAES, M.; OMBELET, W.; DE JONGH, R.; KENIS, G.; BOSMANS, E. The inflammatory response following delivery is amplified in women who previously suffered from major depression, suggesting that major depression is accompanied by a sensitization of the inflammatory response system. **Journal of Affective Disorders**, v. 63, n. 1-3, p. 85-92, 2001.

MAISONNETTE, S.; MORATO, S.; BRANDAO, M. L. Role of resocialization and of 5-HT1A receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus-maze test. **Physiology & Behavior**, v. 54, n. 4, p. 753-758, 1993.

MALAEV, S.; DAMMANN, O. Fetal inflammatory response and brain injury in the preterm newborn. **Journal of Child Neurology**, v. 24, n. 9, p. 1119-1126, 2009.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

MARQUES, A. H.; CIZZA, G.; STERNBERG, E. [Brain-immune interactions and implications in psychiatric disorders]. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29 Suppl 1, n., p. S27-32, 2007.

MARRIOTT, I.; BOST, K. L.; HUET-HUDSON, Y. M. Sexual dimorphism in expression of receptors for bacterial lipopolysaccharides in murine macrophages: a possible mechanism for gender-based differences in endotoxic shock susceptibility. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 71, n. 1, p. 12-27, 2006.

MARTI, O.; HARBUZ, M. S.; ANDRES, R.; LIGHTMAN, S. L.; ARMARIO, A. Activation of the hypothalamic-pituitary axis in adrenalectomised rats: potentiation by chronic stress. **Brain Research**, v. 821, n. 1, p. 1-7, 1999.

MARTIN, E. I.; RESSLER, K. J.; BINDER, E.; NEMEROFF, C. B. The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. **Psychiatr Clin North Am**, v. 32, n. 3, p. 549-575, 2009.

MCCOMBE, P. A.; GREER, J. M.; MACKAY, I. R. Sexual dimorphism in autoimmune disease. **Curr Mol Med**, v. 9, n. 9, p. 1058-1079, 2009.

MCDAVID, K.; SCHYMURA, M. J.; ARMSTRONG, L.; SANTILLI, L.; SCHMIDT, B.; BYERS, T.; STEELE, C. B.; O'CONNOR, L.; SCHLAG, N. C.; ROSHALA, W.; DARCY, D.; MATANOSKI, G.; SHEN, T.; BOLICK-ALDRICH, S. Rationale and design of the National Program of Cancer Registries' Breast, Colon, and Prostate Cancer Patterns of Care Study. **Cancer Causes & Control**, v. 15, n. 10, p. 1057-1066, 2004.

MCGRATH, B. B.; PUZAN, E. Gender disparities in health: attending to the particulars. **Nurs Clin North Am**, v. 39, n. 1, p. 37-51, 2004.

MEGYERI, P.; ABRAHAM, C. S.; TEMESVARI, P.; KOVACS, J.; VAS, T.; SPEER, C. P. Recombinant human tumor necrosis factor alpha constricts pial arterioles and increases blood-brain barrier permeability in newborn piglets. **Neuroscience Letters**, v. 148, n. 1-2, p. 137-140, 1992.

MEGYERI, P.; NEMETH, L.; PABST, K. M.; PABST, M. J.; DELI, M. A.; ABRAHAM, C. S. 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride attenuates tumor-necrosis-factor-alpha-induced blood-brain barrier opening. **European Journal of Pharmacology**, v. 374, n. 2, p. 207-211, 1999.

MERRILL, J. E.; BENVENISTE, E. N. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. **Trends in Neurosciences**, v. 19, n. 8, p. 331-338, 1996.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Prog Neurobiol**, v. 70, n. 2, p. 83-244, 2003.

MILLAN, M. J.; BROCCO, M. The Vogel conflict test: procedural aspects, gamma-aminobutyric acid, glutamate and monoamines. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 67-96, 2003.

MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biological Psychiatry**, v. 65, n. 9, p. 732-741, 2009.

MILLER, E. J.; CHUNG, H. A literature review of studies of depression and treatment outcomes among U.S. College students since 1990. **Psychiatr Serv**, v. 60, n. 9, p. 1257-1260, 2009.

MILLER, S. I.; ERNST, R. K.; BADER, M. W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 36-46, 2005.

MILNER, T. A.; LOY, R.; AMARAL, D. G. An anatomical study of the development of the septo-hippocampal projection in the rat. **Brain Research**, v. 284, n. 2-3, p. 343-371, 1983.

MISENER, V. L.; GOMEZ, L.; WIGG, K. G.; LUCA, P.; KING, N.; KISS, E.; DAROCZI, G.; KAPORNAI, K.; TAMAS, Z.; MAYER, L.; GADOROS, J.; BAJI, I.; KENNEDY, J. L.; KOVACS, M.; VETRO, A.; BARR, C. L. Cytokine Genes TNF, IL1A, IL1B, IL6, IL1RN and IL10, and childhood-onset mood disorders. **Neuropsychobiology**, v. 58, n. 2, p. 71-80, 2008.

MIYAGI, M.; AOYAMA, H.; MORISHITA, M.; IWAMOTO, Y. Effects of sex hormones on chemotaxis of human peripheral polymorphonuclear leukocytes and monocytes. **Journal of Periodontology**, v. 63, n. 1, p. 28-32, 1992.

MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 1, p. 119-128, 2003.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 471-483, 2002.

MORLEY-FLETCHER, S.; DARNAUDERY, M.; KOEHL, M.; CASOLINI, P.; VAN REETH, O.; MACCARI, S. Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test. Effects of a chronic treatment with tianeptine. **Brain Research**, v. 989, n. 2, p. 246-251, 2003.

MOTTA, V.; MAISONNETTE, S.; MORATO, S.; CASTRECHINI, P.; BRANDAO, M. L. Effects of blockade of 5-HT₂ receptors and activation of 5-HT_{1A} receptors on the exploratory activity of rats in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 107, n. 1, p. 135-139, 1992.

MUELLER, T. I.; LEON, A. C.; KELLER, M. B.; SOLOMON, D. A.; ENDICOTT, J.; CORYELL, W.; WARSHAW, M.; MASER, J. D. Recurrence after recovery from major

depressive disorder during 15 years of observational follow-up. **American Journal of Psychiatry**, v. 156, n. 7, p. 1000-1006, 1999.

MUROI, M.; OHNISHI, T.; TANAMOTO, K. Regions of the mouse CD14 molecule required for toll-like receptor 2- and 4-mediated activation of NF-kappa B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 44, p. 42372-42379, 2002.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v. 349, n. 9063, p. 1436-1442, 1997.

MUSSELMAN, D. L.; EVANS, D. L.; NEMEROFF, C. B. The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment. **Archives of General Psychiatry**, v. 55, n. 7, p. 580-592, 1998.

NARROW, W. E.; RAE, D. S.; ROBINS, L. N.; REGIER, D. A. Revised prevalence estimates of mental disorders in the United States: using a clinical significance criterion to reconcile 2 surveys' estimates. **Archives of General Psychiatry**, v. 59, n. 2, p. 115-123, 2002.

NEMEROFF, C. B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. **Molecular Psychiatry**, v. 1, n. 4, p. 336-342, 1996.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

NILSSON, C.; JENNISCHE, E.; HO, H. P.; ERIKSSON, E.; BJORNTORP, P.; HOLMANG, A. Postnatal endotoxin exposure results in increased insulin sensitivity and altered activity of neuroendocrine axes in adult female rats. **European Journal of Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 251-260, 2002.

NOLAN, J. P. Protective action of oestrogen against the lethal effect of endotoxin in the rat. **Nature**, v. 213, n. 5072, p. 201-202, 1967.

NOLAN, J. P.; O'CONNELL, C. J. Vascular response in the isolated rat liver. I. Endotoxin, direct effects. **Journal of Experimental Medicine**, v. 122, n. 6, p. 1063-1073, 1965.

NOSARTI, C.; GIOUROUKOU, E.; MICALI, N.; RIFKIN, L.; MORRIS, R. G.; MURRAY, R. M. Impaired executive functioning in young adults born very preterm. **J Int Neuropsychol Soc**, v. 13, n. 4, p. 571-581, 2007.

NUNN, C. L.; LINDENFORS, P.; PURSALL, E. R.; ROLFF, J. On sexual dimorphism in immune function. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences**, v. 364, n. 1513, p. 61-69, 2009.

OBER, C.; LOISEL, D. A.; GILAD, Y. Sex-specific genetic architecture of human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 12, p. 911-922, 2008.

OPAL, S. M.; DEPALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines. **Chest**, v. 117, n. 4, p. 1162-1172, 2000.

OSSENKOPP, K. P.; MAZMANIAN, D. S. The measurement and integration of behavioral variables: aggregation and complexity as important issues. **Neurobehav Toxicol Teratol**, v. 7, n. 1, p. 95-100, 1985.

PACAK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 4, p. 502-548, 2001.

PACAK, K.; PALKOVITS, M.; KVETNANSKY, R.; MATERN, P.; HART, C.; KOPIN, I. J.; GOLDSTEIN, D. S. Catecholaminergic inhibition by hypercortisolemia in the paraventricular nucleus of conscious rats. **Endocrinology**, v. 136, n. 11, p. 4814-4819, 1995.

PALACIOS, B.; PANG, C. C. Protective effects of ethynylestradiol on the hemodynamic changes induced by lipopolysaccharide in anesthetized rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 31, n. 4, p. 479-483, 1998.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 219-233, 2001.

PANG, Y.; CAI, Z.; RHODES, P. G. Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 140, n. 2, p. 205-214, 2003.

PARE, W. P. The Effect of Chronic Environmental Stress on Stomach Ulceration, Adrenal Function, and Consummatory Behavior in the Rat. **J Psychol**, v. 57, n., p. 143-151, 1964.

PARKER, G. B.; BROTHIE, H. L. From diathesis to dimorphism: the biology of gender differences in depression. **Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 192, n. 3, p. 210-216, 2004.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Neural regulators of innate immune responses and inflammation. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, n. 18, p. 2322-2331, 2004.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PEZESHKI, G.; POHL, T.; SCHOBITZ, B. Corticosterone controls interleukin-1 beta expression and sickness behavior in the rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 8, n. 2, p. 129-135, 1996.

PICAZO, O.; BECERRIL-MONTES, A.; HUIDOBRO-PEREZ, D.; GARCIA-SEGURA, L. M. Neuroprotective Actions of the Synthetic Estrogen 17alpha-Ethynylestradiol in the Hippocampus. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v., n., p.

PIHOKER, C.; OWENS, M. J.; KUHN, C. M.; SCHANBERG, S. M.; NEMEROFF, C. B. Maternal separation in neonatal rats elicits activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: a putative role for corticotropin-releasing factor. **Psychoneuroendocrinology**, v. 18, n. 7, p. 485-493, 1993.

PITYCHOUTIS, P. M.; GRIVA, E.; IOANNOU, K.; TSITSILONIS, O. E.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Chronic antidepressant treatment exerts sexually dimorphic immunomodulatory effects in an experimental model of major depression: do females lack an advantage? **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 12, n. 9, p. 1157-1163, 2009a.

PITYCHOUTIS, P. M.; NAKAMURA, K.; TSONIS, P. A.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Neurochemical and behavioral alterations in an inflammatory model of depression: sex differences exposed. **Neuroscience**, v. 159, n. 4, p. 1216-1232, 2009b.

PLATA-SALAMAN, C.; TURRIN, N. Cytokine interactions and cytokine balance in the brain: relevance to neurology and psychiatry. **Molecular Psychiatry**, v. 4, n. 4, p. 302-306, 1999.

PORSOLT, R. D. Animal model of depression. **Biomedicine**, v. 30, n. 3, p. 139-140, 1979.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 229, n. 2, p. 327-336, 1977.

PORTER, M. H.; ARNOLD, M.; LANGHANS, W. TNF-alpha tolerance blocks LPS-induced hypophagia but LPS tolerance fails to prevent TNF-alpha-induced hypophagia. **American Journal of Physiology**, v. 274, n. 3 Pt 2, p. R741-745, 1998.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, n., p. 635-700, 2002.

RAO, V. P.; KRISHNAN, K. R.; GOLI, V.; SAUNDERS, W. B.; ELLINWOOD, E. H., JR.; BLAZER, D. G.; NEMEROFF, C. B. Neuroanatomical changes and hypothalamo-pituitary-adrenal axis abnormalities. **Biological Psychiatry**, v. 26, n. 7, p. 729-732, 1989.

REEDY, N. J. Born too soon: the continuing challenge of preterm labor and birth in the United States. **J Midwifery Womens Health**, v. 52, n. 3, p. 281-290, 2007.

REGIER, D. A.; NARROW, W. E.; RAE, D. S.; MANDERSCHIED, R. W.; LOCKE, B. Z.; GOODWIN, F. K. The de facto US mental and addictive disorders service system. Epidemiologic catchment area prospective 1-year prevalence rates of disorders and services. **Archives of General Psychiatry**, v. 50, n. 2, p. 85-94, 1993.

REINIUS, B.; SAETRE, P.; LEONARD, J. A.; BLEKHMANN, R.; MERINO-MARTINEZ, R.; GILAD, Y.; JAZIN, E. An evolutionarily conserved sexual signature in the primate brain. **PLoS Genet**, v. 4, n. 6, p. e1000100, 2008.

RHODES, J. K.; ANDREWS, P. J.; HOLMES, M. C.; SECKL, J. R. Expression of interleukin-6 messenger RNA in a rat model of diffuse axonal injury. **Neuroscience Letters**, v. 335, n. 1, p. 1-4, 2002.

RIBEIRO, S. J.; DE LIMA, T. C. Naloxone-induced changes in tachykinin NK3 receptor modulation of experimental anxiety in mice. **Neuroscience Letters**, v. 258, n. 3, p. 155-158, 1998.

RINN, J. L.; SNYDER, M. Sexual dimorphism in mammalian gene expression. **Trends in Genetics**, v. 21, n. 5, p. 298-305, 2005.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801-810, 1997.

RODIER, P. M. Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 22, n. 4, p. 525-545, 1980.

RONALDS, C.; CREED, F.; STONE, K.; WEBB, S.; TOMENSON, B. Outcome of anxiety and depressive disorders in primary care. **British Journal of Psychiatry**, v. 171, n., p. 427-433, 1997.

ROSAS-BALLINA, M.; TRACEY, K. J. The neurology of the immune system: neural reflexes regulate immunity. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 28-32, 2009.

ROSEN, J. B.; SCHULKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. **Psychol Rev**, v. 105, n. 2, p. 325-350, 1998.

ROSKODEN, T.; OTTEN, U.; SCHWEGLER, H. Early postnatal corticosterone administration regulates neurotrophins and their receptors in septum and hippocampus of the rat. **Experimental Brain Research**, v. 154, n. 2, p. 183-191, 2004.

ROTH, P.; BARTOCCI, A.; STANLEY, E. R. Lipopolysaccharide induces synthesis of mouse colony-stimulating factor-1 in vivo. **Journal of Immunology**, v. 158, n. 8, p. 3874-3880, 1997.

ROTHWELL, N. J.; HOPKINS, S. J. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. **Trends in Neurosciences**, v. 18, n. 3, p. 130-136, 1995.

ROUSSEAU, S.; MORRICE, N.; PEGGIE, M.; CAMPBELL, D. G.; GAESTEL, M.; COHEN, P. Inhibition of SAPK2a/p38 prevents hnRNP A0 phosphorylation by MAPKAP-K2 and its interaction with cytokine mRNAs. **EMBO J**, v. 21, n. 23, p. 6505-6514, 2002.

RUPNIAK, N. M.; CARLSON, E. C.; HARRISON, T.; OATES, B.; SEWARD, E.; OWEN, S.; DE FELIPE, C.; HUNT, S.; WHEELDON, A. Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK(1)) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 8, p. 1413-1421, 2000.

SAMY, T. S.; KNOFERL, M. W.; ZHENG, R.; SCHWACHA, M. G.; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Divergent immune responses in male and female mice after trauma-hemorrhage: dimorphic alterations in T lymphocyte steroidogenic enzyme activities. **Endocrinology**, v. 142, n. 8, p. 3519-3529, 2001.

SANDERS, S. K.; MORZORATI, S. L.; SHEKHAR, A. Priming of experimental anxiety by repeated subthreshold GABA blockade in the rat amygdala. **Brain Research**, v. 699, n. 2, p. 250-259, 1995.

SANDFORD, J. J.; ARGYROPOULOS, S. V.; NUTT, D. J. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: Basic neurobiology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 88, n. 3, p. 197-212, 2000.

SANDS, J.; DOBBING, J.; GRATRICK, C. A. Cell number and cell size: organ growth and development and the control of catch-up growth in rats. **Lancet**, v. 2, n. 8141, p. 503-505, 1979.

SCHAPIRO, S.; GELLER, E.; EIDUSON, S. Corticoid response to stress in the steroid-inhibited rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 109, n., p. 935-937, 1962a.

SCHAPIRO, S.; GELLER, E.; EIDUSON, S. Neonatal adrenal cortical response to stress and vasopressin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 109, n., p. 937-941, 1962b.

SCHIBLER, K. R.; LIECHTY, K. W.; WHITE, W. L.; ROTHSTEIN, G.; CHRISTENSEN, R. D. Defective production of interleukin-6 by monocytes: a possible mechanism underlying several host defense deficiencies of neonates. **Pediatric Research**, v. 31, n. 1, p. 18-21, 1992.

SCHIBLER, K. R.; TRAUTMAN, M. S.; LIECHTY, K. W.; WHITE, W. L.; ROTHSTEIN, G.; CHRISTENSEN, R. D. Diminished transcription of interleukin-8 by monocytes from preterm neonates. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 53, n. 4, p. 399-403, 1993.

SCHIEPERS, O. J.; WICHERS, M. C.; MAES, M. Cytokines and major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 29, n. 2, p. 201-217, 2005.

SCHNEIDER, H.; PITOSI, F.; BALSCHUN, D.; WAGNER, A.; DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H. O. A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 13, p. 7778-7783, 1998.

SCHOBITZ, B.; SUTANTO, W.; CAREY, M. P.; HOLLSBOER, F.; DE KLOET, E. R. Endotoxin and interleukin 1 decrease the affinity of hippocampal mineralocorticoid

(type I) receptor in parallel to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Neuroendocrinology**, v. 60, n. 2, p. 124-133, 1994.

SCHULZ, R.; BEACH, S. R.; IVES, D. G.; MARTIRE, L. M.; ARIYO, A. A.; KOP, W. J. Association between depression and mortality in older adults: the Cardiovascular Health Study. **Archives of Internal Medicine**, v. 160, n. 12, p. 1761-1768, 2000.

SELMAJ, K.; RAINE, C. S.; CANNELLA, B.; BROSNAN, C. F. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. **J Clin Invest**, v. 87, n. 3, p. 949-954, 1991a.

SELMAJ, K.; SHAFIT-ZAGARDO, B.; AQUINO, D. A.; FAROOQ, M.; RAINE, C. S.; NORTON, W. T.; BROSNAN, C. F. Tumor necrosis factor-induced proliferation of astrocytes from mature brain is associated with down-regulation of glial fibrillary acidic protein mRNA. **Journal of Neurochemistry**, v. 57, n. 3, p. 823-830, 1991b.

SELMAJ, K. W.; FAROOQ, M.; NORTON, W. T.; RAINE, C. S.; BROSNAN, C. F. Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 1, p. 129-135, 1990.

SELMAJ, K. W.; RAINE, C. S. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. **Annals of Neurology**, v. 23, n. 4, p. 339-346, 1988.

H SELYE; JB .COLLIP; DL .THOMSON . **Procedures of. the Society of Experimentation in Biology. and Medicine.**, 1934;

SELYE, H. A syndrome produce by diverse nocuous agents. **Nature**, 138:32.1936

SHANKS, N.; LAROCQUE, S.; MEANEY, M. J. Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: early illness and later responsivity to stress. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 1 Pt 1, p. 376-384, 1995.

SHANKS, N.; WINDLE, R. J.; PERKS, P. A.; HARBUZ, M. S.; JESSOP, D. S.; INGRAM, C. D.; LIGHTMAN, S. L. Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 10, p. 5645-5650, 2000.

SIMEN, B. B.; DUMAN, C. H.; SIMEN, A. A.; DUMAN, R. S. TNFalpha signaling in depression and anxiety: behavioral consequences of individual receptor targeting. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 9, p. 775-785, 2006.

SMITH, G. S.; KRAMER, E.; MA, Y.; KINGSLEY, P.; DHAWAN, V.; CHALY, T.; EIDELBERG, D. The functional neuroanatomy of geriatric depression. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 24, n. 8, p. 798-808, 2009.

SMITH, R. S. The macrophage theory of depression. **Medical Hypotheses**, v. 35, n. 4, p. 298-306, 1991.

SMYTH, G. P.; STAPLETON, P. P.; FREEMAN, T. A.; CONCANNON, E. M.; MESTRE, J. R.; DUFF, M.; MADDALI, S.; DALY, J. M. Glucocorticoid pretreatment induces cytokine overexpression and nuclear factor-kappaB activation in macrophages. **Journal of Surgical Research**, v. 116, n. 2, p. 253-261, 2004.

SOARES, J. C.; MANN, J. J. The anatomy of mood disorders--review of structural neuroimaging studies. **Biological Psychiatry**, v. 41, n. 1, p. 86-106, 1997.

SOLOMON, D. A.; KELLER, M. B.; LEON, A. C.; MUELLER, T. I.; LAVORI, P. W.; SHEA, M. T.; CORYELL, W.; WARSHAW, M.; TURVEY, C.; MASER, J. D.; ENDICOTT, J. Multiple recurrences of major depressive disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 2, p. 229-233, 2000.

SOTRES-BAYON, F.; DIAZ-MATAIX, L.; BUSH, D. E.; LEDOUX, J. E. Dissociable roles for the ventromedial prefrontal cortex and amygdala in fear extinction: NR2B contribution. **Cereb Cortex**, v. 19, n. 2, p. 474-482, 2009.

SPENCER, S. J.; AUER, R. N.; PITTMAN, Q. J. Rat neonatal immune challenge alters adult responses to cerebral ischaemia. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 26, n. 4, p. 456-467, 2006a.

SPENCER, S. J.; BOISSE, L.; MOUIHATE, A.; PITTMAN, Q. J. Long term alterations in neuroimmune responses of female rats after neonatal exposure to lipopolysaccharide. **Brain Behavior and Immunity**, v. 20, n. 4, p. 325-330, 2006b.

SPENCER, S. J.; HYLAND, N. P.; SHARKEY, K. A.; PITTMAN, Q. J. Neonatal immune challenge exacerbates experimental colitis in adult rats: potential role for TNF-alpha. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 1, p. R308-315, 2007.

SPENCER, S. J.; MARTIN, S.; MOUIHATE, A.; PITTMAN, Q. J. Early-life immune challenge: defining a critical window for effects on adult responses to immune challenge. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 9, p. 1910-1918, 2006c.

SPINEDI, E.; SUESCUN, M. O.; HADID, R.; DANEVA, T.; GAILLARD, R. C. Effects of gonadectomy and sex hormone therapy on the endotoxin-stimulated hypothalamo-pituitary-adrenal axis: evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. **Endocrinology**, v. 131, n. 5, p. 2430-2436, 1992.

SPITZER, J. A. Gender differences in some host defense mechanisms. **Lupus**, v. 8, n. 5, p. 380-383, 1999.

STAHL, S. M. The psychopharmacology of energy and fatigue. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 63, n. 1, p. 7-8, 2002.

STERNBERG, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 4, p. 318-328, 2006.

STOCKINGER, P.; KVITSIANI, D.; ROTKOPF, S.; TIRIAN, L.; DICKSON, B. J. Neural circuitry that governs *Drosophila* male courtship behavior. **Cell**, v. 121, n. 5, p. 795-807, 2005.

STOLL, B. J.; HANSEN, N.; FANAROFF, A. A.; WRIGHT, L. L.; CARLO, W. A.; EHRENKRANZ, R. A.; LEMONS, J. A.; DONOVAN, E. F.; STARK, A. R.; TYSON, J. E.; OH, W.; BAUER, C. R.; KORONES, S. B.; SHANKARAN, S.; LAPTOOK, A. R.; STEVENSON, D. K.; PAPILE, L. A.; POOLE, W. K. Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 4, p. 240-247, 2002a.

STOLL, B. J.; HANSEN, N.; FANAROFF, A. A.; WRIGHT, L. L.; CARLO, W. A.; EHRENKRANZ, R. A.; LEMONS, J. A.; DONOVAN, E. F.; STARK, A. R.; TYSON, J. E.; OH, W.; BAUER, C. R.; KORONES, S. B.; SHANKARAN, S.; LAPTOOK, A. R.; STEVENSON, D. K.; PAPILE, L. A.; POOLE, W. K. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. **Pediatrics**, v. 110, n. 2 Pt 1, p. 285-291, 2002b.

STOLL, B. J.; HANSEN, N. I.; ADAMS-CHAPMAN, I.; FANAROFF, A. A.; HINTZ, S. R.; VOHR, B.; HIGGINS, R. D. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. **JAMA**, v. 292, n. 19, p. 2357-2365, 2004.

STROHLE, A.; JAHN, H.; MONTKOWSKI, A.; LIEBSCH, G.; BOLL, E.; LANDGRAF, R.; HOLSBOER, F.; WIEDEMANN, K. Central and peripheral administration of atriopeptin is anxiolytic in rats. **Neuroendocrinology**, v. 65, n. 3, p. 210-215, 1997.

SUÁREZ, S.D; GALLUP, G.G. An ethological analysis of open-field behavior in rats and mice. **Learning and Motivation**, 12: 342-363; 1981.

SUMNER, B. E.; FINK, G. Effects of acute estradiol on 5-hydroxytryptamine and dopamine receptor subtype mRNA expression in female rat brain. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 83-92, 1993.

SUMNER, B. E.; GRANT, K. E.; ROSIE, R.; HEGELE-HARTUNG, C.; FRITZEMEIER, K. H.; FINK, G. Rabxifene blocks estradiol induction of the serotonin transporter and 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor in female rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 417, n. 1, p. 95-99, 2007.

TAKADA, M.; SUZUKI, A.; SHIMA, S.; INOUE, K.; KAZUKAWA, S.; HOJOH, M. Associations between lifestyle factors, working environment, depressive symptoms and suicidal ideation: a large-scale study in Japan. **Industrial Health**, v. 47, n. 6, p. 649-655, 2009.

TAKAHASHI, J. L.; GIULIANI, F.; POWER, C.; IMAI, Y.; YONG, V. W. Interleukin-1 β promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. **Annals of Neurology**, v. 53, n. 5, p. 588-595, 2003.

TEIXEIRA, R. M.; SANTOS, A. R.; RIBEIRO, S. J.; CALIXTO, J. B.; RAE, G. A.; DE LIMA, T. C. Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and

antagonists on plus-maze behavior in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 311, n. 1, p. 7-14, 1996.

TEKKOK, S. B.; RANSOM, B. R. Anoxia effects on CNS function and survival: regional differences. **Neurochemical Research**, v. 29, n. 11, p. 2163-2169, 2004.

TENK, C. M.; KAVALIERS, M.; OSSENKOPP, K. P. Sexually dimorphic effects of neonatal immune system activation with lipopolysaccharide on the behavioural response to a homotypic adult immune challenge. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 26, n. 3-4, p. 331-338, 2008.

TRENT, M. S.; STEAD, C. M.; TRAN, A. X.; HANKINS, J. V. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. **Journal of Endotoxin Research**, v. 12, n. 4, p. 205-223, 2006.

TURNBULL, A. V.; LEE, S.; RIVIER, C. Mechanisms of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stimulation by immune signals in the adult rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, n., p. 434-443, 1998.

ULLIAN, E. M.; SAPPERSTEIN, S. K.; CHRISTOPHERSON, K. S.; BARRES, B. A. Control of synapse number by glia. **Science**, v. 291, n. 5504, p. 657-661, 2001.

VAN WEST, D.; MAES, M. Activation of the inflammatory response system: A new look at the etiopathogenesis of major depression. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 20, n. 1-2, p. 11-17, 1999.

VANBESIEN-MAILLIOT, C. C.; WOLOWCZUK, I.; MAIRESSE, J.; VILTART, O.; DELACRE, M.; KHALIFE, J.; CHARTIER-HARLIN, M. C.; MACCARI, S. Prenatal stress has pro-inflammatory consequences on the immune system in adult rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 2, p. 114-124, 2007.

VILCEK, J.; LEE, T. H. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 12, p. 7313-7316, 1991.

VILTART, O.; VANBESIEN-MAILLIOT, C. C. Impact of prenatal stress on neuroendocrine programming. **ScientificWorldJournal**, v. 7, n., p. 1493-1537, 2007.

VOLPE, J. J. Subplate neurons--missing link in brain injury of the premature infant? **Pediatrics**, v. 97, n. 1, p. 112-113, 1996.

VOLPE, J. J. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. **Lancet Neurol**, v. 8, n. 1, p. 110-124, 2009.

WALKER, F. R.; BROGAN, A.; SMITH, R.; HODGSON, D. M. A profile of the immediate endocrine, metabolic and behavioural responses following a dual exposure to endotoxin in early life. **Physiology & Behavior**, v. 83, n. 3, p. 495-504, 2004a.

WALKER, F. R.; HODYL, N. A.; KRIVANEK, K. M.; HODGSON, D. M. Early life host-bacteria relations and development: long-term individual differences in neuroimmune function following neonatal endotoxin challenge. **Physiology & Behavior**, v. 87, n. 1, p. 126-134, 2006.

WALKER, F. R.; MARCH, J.; HODGSON, D. M. Endotoxin exposure in early life alters the development of anxiety-like behaviour in the Fischer 344 rat. **Behavioural Brain Research**, v. 154, n. 1, p. 63-69, 2004b.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WARAICH, P.; GOLDNER, E. M.; SOMERS, J. M.; HSU, L. Prevalence and incidence studies of mood disorders: a systematic review of the literature. **Can J Psychiatry**, v. 49, n. 2, p. 124-138, 2004.

WEISBERG, R. B. Overview of generalized anxiety disorder: epidemiology, presentation, and course. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 70 Suppl 2, n., p. 4-9, 2009.

WETTSTEIN, J. G.; EARLEY, B.; JUNIEN, J. L. Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 65, n. 3, p. 397-414, 1995.

WHIMBEY, A. E.; DENENBERG, V. H. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 63, n. 3, p. 500-504, 1967.

WICHERS, M.; MAES, M. The psychoneuroimmuno-pathophysiology of cytokine-induced depression in humans. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 375-388, 2002.

WICHERS, M. C.; KENIS, G.; KOEK, G. H.; ROBAEYS, G.; NICOLSON, N. A.; MAES, M. Interferon-alpha-induced depressive symptoms are related to changes in the cytokine network but not to cortisol. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 62, n. 2, p. 207-214, 2007.

WICHMANN, M. W.; AYALA, A.; CHAUDRY, I. H. Male sex steroids are responsible for depressing macrophage immune function after trauma-hemorrhage. **American Journal of Physiology**, v. 273, n. 4 Pt 1, p. C1335-1340, 1997.

WOOD, N. S.; MARLOW, N.; COSTELOE, K.; GIBSON, A. T.; WILKINSON, A. R. Neurologic and developmental disability after extremely preterm birth. EPICure Study Group. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 6, p. 378-384, 2000.

WOOTEN, G. F.; CURRIE, L. J.; BOVBJERG, V. E.; LEE, J. K.; PATRIE, J. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? **Journal of Neurology Neurosurgery & Psychiatry**, v. 75, n. 4, p. 637-639, 2004.

WU, M. V.; MANOLI, D. S.; FRASER, E. J.; COATS, J. K.; TOLLKUHN, J.; HONDA, S.; HARADA, N.; SHAH, N. M. Estrogen masculinizes neural pathways and sex-specific behaviors. **Cell**, v. 139, n. 1, p. 61-72, 2009.

YADIN, E.; THOMAS, E.; GRISHKAT, H. L.; STRICKLAND, C. E. The role of the lateral septum in anxiolysis. **Physiology & Behavior**, v. 53, n. 6, p. 1077-1083, 1993.

YARLAGADDA, A.; ALFSON, E.; CLAYTON, A. H. The blood brain barrier and the role of cytokines in neuropsychiatry. **Psychiatry (Edgmont)**, v. 6, n. 11, p. 18-22, 2009.

YIRMIYA, R.; AVITSUR, R.; DONCHIN, O.; COHEN, E. Interleukin-1 inhibits sexual behavior in female but not in male rats. **Brain Behavior and Immunity**, v. 9, n. 3, p. 220-233, 1995.

YOLKEN, R. Viruses and schizophrenia: a focus on herpes simplex virus. **Herpes**, v. 11 Suppl 2, n., p. 83A-88A, 2004.

ZANGEN, A.; ROTH, Y.; VOLLER, B.; HALLETT, M. Transcranial magnetic stimulation of deep brain regions: evidence for efficacy of the H-coil. **Clinical Neurophysiology**, v. 116, n. 4, p. 775-779, 2005.

ZEISBERGER, E.; ROTH, J. Tolerance to pyrogens. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 856, n., p. 116-131, 1998.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. **J Inflamm**, v. 45, n. 1, p. 13-26, 1995.

ZIMMERMANN, G. R.; AVERY, W.; FINELLI, A. L.; FARWELL, M.; FRASER, C. C.; BORISY, A. A. Selective amplification of glucocorticoid anti-inflammatory activity through synergistic multi-target action of a combination drug. **Arthritis Res Ther**, v. 11, n. 1, p. R12, 2009.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)