

A ativação imune materna como fator de risco para a esquizofrenia na fase adulta

Maternal immune activation as a risk factor for schizophrenia in adults

Running Title:

Vacinação pré-natal e esquizofrenia

Prenatal vaccination and schizophrenia

<sup>1</sup>Rafaela Rick Morais Carvalho, <sup>1</sup>Gabriel de Fáveri Saccon<sup>&</sup>, <sup>2</sup>Gustavo Antunes Mastella, <sup>3</sup>Amanda Kunz Godoi, <sup>3</sup>Isabela Hubbe, <sup>1,2</sup>Alexandra Ioppi Zugno.

<sup>1</sup>Curso de Medicina, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Av. Universitária, 1105 - Bairro Universitário CEP: 88806-000 - Criciúma-SC, Brasil.

<sup>2</sup>Psiquiatria Translacional, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Av. Universitária, 1105 - Bairro Universitário CEP: 88806-000 - Criciúma-SC, Brasil.

<sup>3</sup>Curso de Biomedicina, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Av. Universitária, 1105 - Bairro Universitário CEP: 88806-000 - Criciúma-SC, Brasil.

\*Autor correspondente: Alexandra Ioppi Zugno. Curso de Medicina, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Av. Universitária, 1105 - Bairro Universitário CEP: 88806-000 - Criciúma-SC, Brasil. [alz@unesc.net](mailto:alz@unesc.net)

<sup>&</sup>Todos os autores do presente estudo declaram que o segundo autor contribuiu da mesma forma que o primeiro autor.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** a patogênese da esquizofrenia ainda não está bem definida. Contudo, acredita-se que a Ativação Imune Materna (AIM) na gestação possa aumentar o risco de distúrbios psiquiátricos na prole. Sabendo que as infecções causam AIM, tem-se dúvida se a vacina contra influenza A teria capacidade de gerar os mesmos eventos. **OBJETIVO GERAL:** verificar a influência da AIM e da vacina contra Influenza A durante a gestação, sobre as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias nas estruturas cerebrais bulbo, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. **METODOLOGIA:** foram utilizadas as proles de ratas que, durante a gestação, receberam salina (controle), PolyI:C e vacina contra influenza A. A prole de cada grupo foi submetida, com 30 e 60 dias de vida, à quantificação dos níveis de interleucinas pró-inflamatórias  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) e Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), e anti-inflamatórias 10 (IL-10) e 4 (IL-4) em bulbo, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. **RESULTADOS:** PolyI:C provocou redução de citocinas anti-inflamatórias. A vacina, contudo, não demonstrou um padrão específico de alterações. **CONCLUSÃO:** a PolyI:C é um bom método para demonstrar a influência da AIM na vida pós-natal da prole. Porém, mais estudos são necessários para verificar a segurança da vacina no período pré-natal.

**Palavras Chaves:** esquizofrenia, pré-natal, vacinas contra influenza.

## INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é um transtorno mental grave e incapacitante<sup>1</sup>, cuja patogênese ainda não é totalmente conhecida<sup>2</sup>. É um distúrbio que tende a se manifestar no final da adolescência e no início da fase adulta<sup>3</sup>. Contudo, acredita-se que uma ativação imune materna (AIM) que ocorra durante a gestação, possa causar alterações na função cerebral de conceitos, aumentando o risco de desenvolvimento de distúrbios neuropsiquiátricos, entre eles a esquizofrenia<sup>4,5</sup>.

A AIM é caracterizada pelo aumento de citocinas, entre elas interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 8 (IL-8), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), e também proteína C reativa (PCR)<sup>6</sup>. Estas citocinas podem estar implicadas em atividade pró-inflamatória, como a IL-6, IL-1 $\beta$  e interferon C (IFN-c), ou anti-inflamatória como a interleucina 4 (IL-4), 13 (IL-13) e principalmente a 10 (IL-10), que é capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, a apresentação de antígenos e proliferação celular<sup>7</sup>.

No Sistema Nervoso central (SNC), as citocinas são capazes de interferir no processo de neurodesenvolvimento, podendo levar a alterações bioquímicas e anatômicas, gerando desequilíbrio no que tange a excitação e inibição neuronal, que por sua vez, levam a mudanças de comportamentos típicos de transtornos neuropsíquicos<sup>8</sup>. Assim, o excesso na síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias é capaz de levar a alterações de neurotransmissores no cérebro do feto<sup>9</sup>, em um período de suma importância, já que a formação de conexões sinápticas ocorre justamente durante o período pré-natal<sup>8</sup>.

Uma das alterações induzidas pela AIM, evidenciada em modelos animais pela injeção do análogo viral ácido policitidílico:poliosínico (PolyI:C), foi o atraso na

transição de ácido gama-amino-butírico (GABA) como agente despolarizante para hiperpolarizante, que ocorre no desenvolvimento fetal normal, o que aumentou a concentração intracelular de cloro e inibe a atividade do GABA<sup>10</sup>.

É sabido que a infecção materna, entre elas a infecção pelo vírus influenza, pode gerar ativação imune e ter estes mesmos efeitos<sup>11</sup>. Durante a pandemia de 2009, pôde-se observar que a infecção materna esteve associada a maior risco de abortos espontâneos, prematuridade, natimortos, doenças perinatais e morte<sup>12,13</sup>. Além disso, as gestantes são consideradas suscetíveis a infecção grave pelo vírus influenza, sendo consideradas um dos grupos de prioridade para vacinação<sup>14,15</sup>. Acredita-se que isso ocorra pelas mudanças imunológicas próprias da gestação<sup>16</sup>. Por isso, recomenda-se a vacina para todas as gestantes ou mulheres que irão gestar, durante as estações de alta incidência de influenza<sup>17,18</sup>. Porém, tem-se dúvida quanto à segurança da vacina, devido ao fato de que esta possa levar ao mesmo desfecho fetal que uma infecção propriamente dita<sup>18,19,20,21</sup>.

O presente estudo visa, portanto, verificar a influência da AIM sobre as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, avaliando a diferença nos níveis das mesmas através da infusão de salina, vacina contra influenza A (H1N1) e PolyI:C durante a gestação, nas seguintes estruturas cerebrais da prole: bulbo, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **ANIMAIS**

Foram utilizadas 36 ratas *Wistar* adultas, pesando entre 250g a 300g, as quais passaram por uma única noite de acasalamento. Os animais foram obtidos do Biotério da Universidade e mantidos em gaiolas em ciclos de 12h dia-noite, com alimentação e água disponível e temperatura controlada entre  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ . Cada fêmea foi mantida na mesma caixa com um macho durante um ciclo de 12h. Na manhã do dia seguinte foi realizado o esfregaço vaginal para análise de seu conteúdo e diagnóstico de prenhez. A presença de um espermatozoide e as características do ciclo estral das fêmeas confirmou o diagnóstico, que seria o dia zero de gestação. As ratas gestantes, então, foram divididas em três grupos:

- Grupo 1: Grupo de ratas prenhas denominado grupo controle (n = 12): neste grupo, no 9º dia de gestação, o qual equivale ao 1º trimestre de gravidez em humanos, foi aplicada uma solução salina estéril em dose única (0,5mL para cada rata), por via intraperitoneal (i.p.);
- Grupo 2: Grupo de ratas prenhas denominado grupo H1N1 (n = 12): neste grupo foi administrada a vacina contra influenza A (H1N1) em dose única (0,1 mL por rata), via i.p., também no 9º dia de gestação;
- Grupo 3: Grupo de ratas prenhas denominado grupo PolyI:C (n = 12): este grupo, no 9º dia de gestação, foi submetido a uma única injeção de PolyI:C na dose de 5 mg/kg via i.p.

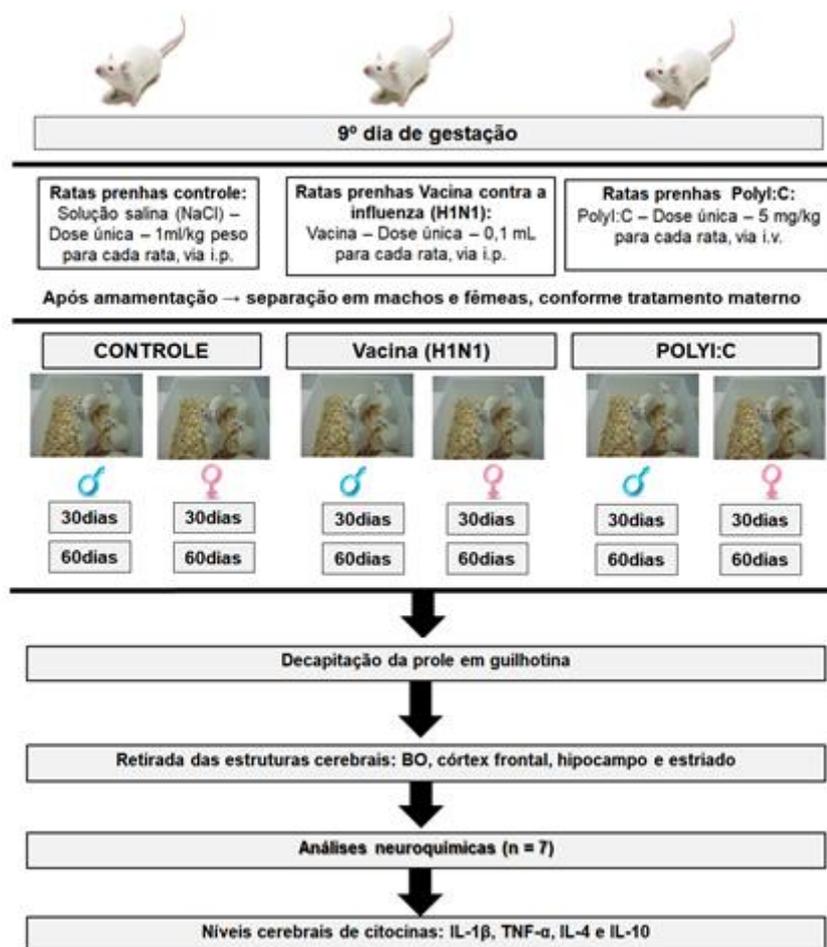
Em seguida à fase gestacional, os filhotes foram mantidos junto à mãe para a amamentação. Vinte e um dias após o nascimento, os mesmos foram submetidos ao desmame e à sexagem, sendo separados em machos e fêmeas, que foram divididos em três grupos: grupo controle com 11 machos e 9 fêmeas, grupo H1N1 com 11 machos e 9 fêmeas, grupo PolyI:C com 10 machos e 16 fêmeas, totalizando 32 machos e 34 fêmeas.

Após a amamentação, as mães anteriormente expostas aos procedimentos, foram submetidas à eutanásia por decapitação pelo biotério da Universidade por não terem mais utilidade para o presente estudo.

Com 30 e 60 dias de vida, 7 animais machos e 7 animais fêmeas de cada grupo foram eutanasiados e suas estruturas cerebrais (córtex frontal, hipocampo, estriado e BO) dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer - 80C° para posteriores análises bioquímicas dos marcadores inflamatórios: níveis cerebrais de IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-4, TNF- $\alpha$ . Para tais análises, foram utilizados 7 animais por grupo (n = 7).

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

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob o protocolo 038/2016-1 (Anexo).



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

## PROCEDIMENTOS

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

As ratas gestantes foram divididas em três grupos: controle, H1N1 e PolyI:C conforme apresentado acima. No 9º dia de gestação, o qual equivale ao 1º trimestre

de gravidez em humanos, as ratas de cada grupo foram submetidas, uma única vez, ao seu tratamento específico.

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

Nas ratas do grupo H1N1 foi aplicada única dose de 0,1mL por animal da vacina contra influenza A (Instituto Butantan) do tipo trivalente (fragmentada e inativada), sendo esta dose calculada com base no estudo de Xia et al. (2014a)<sup>22</sup>.

Nas ratas do grupo PolyI:C foi administrada uma única injeção de PolyI:C (Sal de potássio; *Sigma-Aldrich*, Brasil; P9582-5mg) na dose de 5 mg/kg, via i.p.. A PolyI:C foi diluída em solução isotônica de NaCl a 0,9% para alcançar uma concentração final de 1 mg/mL. A dose de PolyI: C foi baseada em estudos anteriores realizados, conforme dados da literatura<sup>23,24,25</sup>.

### **Análise bioquímica**

Foram selecionados aleatoriamente 6 ratos de cada grupo. Os níveis cerebrais de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-4 e TNF- $\alpha$ ) foram determinados através de Kits comerciais ELISA (*R&D Systems*), específicos para estas análises, seguindo as recomendações do fabricante.

### **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

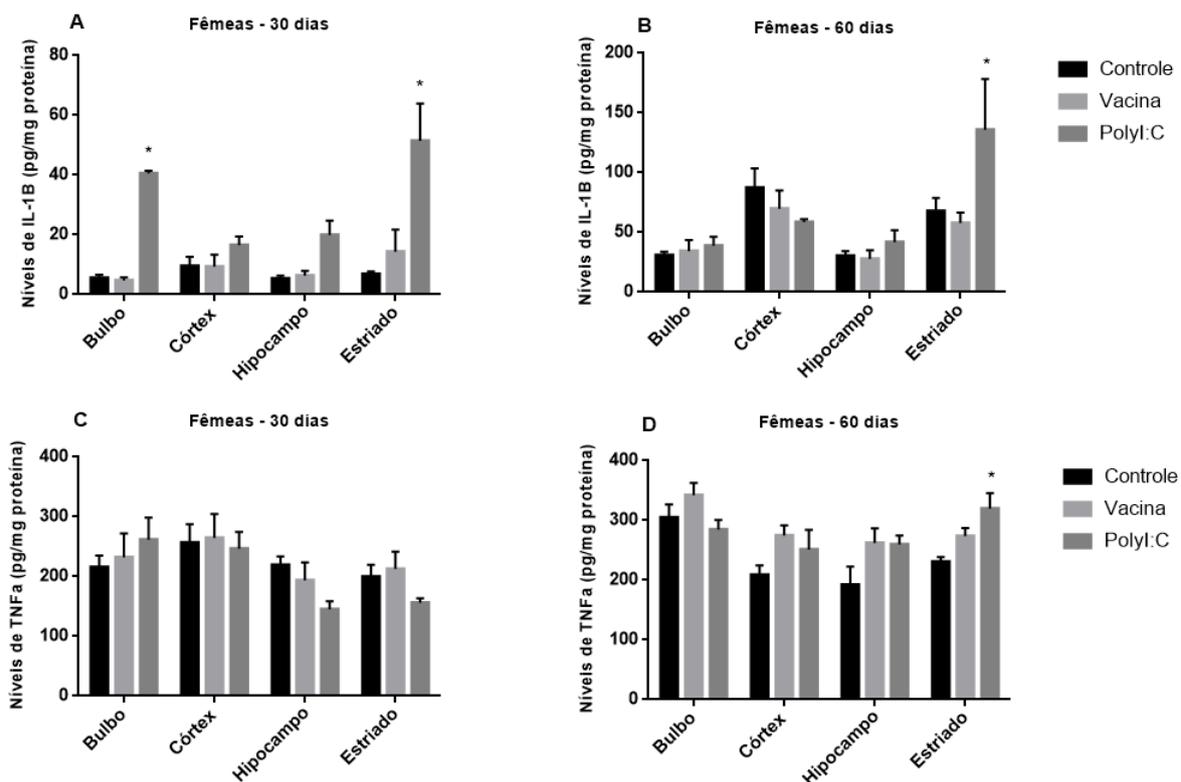
As análises neuroquímicas de citocinas da prole jovem-adulta, fêmeas e machos, foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) de uma via,

corrigido pelo teste robusto de *Welch*, quando o teste de *Levene* foi  $p < 0,05$ ; seguido pelo *post hoc Tukey* ou *C de Dunnet*, quando *F* foi significativo.

Em geral, os dados foram expressos como média ( $\pm$ ) e erro padrão da média (média  $\pm$  E.P.M). A significância estatística foi considerada para valores de  $p < 0,05$ . O teste de normalidade *Shapiro–Wilk* foi realizado para confirmar se os dados possuíam uma distribuição normal. As análises estatísticas foram realizadas através do programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS versão 20.0) e utilizou-se o programa *GraphPad Prism 5* para a elaboração dos gráficos.

## RESULTADOS

A Figura 2 apresenta os resultados referentes aos níveis cerebrais de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 $\beta$  (Fig. 2A e 2B) e TNF- $\alpha$  (Fig. 2C e 2D), nas ratas fêmeas de 30 e 60 dias, respectivamente, cujas mães foram tratadas com salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Para as fêmeas de 30 dias do grupo PolyI:C, se observou uma diferença significativa nos níveis de IL-1 $\beta$  no BO [ $F_{(2,9)} = 439,880$ ;  $p < 0,01$ ] e estriado [ $F_{(2,9)} = 5,632$ ;  $p < 0,05$ ], pois houve um aumento dessa citocina pró-inflamatória nestas estruturas cerebrais (Fig. 2A). Também se verificou maiores concentrações de TNF- $\alpha$  no estriado das ratas fêmeas de 60 dias do grupo PolyI:C [ $F_{(2,12)} = 0,793$ ;  $p < 0,05$ ], revelando um aumento da inflamação nessa região cerebral (Fig. 2D).

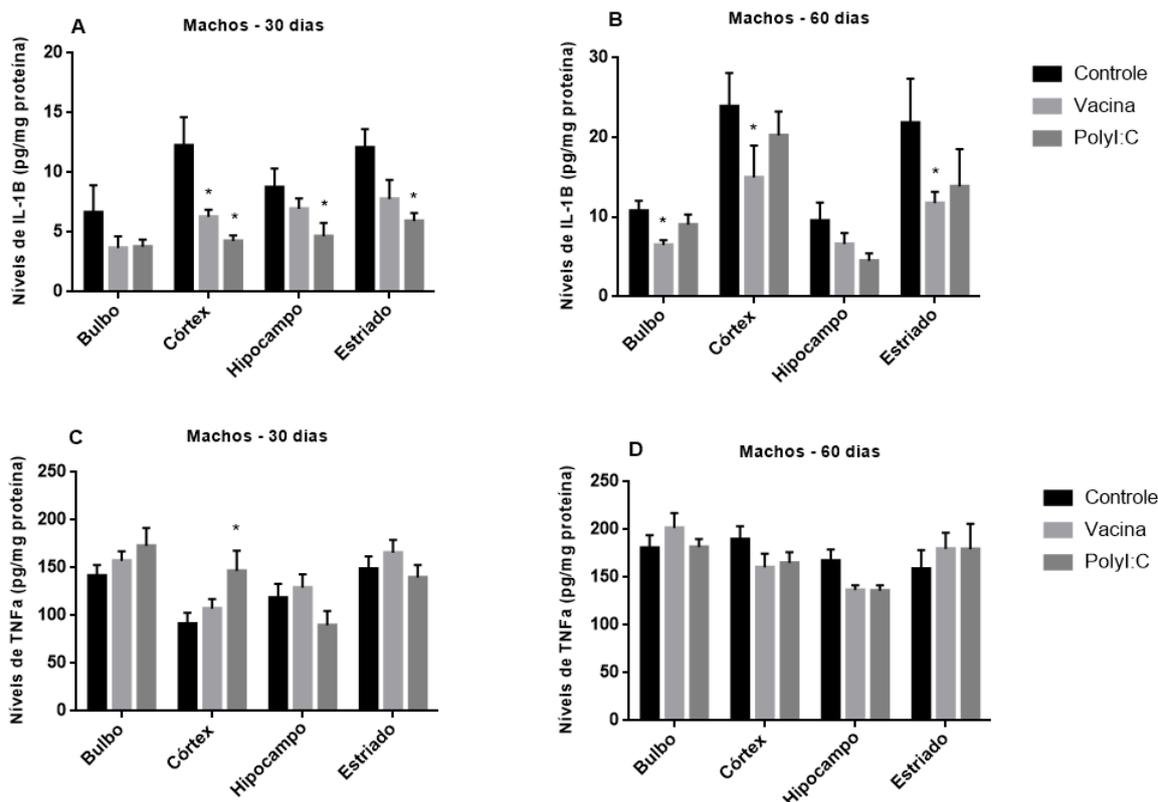


**Figura 2:** Análise dos níveis de interleucina 1β (IL-1β) (Fig. 2A e 2B) e de fator de necrose tumoral α (TNF-α) (Fig. 2C e 2D) nas estruturas cerebrais: BO, córtex frontal, hipocampo e estriado da prole de fêmeas aos 30 e 60 dias, cujas mães receberam os tratamentos: salina, Vacina (H1N1) ou ácido policitidílico:poliosínico (PolyI:C) durante a gestação. Os valores foram expressos como média ± EPM, sendo considerados significativos valores de  $p < 0,05$ ,  $n = 7$ . \*diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2018.

Na Figura 3 são apresentados os níveis cerebrais de citocinas pró-inflamatórias, IL-1β (Fig. 3A e 3B) e TNF-α (Fig. 3C e 3D), nos ratos machos de 30 e 60 dias, respectivamente, cujas mães foram tratadas com salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Para os ratos machos de 30 dias do grupo PolyI:C, a Figura 3A aponta uma diferença estatística para os níveis de IL-1β no córtex frontal [ $F(2,11) = 7,009$ ;  $p < 0,05$ ], hipocampo [ $F(2,13) = 2,291$ ;  $p < 0,05$ ] e estriado [ $F(2,10) = 5,873$ ;  $p < 0,05$ ], estruturas cerebrais em que houve redução dos níveis desta citocina pró-inflamatória quando comparado ao grupo controle. De modo similar, houve uma

diminuição nas concentrações de IL-1 $\beta$  no córtex cerebral [ $F_{(2,11)} = 7,009$ ;  $p < 0,05$ ] de ratos machos de 30 dias do grupo vacina (Fig. 3A). Ainda se verificou um aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  no córtex cerebral [ $F_{(2,12)} = 3,588$ ;  $p < 0,05$ ] de ratos machos de 30 dias do grupo PolyI:C (Fig. 3C), o que indica uma neuroinflamação, ao menos nessa área cerebral, nestes animais jovens.

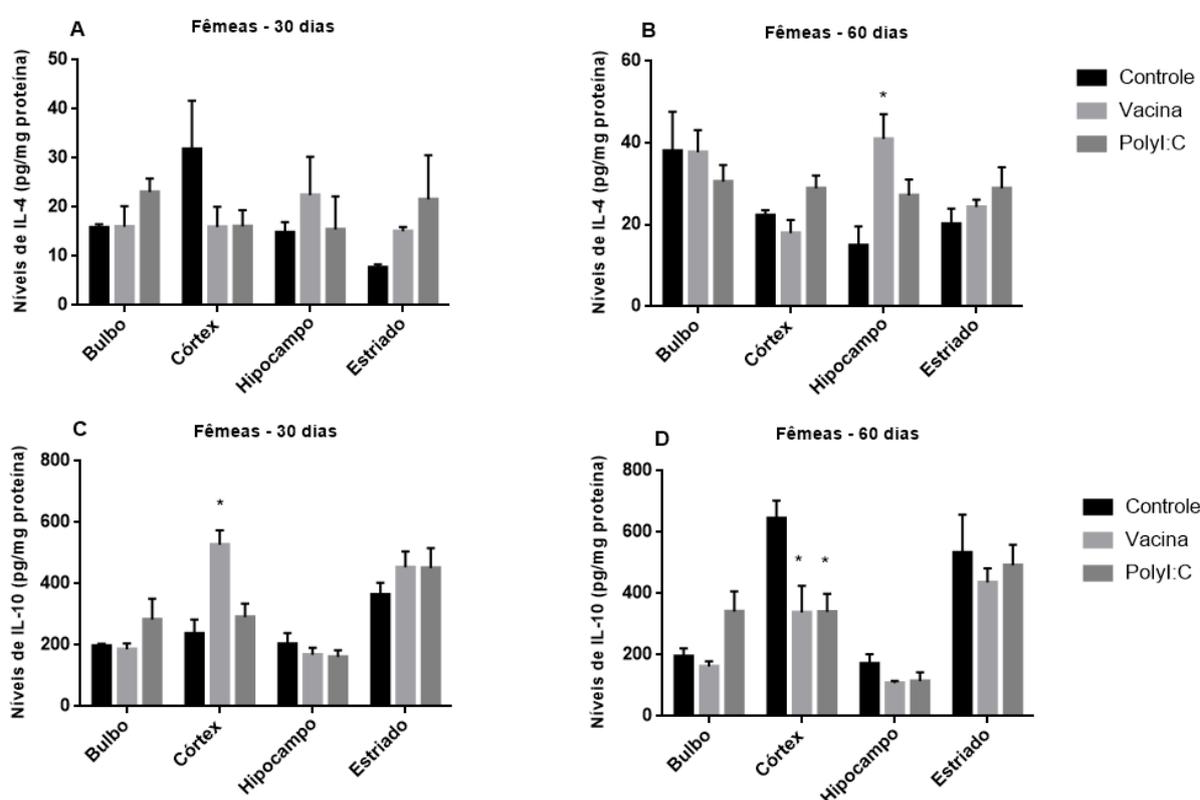
Para os ratos machos de 60 dias do grupo vacina, a Figura 3B demonstra que houve uma diferença significativa nos níveis de IL-1 $\beta$  no BO [ $F_{(2,12)} = 3,965$ ;  $p < 0,05$ ], córtex frontal [ $F_{(2,9)} = 4,119$ ;  $p < 0,05$ ] e estriado [ $F_{(2,11)} = 3,258$ ;  $p < 0,05$ ] dos animais adultos, apontando uma diminuição nos níveis desta citocina pró-inflamatória nas três estruturas cerebrais avaliadas quando comparado ao grupo controle.



**Figura 3:** Análise dos níveis de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Fig. 3A e 3B) e de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Fig. 3C e 3D) nas estruturas cerebrais: BO, córtex frontal, hipocampo e estriado da prole de machos aos 30 e 60 dias, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou ácido policitidílico:poliosínico (PolyI:C) durante a gestação. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM,

sendo considerados significativos valores de  $p < 0,05$ ,  $n=7$ . \*diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2018.

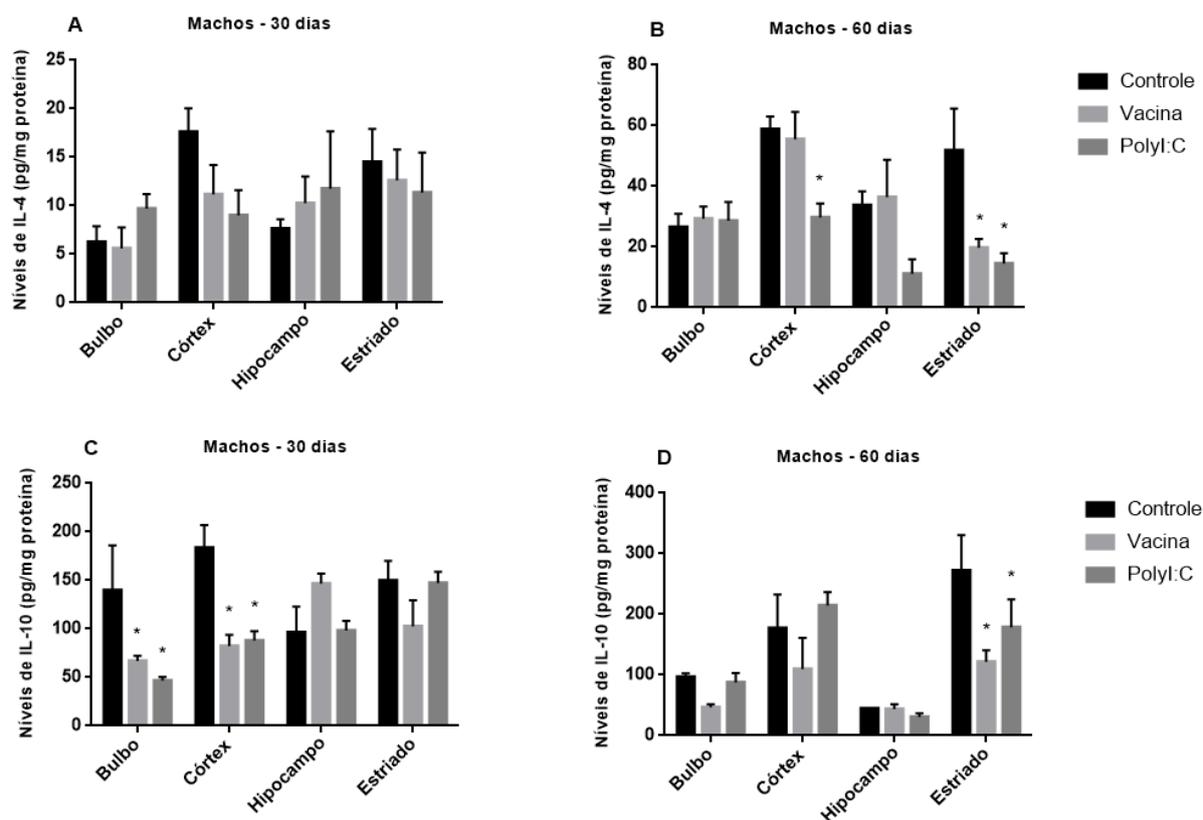
Os dados das citocinas anti-inflamatórias estão representados na Figura 4, a qual aponta os níveis de IL-4 (Fig. 4A e 4B) e de IL-10 (Fig. 4C e 4D) nas ratas fêmeas de 30 e 60 dias, respectivamente, cujas mães receberam salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Em geral, houve uma diferença estatística nos níveis de IL-4 hipocampal [ $F_{(2,14)} = 5,488$ ;  $p < 0,05$ ] apenas para as ratas fêmeas de 60 dias do grupo vacina (Fig. 4B) quando comparado ao grupo controle, uma vez que houve aumento nos níveis desta citocina anti-inflamatória. As ratas fêmeas de 30 dias do grupo vacina também apresentaram um aumento nas concentrações de IL-10 [ $F_{(2,12)} = 5,964$ ;  $p < 0,05$ ] no córtex frontal, conforme ilustrado na Figura 4C. Nas fêmeas de 60 dias (Fig. 4D), nesta mesma estrutura cerebral, foi observada uma diminuição nos níveis de IL-10 para os animais dos grupos vacina e PolyI:C [ $F_{(2,9)} = 7,103$ ;  $p < 0,05$ ].



**Figura 4:** Análise dos níveis de interleucina 4 (IL-4) (Fig. 4A e 4B) e de interleucina 10 (IL-10) (Fig. 4C e 4D) nas estruturas cerebrais: BO, córtex frontal, hipocampo e estriado da prole de fêmeas aos 30 e 60 dias, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 ou ácido policitídílico:poliosínico (PolyI:C) durante a gestação. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM, sendo considerados significativos valores de  $p < 0,05$ ,  $n=7$ . \*diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2018.

A Figura 5 retrata as concentrações cerebrais de IL-4 (Fig. 5A e 5B) e IL-10 (Fig. 5C e 5D) nos ratos machos de 30 e 60 dias, respectivamente, cujas mães foram tratadas com salina, vacina (H1N1) ou PolyI:C durante a gestação. Conforme apontado na Figura 5C houve diferença estatística para os machos de 30 dias quanto aos níveis de IL-10, os quais diminuíram nos animais dos grupos vacina e PolyI:C, respectivamente, no BO [ $F_{(2,14)} = 3,514$ ;  $p < 0,05$ ] e córtex cerebral [ $F_{(2,12)} = 8,350$ ;  $p < 0,05$ ].

Para os ratos machos de 60 dias, a Figura 5B indica uma redução significativa nos níveis de IL-4 no córtex frontal [ $F_{(2,13)} = 6,766$ ;  $p < 0,05$ ] e estriado [ $F_{(2,14)} = 6,714$ ;  $p < 0,05$ ] dos animais do grupo PolyI:C. Também se observou uma diminuição nos níveis de IL-4 [ $F_{(2,14)} = 6,714$ ;  $p < 0,05$ ] e IL-10 [ $F_{(2,8)} = 4,678$ ;  $p < 0,05$ ], porém apenas no estriado, de ratos machos adultos do grupo vacina em relação ao grupo controle.



**Figura 5:** Análise dos níveis de interleucina 4 (IL-4) (Fig. 5A e 5B) e de interleucina 10 (IL-10) (Fig. 5C e 5D) nas estruturas cerebrais: BO, córtex frontal, hipocampo e estriado da prole de machos aos 30 e 60 dias, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou ácido policitidílico:poliosínico (PolyI:C) durante a gestação. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM, sendo considerados significativos valores de  $p < 0,05$ ,  $n=7$ . \*diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2018.

## DISCUSSÃO

Nossos resultados sugerem que a AIM induzida pela PolyI:C gera anormalidades cerebrais a longo prazo, semelhantes ao que ocorre na esquizofrenia. Dentre essas alterações, destacam-se as alterações nos níveis cerebrais de citocinas da prole estudada, que pode ser responsável por afetar a função cerebral durante o período fetal e também pós-fetal, principalmente no momento em que as vias neuronais são elaboradas<sup>26</sup>.

Nosso estudo buscou induzir a AIM através da PolyI:C, uma vez que está claro na literatura a sua capacidade de causar alterações inflamatórias, como por exemplo, o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, semelhante ao que ocorre em resposta a infecção viral<sup>27,28</sup>, mais especificamente, a exposição materna à infecção pelo vírus influenza<sup>29</sup>. Em consonância com isso, Macêdo e colaboradores (2012) afirmam que a PolyI:C é capaz de causar alterações que mimetizam o pró-dromo e os sintomas da esquizofrenia<sup>30</sup>.

Para verificar as alterações nos níveis de citocinas pela AIM induzida por PolyI:C, nosso estudo comparou os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) nas estruturas cerebrais bulbo olfatório, córtex frontal, hipocampo e estriado na prole de fêmeas e machos de ratas *Wistar*, que foram submetidas tanto à vacinação contra influenza A (H1N1) e à indução de infecção com a PolyI:C durante a gestação.

De acordo com dados epidemiológicos de diversos estudos, a esquizofrenia tende a se manifestar no final da adolescência e início da idade adulta<sup>3,31,32</sup>. Em conformidade com isso, nosso estudo analisou os níveis de citocinas nos dias 30 e 60, de forma semelhante ao estudo realizado por Macêdo e colaboradores (2012) que afirmam que a adolescência em roedores ocorre entre os dias 28 a 35 no pós-natal e a idade adulta tem início a partir do dia 56 pós-natal<sup>30</sup>. Além disso, vale destacar que a injeção de PolyI:C tende a provocar alterações a longo prazo, que só irão se manifestar na prole adulta, seguindo o padrão epidemiológico<sup>26,28,30</sup>.

Nossos resultados apontam um aumento nos níveis de IL-1 $\beta$  no BO e estriado das ratas fêmeas de 30 dias, bem como maiores concentrações de IL-1 $\beta$  e

TNF- $\alpha$  no estriado das fêmeas de 60 dias, sendo estas alterações observadas no grupo que recebeu PolyI:C.

Com relação aos animais machos de 30 dias do grupo que recebeu PolyI:C houve redução nos níveis de IL-1 $\beta$  no córtex frontal, hipocampo e estriado, e aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  no córtex frontal.

Analisando as citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) nos animais do grupo PolyI:C, não foram encontradas alterações significativas nos níveis de IL-4 nas ratas fêmeas de 30 e 60 dias no grupo que recebeu PolyI:C. Porém, com relação a IL-10, nas fêmeas de 60 dias, houve redução nos níveis de IL-10 no córtex frontal tanto no grupo que recebeu a vacina quanto no grupo que recebeu PolyI:C, enquanto que nas fêmeas de 30 dias houve aumento de IL-10 no córtex frontal do grupo que recebeu a vacina. Nos ratos machos, verificou-se redução nas concentrações de IL-10 no BO e córtex frontal de ratos de 30 dias que receberam a PolyI:C e a vacina, houve também a diminuição de IL-10 no estriado de ratos de 60 dias em ambos os grupos. Com relação a IL-4, seus níveis diminuíram no córtex frontal e no estriado de machos de 60 dias do grupo PolyI:C.

Assim, verificamos que as citocinas pró-inflamatórias mostraram resultados com padrões diferentes em machos e fêmeas de 30 e 60 dias. Nossos resultados estão de acordo com o estudo desenvolvido por Garay e colaboradores (2013), e também por Estes e McAllister (2016), que ao analisarem os níveis de citocinas cerebrais na prole verificaram que a concentração dessas no cérebro em desenvolvimento mudam com a idade e de acordo com a região em que são analisadas<sup>4,33</sup>. A justificativa para isso seria o fato de que as citocinas participam de mecanismos de feedbacks, regulando umas às outras afim de se manterem dentro de uma faixa homeostática. Assim, pode-se afirmar que a neuroinflamação causada pelo

aumento de citocinas no período pré-natal leve a efeitos crônicos, e tais efeitos acabam interagindo com outros estressores que surgem ao longo do desenvolvimento<sup>4,28,33,34</sup>.

Além disso, nossos resultados mostram que as alterações de citocinas também se apresentam em diferentes padrões de acordo com o sexo da prole. Tais diferenças eram esperadas, já que o desenvolvimento cerebral normal sofre influência dos hormônios sexuais durante a organização dos circuitos neuronais. Portanto, deve-se esperar também que o insulto pré-natal leve à modificações hormonais diferentes de acordo com o sexo, além do que esses hormônios agem em locais diferentes de acordo com esse fator<sup>34</sup>. Verificamos também que os machos apresentaram tendência maior à diminuição dos níveis de citocinas anti-inflamatórias, tanto no grupo vacina quanto no grupo PolyI:C, quando comparado ao grupo controle. Isso vai de acordo com alguns dos poucos estudos disponíveis que afirmam que os ratos machos são mais sensíveis ao período pré-natal do que as fêmeas, sendo estas mais sensíveis aos estresses do período pós-natal. Isso ocorre pelo fato de os machos apresentarem desenvolvimento cortical cerebral muito mais lento do que as fêmeas, o que torna o cérebro masculino mais suscetível a insultos por um período mais longo<sup>34,35</sup>.

Em um estudo realizado por Garay e colaboradores (2013), em que foram verificados os níveis de diversas citocinas, concluiu-se que AIM levou à mudanças crônicas nos níveis de citocinas cerebrais da prole, principalmente nas regiões do córtex frontal, córtex cingulado e hipocampo, sendo que o córtex frontal e hipocampo foram as regiões que apresentaram elevação dos níveis de citocinas, principalmente as pró-inflamatórias<sup>33</sup>. Esses aumentos seguiram o seguinte padrão: aumento ao nascimento, seguido de redução nos dias 14 e 30, e novo aumento por volta do dia 60. Tais resultados vão em conformidade com o nosso estudo, uma vez que o córtex

frontal também foi a região que apresentou alterações de significância das citocinas pró-inflamatórias.

Adicionalmente, nosso estudo encontrou que as citocinas anti-inflamatórias estudadas (IL-4 e IL-10) tiveram seus níveis diminuídos nos machos de 30 e 60 dias no BO, córtex e estriado, prole esta cujas mães receberam PolyI:C. Isso também está parcialmente de encontro aos dados obtidos por Garay e colaboradores (2013), que demonstrou que essa redução foi maior no córtex frontal<sup>33</sup>.

Estudos indicam que a AIM leve à estimulação da micróglia<sup>36</sup>, que por sua vez é responsável por grande parte da produção de citocinas<sup>37</sup> e que estas levam a alterações de neurotransmissores<sup>38</sup>.

Outros estudos mostram que o córtex frontal e o estriado, de pacientes com esquizofrenia, foram as regiões que apresentaram alterações significativas nos neurotransmissores glutamato e dopamina<sup>32,39</sup>. Acreditamos, portanto, que os nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura, uma vez que o córtex frontal juntamente com o estriado, foram as regiões que tiveram as maiores alterações nas citocinas quando foi administrada a PolyI:C. Mais especificamente, com relação as citocinas pró-inflamatórias, nas fêmeas de 30 dias houve aumento da IL-1 $\beta$  no estriado e BO, nas de 60 dias houve também um aumento da IL-1 $\beta$  no estriado além do aumento de TNF- $\alpha$  nessa mesma estrutura. Já nos machos de 30 dias houve aumento de TNF- $\alpha$  no córtex frontal. Em comparação, a diminuição de IL-1 $\beta$  no grupo que recebeu a vacina também ocorreu nas regiões citadas, mais especificamente no córtex dos machos de 30 dias e no córtex, BO e estriado dos machos de 60 dias.

Por fim, estudo realizado por Xia e colaboradores (2014) buscou comparar os impactos da vacinação contra influenza H1N1, vacina contra influenza sazonal e grupo controle (grupo com AIM). Nesse estudo, foi verificado que a prole, cujas mães

receberam a vacina contra influenza H1N1, apresentou bloqueio no comprometimento cognitivo que é normalmente induzido pela AIM. Foi verificado também que ambas as vacinas administradas promoveram neurogênese e melhora na função comportamental, e que isso ocorreu devido ao aumento de citocinas anti-inflamatória em contraste com a diminuição das pró-inflamatórias (entre elas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ )<sup>22</sup>. Esses resultados estão parcialmente de acordo com o presente estudo, pois também ocorreu a redução de IL-1 $\beta$  no córtex frontal, no BO e estriado dos ratos machos de 60 dias e redução de IL-1 $\beta$  no córtex frontal dos ratos machos de 30 dias do grupo que recebeu a vacina. Além disso, nos machos com 60 dias, a vacina teve uma tendência a diminuição menor da IL-4 no córtex e no estriado quando comparada ao grupo que recebeu PolyI:C. Nas ratas fêmeas de 30 dias, observou-se aumento de IL-10 no córtex no grupo que recebeu a vacina. Já as ratas de 60 dias do grupo que recebeu a vacina apresentaram aumento da IL-4 no hipocampo, em comparação com os grupos controle e PolyI:C. Acreditamos que isso ocorra devido a uma tendência benéfica da vacina, pois o aumento da IL-10 e IL-4 leva à supressão dos efeitos da AIM no comportamento da prole<sup>40</sup>. Já a IL-1 $\beta$  em altos níveis pode levar a déficits cognitivos observados na esquizofrenia<sup>37</sup>.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, verificamos que a neuroinflamação causada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias leva a efeitos crônicos, que acompanharão a prole ao longo de todo o seu desenvolvimento. Verificamos também que os machos são mais suscetíveis ao estresse do período pré-natal do que as fêmeas. Por fim, concluímos também que a vacinação contra influenza A H1N1 apresenta tendência a promover

neuroproteção. Porém com os resultados apresentados, não é possível afirmar essa hipótese, sendo necessários novos estudos para confirmar esta tendência.

## **SEÇÃO DE AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi resultado de uma longa jornada, em que muitas pessoas fizeram parte.

Agradecemos, primeiramente, a Deus, por nos guiar nos momentos de dificuldade, em que a dúvida e a insegurança superaram a paciência.

Aos nossos amados pais, Eraldo José Saccon, Luciana de Fáveri Saccon, Izabel Maria de Moraes, pelo amor e pelo incentivo.

À minha irmã Izabela Rick Moraes Carvalho, pelo incentivo constante apesar da distância.

À professora Alexandra Ioppi Zugno, pela oportunidade de nos orientar neste trabalho, sua disponibilidade e atenção às dificuldades apresentadas. MUITÍSSIMO OBRIGADOS! Ao nosso coorientador e amigo, Gustavo Antunes Mastella, pelo suporte e disposição oferecidos.

## **REFERÊNCIAS**

1. García-Ruiz A, Pérez-Costillas L, Montesinos A, Alcalde J, Oyagüez I, Casado M. Cost-effectiveness analysis of antipsychotics in reducing schizophrenia relapses. *Health Economics Review*. 2012;2(1):8.
2. Sekar A, Bialas A, de Rivera H, Davis A, Hammond T, Kamitaki N et al. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature*. 2016;530(7589):177-183.

3. Hadar R, Soto-Montenegro M, Götz T, Wieske F, Sohr R, Desco M et al. Using a maternal immune stimulation model of schizophrenia to study behavioral and neurobiological alterations over the developmental course. *Schizophrenia Research*. 2015;166(1-3):238-247.

4. Estes M, McAllister A. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science*. 2016;353(6301):772-777.

5. Vojtechova I, Petrasek T, Maleninska K, Brozka H, Tejkalova H, Horacek J et al. Neonatal immune activation by lipopolysaccharide causes inadequate emotional responses to novel situations but no changes in anxiety or cognitive behavior in Wistar rats. *Behavioural Brain Research*. 2018;349:42-53.

6. Knuesel I, Chicha L, Britschgi M, Schobel S, Bodmer M, Hellings J et al. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nature Reviews Neurology*. 2014;10(11):643-660.

7. Saxena A, Khosraviani S, Noel S, Mohan D, Donner T, Hamad A. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*. 2015;74(1):27-34.

8. Scola G, Duong A. Prenatal maternal immune activation and brain development with relevance to psychiatric disorders. *Neuroscience*. 2017;346:403-408.

9. Demjaha A, MacCabe J, Murray R. How Genes and Environmental Factors Determine the Different Neurodevelopmental Trajectories of Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Schizophrenia Bulletin*. 2011;38(2):209-214.

10. Corradini I, Focchi E, Rasile M, Morini R, Desiato G, Tomasoni R et al. Maternal Immune Activation Delays Excitatory-to-Inhibitory Gamma-Aminobutyric Acid Switch in Offspring. *Biological Psychiatry*. 2018;83(8):680-691.

11. Brown A. Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. *Developmental Neurobiology*. 2012;72(10):1272-1276.

12. Michaan N, Amzallag S, Laskov I, Cohen Y, Fried M, Lessing J et al. Maternal and neonatal outcome of pregnant women infected with H1N1 influenza virus (Swine Flu). *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2011;25(2):130-132.

13. Pierce M, Kurinczuk J, Spark P, Brocklehurst P, Knight M. Perinatal outcomes after maternal 2009/H1N1 infection: national cohort study. *BMJ*. 2011;342(jun14 2):d3214-d3214.
14. Nunes M, Madhi S. Review on the effects of influenza vaccination during pregnancy on preterm births. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2015;11(11):2538-2548.
15. Fisher B, Scott J, Hart J, Winn V, Gibbs R, Lynch A. Behaviors and perceptions regarding seasonal and H1N1 influenza vaccination during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011;204(6):S107-S111.
16. Chavant F, Ingrand I, Jonville-Bera A, Plazanet C, Gras-Champel V, Lagarce L et al. The PREGVAXGRIP Study: a Cohort Study to Assess Foetal and Neonatal Consequences of In Utero Exposure to Vaccination Against A(H1N1)v2009 Influenza. *Drug Safety*. 2013;36(6):455-465.
17. Grohskopf L, Sokolow L, Broder K, Walter E, Bresee J, Fry A et al. Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices — United States, 2017–18 Influenza Season. *MMWR Recommendations and Reports*. 2017;66(2):1-20.
18. Mertz D, Geraci J, Winkup J, Gessner B, Ortiz J, Loeb M. Pregnancy as a risk factor for severe outcomes from influenza virus infection: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Vaccine*. 2017;35(4):521-528.
19. Jamieson D, Honein M, Rasmussen S, Williams J, Swerdlow D, Biggerstaff M et al. H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. *The Lancet*. 2009;374(9688):451-458.
20. De Wals P, Deceuninck G, Toth E, Boulianne N, Brunet D, Boucher R et al. Risk of Guillain-Barré Syndrome Following H1N1 Influenza Vaccination in Quebec. *JAMA*. 2012;308(2):175-181.
21. Bednarczyk R, Adjaye-Gbewonyo D, Omer S. Safety of influenza immunization during pregnancy for the fetus and the neonate. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2012;207(3):S38-S46.

22. Xia Y, Qi F, Zou J, Yang J, Yao Z. Influenza vaccination during early pregnancy contributes to neurogenesis and behavioral function in offspring. *Brain, Behavior and Immunity*. 2014b;42:212-221.
23. Meyer U, Feldon J, Schedlowski M, Yee B. Towards an immuno-precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2005;29(6):913-947.
24. Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, Yee BK, Feldon J. The Time of Prenatal Immune Challenge Determines the Specificity of Inflammation-Mediated Brain and Behavioral Pathology. *Journal of Neuroscience*. 2006;26(18):4752-4762.
25. Meyer U, Schwendener S, Feldon J, Yee B. Prenatal and postnatal maternal contributions in the infection model of schizophrenia. *Experimental Brain Research*. 2006;173(2):243-257.
26. Boksa P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2010;24(6):881-897.
27. Winter C, Djodari-Irani A, Sohr R, Morgenstern R, Feldon J, Juckel G et al. Prenatal immune activation leads to multiple changes in basal neurotransmitter levels in the adult brain: implications for brain disorders of neurodevelopmental origin such as schizophrenia. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2008;12(04):513.
28. Anderson G, Maes M. Schizophrenia: Linking prenatal infection to cytokines, the tryptophan catabolite (TRYCAT) pathway, NMDA receptor hypofunction, neurodevelopment and neuroprogression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2013;42:5-19.
29. Christian L, Porter K, Karlsson E, Schultz-Cherry S, Iams J. Serum Proinflammatory Cytokine Responses to Influenza Virus Vaccine among Women during Pregnancy versus Non-Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2013;70(1):45-53.
30. Macêdo D, Araújo D, Sampaio L, Vasconcelos S, Sales P, Sousa F. Animal models of prenatal immune challenge and their contribution to the study of schizophrenia: a systematic review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2019;45(3):179-186.

31. Reisinger S, Khan D, Kong E, Berger A, Pollak A, Pollak D. The Poly(I:C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics*. 2015;149:213-226.
32. Rao J, Kellom M, Reese E, Rapoport S, Kim H. RETRACTED: Dysregulated glutamate and dopamine transporters in postmortem frontal cortex from bipolar and schizophrenic patients. *Journal of Affective Disorders*. 2012;136(1-2):63-71.
33. Garay P, Hsiao E, Patterson P, McAllister A. Maternal immune activation causes age- and region-specific changes in brain cytokines in offspring throughout development. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2013;31:54-68.
34. Schwendener S, Meyer U, Feldon J. Deficient maternal care resulting from immunological stress during pregnancy is associated with a sex-dependent enhancement of conditioned fear in the offspring. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*. 2008;1(1):15-32.
35. Weinstock M. Gender Differences in the Effects of Prenatal Stress on Brain Development and Behaviour. *Neurochemical Research*. 2007;32(10):1730-1740.
36. Monji A, Kato T, Kanba S. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2009;63(3):257-265.
37. Fillman S, Cloonan N, Catts V, Miller L, Wong J, McCrossin T et al. Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Molecular Psychiatry*. 2012;18(2):206-214.
38. Müller N, Weidinger E, Leitner B, Schwarz M. The role of inflammation in schizophrenia. *Frontiers in Neuroscience*. 2015;9.
39. Kegeles L, Abi-Dargham A, Frankle W, Gil R, Cooper T, Slifstein M et al. Increased Synaptic Dopamine Function in Associative Regions of the Striatum in Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*. 2010;67(3):231.
40. Deverman B, Patterson P. Cytokines and CNS Development. *Neuron*. 2009;64(1):61-78.

## LEGENDA DE FIGURAS

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

**Figura 2:** Análise dos níveis de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Fig. 2A e 2B) e de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Fig. 2C e 2D) nas estruturas cerebrais: BO, córtex frontal, hipocampo e estriado da prole de fêmeas aos 30 e 60 dias, cujas mães receberam os tratamentos: salina, Vacina (H1N1) ou ácido policitidílico:poliosínico (PolyI:C) durante a gestação. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM, sendo considerados significativos valores de  $p < 0,05$ ,  $n=7$ . \*diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2018.

**Figura 3:** Análise dos níveis de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Fig. 3A e 3B) e de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Fig. 3C e 3D) nas estruturas cerebrais: BO, córtex frontal, hipocampo e estriado da prole de machos aos 30 e 60 dias, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou ácido policitidílico:poliosínico (PolyI:C) durante a gestação. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM, sendo considerados significativos valores de  $p < 0,05$ ,  $n=7$ . \*diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2018.

**Figura 4:** Análise dos níveis de interleucina 4 (IL-4) (Fig. 4A e 4B) e de interleucina 10 (IL-10) (Fig. 4C e 4D) nas estruturas cerebrais: BO, córtex frontal, hipocampo e estriado da prole de fêmeas aos 30 e 60 dias, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina H1N1 ou ácido policitidílico:poliosínico (PolyI:C) durante a gestação. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM, sendo considerados significativos valores de  $p < 0,05$ ,  $n=7$ . \*diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2018.

**Figura 5:** Análise dos níveis de interleucina 4 (IL-4) (Fig. 5A e 5B) e de interleucina 10 (IL-10) (Fig. 5C e 5D) nas estruturas cerebrais: BO, córtex frontal, hipocampo e estriado da prole de machos aos 30 e 60 dias, cujas mães receberam os tratamentos: salina, vacina (H1N1) ou ácido policitidílico:poliosínico

(PolyI:C) durante a gestação Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM, sendo considerados significativos valores de  $p < 0,05$ ,  $n=7$ . \*diferente do grupo controle. Fonte: Autor, 2018.