

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Arthur Rocha Gomes

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA A DIETA HIPERLIPÍDICA E
LIPOPOLISSACARÍDEO SOBRE OS PARÂMETROS NEUROINFLAMATÓRIOS,
ESTADO REDOX E COMPORTAMENTO DE RATOS WISTAR ADOLESCENTES**

Diamantina

2021

Arthur Rocha Gomes

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MATERNA A DIETA HIPERLIPÍDICA E
LIPOPOLISSACARÍDEO SOBRE OS PARÂMETROS NEUROINFLAMATÓRIOS,
ESTADO REDOX E COMPORTAMENTO DE RATOS WISTAR ADOLESCENTES**

Tese apresentada ao programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Hércules Ribeiro Leite
Coorientadora: Prof^ª, Dr^ª. Etel Rocha Vieira

Diamantina

2021

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G633e

Gomes, Arthur Rocha

Efeitos da exposição materna a dieta hiperlipídica e lipopolissacarídeo sobre os parâmetros neuroinflamatórios, estado redox e comportamento de ratos Wistar adolescentes / Arthur Rocha Gomes, 2020.

146 p.: il.

Orientador: Hércules Ribeiro Leite

Coorientadora: Etel Rocha Vieira

Dissertação (Dissertação- Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.

1. Lipopolissacarídeo. 2. Tolerância ao LPS. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Neuroinflamação. 5. Estado redox. 6. Córtex. 7. Hipocampo. 8. Amígdala. 9. Memória. 10. Ansiedade I. Leite, Hércules Ribeiro. II. Vieira, Etel Rocha. III. Título. IV. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 612

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Viviane Pedrosa – CRB6/2641

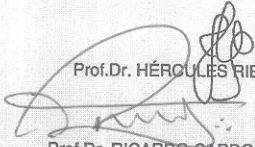
ARTHUR ROCHA GOMES

Efeitos da exposição materna a dieta hiperlipídica e lipopolissacarídeo sobre os os parâmetros neuroinflamatórios, estado redox e comportamento de ratos Wistar adolescentes

Tese apresentada ao DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, nível de DOUTORADO como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Orientador (a): Prof. Dr. Hércules Ribeiro Leite

Data da aprovação : 05/02/2021


Prof.Dr. HÉRCULES RIBEIRO LEITE - UFVJM


Prof.Dr. RICARDO CARDOSO CASSILHAS - UFVJM


Prof.Dr. HÉLIO ZANGROSSI JÚNIOR - USP


Prof.Dr.ª DANIELLE BERNARDES - UNIARARAS


Prof.Dr.ª NÍZIA ANDRADE VILLELA DESSIMONI PINTO - UFVJM

DIAMANTINA

AGRADECIMENTOS

Há quatro anos atrás esse trabalho iniciava. Projetar, escrever ~~reescrever~~, apresentar, desenvolver, avaliar e analisar, interpretar, escrever ~~reescrever...~~ e ~~reescrever novamente...~~ defender... Foram várias e longas etapas até chegarmos a esse ponto: a tese finalizada. De lá para cá, várias pessoas contribuíram direta- ou indiretamente, e eu não poderia apresentá-lo sem deixar aqui os meus agradecimentos.

Ao meu pai, Fernando, que nunca teve o estudo que queria (ou que merecia), mas ainda assim, sempre foi e sempre será o meu maior professor. Pai, espero um dia saber um décimo do que você sabe, conhecer um milésimo do que você conhece, e ter um pouco da generosidade e da simpatia que você tem. “Seu pai é seu melhor amigo” foi, talvez, a frase que mais ouvi durante meu amadurecimento e a que tenho mais convicção da veracidade.

A minha mãe, Maria Helena, pedagoga, de quem certamente herdei o interesse em ensinar. Você será sempre o meu exemplo de força e dedicação. Obrigado por me ensinar a nunca desistir e a jamais abaixar a cabeça. Não à toa que você é nosso esteio, nosso firmamento, o pilar principal que sustenta toda a construção. Enquanto houver você do outro lado, aqui do meu, eu consigo me orientar.

Gabi e Nanda, ou seria melhor dizer: Bi, Bibs, Bizinha, verbo TuBi, espirro de Netshoes; Nan, Nanly, Doly guaraná, Dica-Diquinha, Nanankin Skywalker, rrsrs. Obrigado por serem uma fonte inesgotável das minhas amolações. Sem dúvida, ter vocês por perto torna os meus dias mais leves (ou não rrsrs). Quero que saibam que sempre tive vocês também como inspiração. A dedicação que vocês demonstram com o que é de vocês é realmente impressionante, e eu espero ter algo assim algum dia.

Amanda, a você que não é só minha namorada, mas minha parceira nas bancadas dos laboratórios, minha amiga e confidente, alguém com quem eu sei que posso contar nos melhores e piores momentos, meu riso mais fácil e minha mão nos dias mais difíceis. Essa tese, tão pouco esse doutorado, jamais finalizariam sem você. Não tenho dúvidas que você é e será sempre a peça que faltava na minha vida. Obrigado por não desistir de mim, e obrigado pelo que somos nós. Amo você!

A Tania e Alexandre, pessoas que eu não poderia deixar de enaltecer e agradecer muito. Minha mãe e pai científicos, que me acolheram em meados de 2013 e, desde então, minhas fontes intermináveis de ensinamentos. Eu sinceramente não sei o que seria de mim sem vocês por perto todos esses anos. Vocês foram as únicas pessoas que resolveram me dar uma oportunidade em um momento que todas as outras portas se fecharam. Ir para a Nutrição

foi o caminho mais “anti-natural” e tortuoso que já tomei na vida, mas, sem dúvidas, foi o mais acertado.

Ao meu orientador Hércules, que só tenho a agradecer por esses últimos quatro anos de paciência, dedicação e ensinamentos. Estou ciente que me orientar não deve ter sido tarefa nada fácil rsrs. Sei que sou muito teimoso e idealista, e agradeço por todas as vezes que você me guiou para o caminho correto. E também não posso deixar de agradecer à minha coorientadora, Etel, que nunca mediu esforços para me ajudar, e que igualmente teve que ter um mar de paciência comigo. Obrigado aos dois por toda a orientação nessa jornada.

Aos meus colegas de laboratório, meus mais sinceros agradecimentos pela companhia e pelas risadas durante esses anos. Por favor, não fiquem chateados comigo, mas não vou citar cada um nominalmente para não cometer nenhuma injustiça (de esquecimento... vocês sabem, é um grande defeito meu). Foram tantas iniciações, Tcc's e dissertações durante esse período... tenho certeza que aprendi demais com todos vocês, e vou levar cada um comigo para sempre! Vocês não foram parte da trajetória, mas sim pequenos atalhos que eu conseguia tomar com o adicional de estar em companhias prazerosas.

À minha segunda casa serei eternamente grato! UFVJM, você sempre estará no meu coração. Nessa instituição fui aluno de graduação, mestrado, doutorado, professor e onde conheci as pessoas mais surpreendentes da minha vida. Obrigado a você, UFVJM, e também ao Vale do Jequitinhonha!

“Vale que vale cantar

Vale que vale viver

Vale do Jequitinhonha

Vale eu amo você”

(Jequitvale - Verono)

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante esse trabalho. E à uma das cientistas que mais admiro: Alexandra Elbakyan. Obrigado por seu trabalho magnífico e por ser fonte de inspiração para todos nós.

Por fim, mas não menos importante, a todos aqueles que dedicaram um pouquinho do seu tempo para ler essa tese. Muito obrigado!

“Your brain - every brain - is a work in progress. It is 'plastic.' From the day we're born to the day we die, it continuously revises and remodels, improving or slowly declining, as a function of how we use it.”

Michael Merzenich

RESUMO

GOMES, Arthur Rocha. Efeitos da exposição materna a dieta hiperlipídica e lipopolissacarídeo sobre os parâmetros neuroinflamatórios, estado redox e comportamento de ratos Wistar adolescentes. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina-MG, p. 145. 2021.

Durante os períodos embrionário e neonatal o sistema encefálico da prole encontra-se em pleno desenvolvimento, sendo muito susceptível a interferências ambientais. Dentre esses fatores interferentes, a exposição a uma dieta materna hiperlipídica é capaz de proporcionar neuroinflamação na prole e, conseqüentemente, alterações no comportamento ao longo da vida. Em contrapartida, a exposição materna a baixas e consecutivas doses de lipopolissacarídeo (LPS) vem surgindo na literatura como uma alternativa para modulação do estado neuroimune. Este efeito modulatório está relacionado ao potencial de atenuação ou hiporresponsividade da resposta imunológica após subseqüentes aplicações do LPS, levando a um efeito de tolerização ao LPS. No entanto, estudos que abordam os efeitos da reexposição ao LPS em associação com a dieta materna hiperlipídica durante a gestação e lactação sobre o comportamento de ratos adolescentes ainda são escassos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito protetor da tolerância ao LPS sobre os parâmetros neuroinflamatórios, do estado redox e comportamento (memória e ansiedade) na prole adolescentes de ratas Wistar tratadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação. Inicialmente 40 ratas Wistar fêmeas foram colocadas em caixas com a presença de ratos machos para cruzamento. Com a confirmação da cópula, as fêmeas foram destinadas ao alojamento isolado nas gaiolas, sendo definido esse como o dia “zero” da gravidez (GD0). A partir do GD0 as fêmeas receberam dieta padrão (n = 20; ração Nuvilab[®]) ou dieta hiperlipídica (n = 20; ração Nuvilab acrescida de banha de porco). No GD8 as ratas gestantes receberam via intraperitoneal veículo (salina) ou LPS (0,1mg.kg⁻¹), tratamentos que se repetiram no GD10 e GD12. No 21º dia de lactação ocorreu o desmame da prole, que foi redistribuída (de acordo com a dieta e o tratamento das suas respectivas mães) isoladamente nas gaiolas, formando os grupos: Controle – filhotes das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina (n = 60); Lipopolissacarídeo (LPS) – filhotes das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS (n = 60); Hiperlipídica (HP) – filhotes das mães que receberam dieta

hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina (n = 60); Lipopolissacarídeo + Hiperlipídica (LPS+HP) – filhotes das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS (n = 60). Após o desmame, todos esses animais (prole) receberam, até o 50º dia de vida, dieta padrão e água *ad libitum*. Entre o 42º e o 49º dia de vida, a prole de machos adolescentes realizou os testes comportamentais de memória (reconhecimento de objetos de curto e longo prazo), ansiedade (labirinto em cruz elevado, campo aberto, transição claro-escuro) e capacidade motora (rotarod). Parte dos animais foram eutanasiados no 21º dia de vida (n = 6 por grupo), enquanto o restante foi eutanasiado no 50º dia. Nesse momento foram retirados o córtex pré-frontal, o hipocampo e a amígdala para avaliação de citocinas pró (IL-1 β , IL-6, TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10), e dos níveis de fator neurotrófico derivado do encéfalo - BDNF (este apenas no hipocampo). Além disso, foram avaliadas nessas estruturas o estado redox, através da capacidade antioxidante (método FRAP), enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase) e marcadores do estresse oxidativo (método TBARS e proteína carbonilada). A prole HP demonstrou aumento de IL-6 no hipocampo aos 21 dias de vida, enquanto que os animais LPS+HP reportaram elevação dos níveis de IL-10. No 50º dia foram observados maiores níveis de IL-10 no hipocampo dos animais LPS+HP, preservação dos seus níveis na amígdala, e menores concentrações dessa citocina na amígdala da prole HP. Em relação ao estado redox no 50º dia de vida, foi reportado melhora na capacidade antioxidante no córtex pré-frontal, hipocampo e na amígdala dos animais do grupo LPS+HP. Os resultados das dosagens de citocinas indicam que a prole HP desenvolveu um estado neuroinflamatório. Enquanto isso, o grupo LPS+HP demonstrou uma proteção nas regiões do hipocampo e da amígdala, devido ao aumento (hipocampo) ou preservação (amígdala) dos níveis de IL-10, além da elevação de enzimas antioxidantes. A IL-10 regula a ativação glial e está relacionada com um efeito compensatório para contenção da inflamação, estando também associada a melhora de processos cognitivos e na prevenção de doenças neuropsiquiátricas. Nos testes comportamentais, o grupo HP reportou prejuízos na memória de curto prazo e desenvolvimento de comportamento tipo-ansioso. Em contrapartida, a memória dos animais LPS+HP foi preservada e nenhum comportamento tipo-ansiedade foi observado nesse grupo. Esses resultados indicam que o efeito de tolerização promovido pela reexposição ao LPS nas mães que receberam dieta hiperlipídica foi capaz de modular o estado neuroimune do hipocampo e da amígdala da prole LPS+HP, o que preveniu alterações comportamentais na memória e ansiedade na adolescência desses animais.

Palavras chave: lipopolissacarídeo; tolerância ao LPS; dieta hiperlipídica; neuroinflamação; estado redox; córtex; hipocampo; amígdala; memória; ansiedade

ABSTRACT

During the embryonic and neonatal periods, the fetus/neonate brain system is in full development, being very susceptible to environmental interference. Among these interfering factors, exposure to a high-fat maternal diet shows to be capable of promoting offspring neuroinflammation and, consequently, changes in behavior throughout life. In contrast, maternal exposure to low and consecutive doses of lipopolysaccharide (LPS) has emerged in the literature as an alternative for modulating the neuroimmune state. This modulatory effect is related to the potential for attenuation or hyporesponsiveness of the immune response after subsequent applications of LPS, leading to an effect of LPS tolerance. However, studies addressing the effects of reexposure to LPS in association with the high-fat maternal diet during gestation and lactation on the behavior of adolescent offspring are scarce. Therefore, the aim of this study was to evaluate the protective effect of LPS tolerance on neuroinflammatory parameters, redox status and behavior (memory and anxiety) in the adolescent offspring of Wistar rats treated with a high-fat diet during gestation and lactation. Initially, 40 female Wistar rats were placed in boxes with the presence of male rats. With the confirmation of the copulation, the females were sent to the isolated housing in the boxes, being defined this as the “zero” day of gestation (GD0). From GD0, females received a standard diet (n = 20; Nuvilab[®] diet) or a high-fat diet (n = 10; Nuvilab diet plus lard). From GD8, pregnant rats received intraperitoneal vehicle (saline) or LPS (0.1mg.kg⁻¹), treatments that were repeated in GD10 and GD12. On the 21st day of lactation, the offspring was weaned, which was redistributed (according to the diet and treatment of their respective dams) separately in the boxes, forming the groups: Control – male offspring of the dams who received a standard diet (Nuvilab) and intraperitoneal saline application (n = 60); Lipopolysaccharide (LPS) – male offspring of the dams who received a standard diet (Nuvilab) and intraperitoneal LPS (n = 60); High-fat (HP) – male offspring of the dams who received a high-fat diet and intraperitoneal saline application (n = 60); Lipopolysaccharide + High-fat (LPS+HP) male offspring of the dams who received a high-fat diet and intraperitoneal LPS application (n = 60). All of these animals received, until the 49th day of life, a standard diet and water *ad libitum*. Between the 42nd and 49th day of life, the male adolescent offspring underwent behavioral tests of memory (object recognition; short- and long-term memory), anxiety (elevated plus maze, open field, light-dark test) and motor ability (rotarod). Part of the offspring was euthanized on the 21st day of life (n = 6 per group), while

the rest were euthanized on the 50th day. At this moment, the prefrontal cortex, hippocampus and amygdala were removed for evaluation of pro- (IL-1 β , IL-6, TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines, and the levels of neurotrophic factor derived of the brain - BDNF (hippocampus only). In addition, the redox state was evaluated in these structures, through the antioxidant capacity (FRAP method), antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase) and oxidative stress markers (TBARS method and carbonylated protein). The HP offspring showed an increase in IL-6 in the hippocampus at 21 days of life, while the LPS+HP animals reported an increase in IL-10 levels. On the 50th day, higher levels of IL-10 were observed in the hippocampus of LPS + HP animals, preservation of their levels in the amygdala, and lower concentrations of this cytokine in the amygdala of the offspring HP. Regarding the redox state on the 50th day of life, an improvement in the antioxidant capacity in the prefrontal cortex, hippocampus and amygdala of animals in the LPS+HP group was reported. The results of the cytokine measurements indicate that the HP offspring developed a neuroinflammatory state. Meanwhile, the LPS+HP group showed protection in the regions of the hippocampus and amygdala, due to the increase (hippocampus) or preservation (amygdala) of IL-10 levels, in addition to the elevation of antioxidant enzymes. IL-10 regulates glial activation and is related to a compensatory effect to contain inflammation, and is also associated with the improvement of cognitive processes and the prevention of neuropsychiatric diseases. In behavioral tests, the HP group reported impairments in short-term memory and the development of anxiety-like behavior. In contrast, the memory of the LPS+HP animals was preserved and no anxiety-like behavior was observed in this group. These results indicate that the tolerance effect promoted by reexposure to LPS in dams who received a high-fat diet was able to modulate the neuroimmune status of the hippocampus and amygdala of the LPS+HP offspring, which prevented behavioral changes in memory and anxiety in these adolescent animals.

Keywords: lipopolysaccharide; LPS tolerance; high-fat diet; neuroinflammation; redox state; cortex; hippocampus; amygdala; memory; anxiety.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1** – Presença de plug vaginal na fêmea (A) e lâmina de esfregaço contendo inúmeros espermatozoides na objetiva de 20x (B). A presença do plug ou dos espermatozoides era considerado como confirmação da cópula e indício do início da gravidez 60
- FIGURA 2** – Esquema de distribuição dos animais após a lactação 63
- FIGURA 3** – Representação do Teste de Reconhecimento de Objetos com exemplos de dois objetos na arena. Cada animal foi colocado no centro da arena (demarcação vermelha) e sua interação com cada objeto avaliada durante 5 minutos em cada uma das fases (familiarização ou teste) 65
- FIGURA 4** – Tempo de exploração nas fases de familiarização (A) e teste (B); além do índice de reconhecimento (C) do teste de reconhecimento de objetos para memória de curto prazo 71
- FIGURA 5** – Tempo de exploração nas fases de familiarização (A) e teste (B); além do índice de reconhecimento (C) do teste de reconhecimento de objetos para memória de longo prazo 73
- FIGURA 6** – Capacidade antioxidante FRAP (A), atividade da SOD (B) e da GST (C), além dos níveis de TBARS (D) e de proteína carbonilada (E) no córtex pré-frontal dos animais no 50º dia pós-natal (PN50) 75
- FIGURA 7** – Capacidade antioxidante FRAP (A), atividade da SOD (B), GST, níveis de TBARS (D) e de proteína carbonilada (E) no hipocampo dos animais no 50º dia pós-natal (PN50) 77
- FIGURA 8** – Concentração de IL-6 (A), TNF- α (B), e IL-10 (C) no córtex pré-frontal dos animais no 21º dia pós-natal (PN21) 79
- FIGURA 9** – Concentração de IL-6 (A), TNF- α (B), e IL-10 (C) no hipocampo dos animais no 21º dia pós-natal (PN21) 80

FIGURA 10 – Concentração de IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF- α (C), e IL-10 (D) no córtex pré-frontal dos animais no 50º dia pós-natal (PN50).....	81
FIGURA 11 – Concentração de IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF- α (C), e IL-10 (D) no hipocampo dos animais no 50º dia pós-natal (PN50).....	82
FIGURA 12 – Concentração de BDNF no hipocampo dos animais no 50º dia pós-natal (PN50)	83

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 – Representação da arena de Campo Aberto. Cada animal foi colocado no centro da arena (demarcação vermelha) e filmado seus movimentos por 5 minutos.	109
FIGURA 2 – Representação do Teste de transição claro-escuro. Cada animal foi colocado no centro da zona clara com a cabeça voltada para a porta que conectava as duas zonas. Os movimentos de cada animal foram filmados por 5 minutos.....	110
FIGURA 3 – Representação do Labirinto em Cruz Elevado. Cada animal foi colocado no centro do labirinto e seus movimentos filmados por 5 minutos.	111
FIGURA 4 – Representação do Rotarod. A latência para a primeira queda foi registrada durante a fase de aprendizados (9 tentativas realizadas em 3 dias consecutivos), e durante a fase teste (3 tentativas realizadas no dia seguinte à finalização dos treinos). Cada tentativa tinha duração máxima de 5 minutos.	113
FIGURA 5 – Frequência de entradas (A) e tempo de permanência na zona central (B); além da distância percorrida (C) no teste de Campo Aberto	116
FIGURA 6 – Frequência de entradas (A) e tempo de permanência na zona clara (B) no teste de transição claro-escuro.....	118
FIGURA 7 – Frequência de entradas (A) e tempo de permanência nos braços abertos (B) no teste de labirinto em cruz elevado.	120
FIGURA 8 – Latência para queda nas três tentativas (T1, T2 e T3) da fase teste do rotarod	122
FIGURA 9 – Capacidade antioxidante FRAP (A), atividade da SOD (B), GST (C) e da CAT (D), além dos níveis de TBARS (E) na amígdala dos animais no 50º dia pós-natal (PN50).	124

FIGURA 10 – Concentração de IL-6 (A), TNF- α (B), e IL-10 (C) na amígdala dos animais no 50º dia pós-natal (PN50).....	125
FIGURA 11 – Razões entre IL-6/IL-10 (A), e TNF- α /IL-10 (B), na amígdala dos animais no 50º dia pós-natal (PN50).....	126
FIGURA 12 – Peso relativo das suprarrenais (A), e níveis de corticosterona sanguíneos (B) dos animais no 50º dia pós-natal (PN50).....	127

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 – Composição química e densidade energética da dieta padrão (ração Nuvilab®) e da dieta hiperlipídica	61
---	----

CAPÍTULO 2

TABELA 1 – Outros comportamentos avaliados no teste de Campo aberto	117
TABELA 2 – Outros comportamentos avaliados no teste de transição claro-escuro.....	119
TABELA 3 – Outros comportamentos avaliados no teste de Labirinto em Cruz Elevado ..	120
TABELA 4 – Fase de aprendizado no teste rotarod	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM

Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – PMPGF

Lipopolissacarídeo – LPS

Sistema Nervoso Central – SNC

Barreira hematoencefálica – BHE

Toll-like receptors 4 – TLR₄

Padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*) – PAMP's

Padrões moleculares associados a danos (*damage-associated molecular patterns*) – DAMP's

Fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrose factor alfa*) – TNF- α

Interleucina – IL

Espécies reativas de oxigênio – ERO's

Células matadoras naturais (*natural killer's*) – NK's

Prostaglandina E2 – PGE2

Fator nuclear κ B (*nuclear factor κ B*) – NF- κ B

Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal – HPA

Hormônio liberador de corticotrofina (*corticotropin-releasing hormone*) – CRH

Hormônio adrenocorticotrófico (*Adrenocorticotropic hormone*) – ACTH

Proteína ativadora 1 (*Activator protein 1*) – AP-1

Fator regulador de interferon 3 (*interferon-regulatory factor 3*) – IRF3

Fator de transformação do crescimento beta (*transforming growth factor beta*) – TGF- β

Acetilcolina – ACh

Tomografia por emissão de pósitrons (*Positron emission tomography*) – PET

Proteína C reativa – PCR

Proteíno-quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinases*) – MAPK

Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (*signal-transducer-and-activator-of-transcription*) – STAT-1

Receptor associado a quinase do IL-1 (*IL-1R-associated kinase*) – IRAK
Necrosis factor receptor associated factor 6 – TRAF-6
IκB kinase – IKK
MicroRNA-98 – miR-98
MicroRNA-21 – miR-21
Proteína ácida fibrilar glial (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) – GFAP
Ativação imune materna – AIM
Fator neurotrófico derivado do encéfalo (*brain derived neurotrophic factor*) – BDNF
Conselho nacional de controle de experimentação animal – CONCEA
Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA
Laboratório de Nutrição Experimental – LabNutrex
Laboratório de Inflamação e Metabolismo – LIM
Dia “zero” da gravidez – G0
8º dia de gestação – G8
21º dia de lactação – L21
50º dia de vida da prole – PN50
42º dia de vida da prole – PN42
49º dia de vida da prole – PN49
Teste de reconhecimento de objetos – TRO
Campo aberto – CA
Labirinto em cruz elevado – LCE
Índice de reconhecimento – IR
Tampão fosfato salina (*phosphate buffered saline*) – PBS
Superóxido dismutase – SOD
Glutathione-s-transferase – GST
Capacidade antioxidante total não-enzimática (*Ferric-reducing ability of plasma*) – FRAP
Índice de peroxidação lipídica (*Thiobarbituric acid reactive substances*) – TBARS
Malondialdeído – MDA
2,4-dinitrofenilhidrazina – DNPH
Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay – ELISA

Albumina de soro bovino (*bovine serum albumine*) – BSA

Ortofenilendiamina – OPD

Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

– Nfr2

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS	21
1 INTRODUÇÃO GERAL	23
2 OBJETIVOS	26
3 REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1 Inflamação	27
3.2 Neuroinflamação	30
3.3 Dieta materna e neuroinflamação da prole	32
3.4 Lipopolissacarídeo	38
REFERÊNCIAS	42

CAPÍTULO 1: A tolerância ao LPS previne comportamento tipo-ansiedade e inflamação na amígdala da prole adolescentes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica

1 INTRODUÇÃO	56
2 OBJETIVOS	58
2.1 Objetivos específicos	58
3 METODOLOGIA	59
3.1 Animais e desenho experimental	59
3.2 Testes comportamentais	63
<i>3.2.1 Teste de reconhecimento de objetos (TRO)</i>	63
3.3 Eutanásia e análises bioquímicas	65
<i>3.3.1 Estado redox</i>	66
<i>3.3.2 Perfil inflamatório: análise de citocinas</i>	67
<i>3.3.3 Fator neurotrófico derivado do encéfalo (Brain derived neurotrophic fator - BDNF)</i>	68
3.4 Análise estatística	68

4 RESULTADOS	70
4.1 TRO: Memória de curto-prazo	70
4.2 TRO: Memória de longo-prazo	72
4.3 Estado redox	74
4.4 Neuroinflamação e concentração de BDNF	78
5 DISCUSSÃO	84
6 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	91

CAPÍTULO 2: A tolerância ao LPS aumenta a IL-10 hipocampal e evita a perda de memória de curto prazo na prole de machos adolescentes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica

1 INTRODUÇÃO	104
2 OBJETIVOS	106
2.1 Objetivos específicos	106
3 METODOLOGIA	107
3.1 Animais e desenho experimental	107
3.2 Testes comportamentais	108
3.2.1 <i>Campo aberto (CA)</i>	109
3.2.2 <i>Teste de transição claro-escuro</i>	110
3.2.3 <i>Labirinto em Cruz Elevado (LCE)</i>	111
3.2.3 <i>Rotarod</i>	112
3.3 Eutanásia e análises bioquímicas	113
3.3.1 <i>Estado redox</i>	113
3.3.2 <i>Perfil inflamatório: análise de citocinas</i>	114
3.3.3 <i>Dosagem de corticosterona</i>	114
3.4 Análise estatística	115
4 RESULTADOS	116
4.1 Testes comportamentais	116

4.2 Estado redox.....	123
4.3 Análise de citocinas.....	125
4.4 Peso relativo das adrenais e dosagem de corticosterona.....	127
5 DISCUSSÃO	128
6 CONCLUSÕES.....	134
REFERÊNCIAS	135
ANEXO I (Aprovação do Comitê de Ética)	145

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Meu nome é Arthur Rocha Gomes, sou farmacêutico-bioquímico pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e mestre em Ciências Farmacêuticas pela mesma instituição. Essa tese, orientada pelos professores doutores Hércules Ribeiro Leite e Etel Rocha Vieira, representa a pesquisa realizada durante o meu doutorado pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas (PMPGF) da UFVJM.

A seção inicial deste trabalho abordará uma introdução geral e a revisão da literatura ao redor do tema de pesquisa. Durante essa etapa, o intuito foi trazer ao leitor os aspectos teóricos, bem como artigos recentes que nortearam o desenvolvimento deste trabalho. Serão revistos conceitos importantes sobre inflamação e neuroinflamação, e como as mesmas se inserem dentro do contexto da dieta materna durante a gestação e lactação, podendo promover prejuízos no estado neuroimune e no comportamento da prole. Ademais, será revisto também a utilização do lipopolissacarídeo como agente indutor inflamatório, e, mais importante, como a sua reexposição em baixas doses pode ser utilizada para atenuação/hiporresponsividade de processos inflamatórios, promovendo um efeito de tolerância.

O primeiro capítulo tem como principal objetivo avaliar o efeito protetor promovido pela tolerância ao lipopolissacarídeo (LPS) sobre os parâmetros neuroinflamatórios, do estado redox e da memória na prole adolescente de ratas Wistar tratadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação. Foram avaliadas citocinas pró e anti-inflamatórias, além de marcadores do estresse oxidativo e enzimas antioxidantes no córtex pré-frontal e hipocampo da prole adolescente. Além disso, o teste de reconhecimento de objetos foi realizado em dois tempos diferentes de retenção (1h e 24h), para análise da memória de curto e longo prazo dos animais. Esse capítulo foi convertido no formato de artigo científico, submetido à revista *Neuroscience* (<https://www.journals.elsevier.com/neuroscience>; *impact fator*: 3.056) em agosto de 2020, e se encontra em fase final de revisão.

Por sua vez, o segundo capítulo objetivou avaliar o efeito protetor da tolerância ao LPS sobre os mesmos parâmetros neuroquímicos, além do comportamento tipo-ansiedade na prole adolescente de ratas Wistar tratadas com dieta hiperlipídica. Desta vez, o enfoque foram as análises na amígdala da prole, além da realização de testes para avaliação de comportamento do tipo-ansiedade, como o labirinto em cruz elevado, campo aberto e transição claro-escuro. Elaboramos a partir deste capítulo um artigo também, submetido em

janeiro de 2021 à revista *Behavioural Brain Research* (<https://www.journals.elsevier.com/behavioural-brain-research>; impact factor: 2.977).

Dessa forma, a presente tese está subdividida em:

- Seção inicial (introdução e revisão da literatura);
- Capítulo 1 (A tolerância ao LPS aumenta a IL-10 hipocampal e evita a perda de memória de curto prazo na prole de machos adolescentes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica);
- Capítulo 2 (A tolerância ao LPS previne comportamento tipo-ansiedade e inflamação na amígdala da prole adolescentes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica).

1 INTRODUÇÃO GERAL

As fases de gestação e lactação são consideradas fundamentais no desenvolvimento da prole em relação ao seu metabolismo, crescimento e na maturação encefálica (DURÁN-CARABALI et al., 2019; FIGUEIRÓ et al., 2019; STONE et al., 2019). Durante essas fases, há uma maior susceptibilidade a insultos, como os proporcionados por uma má-alimentação, podendo levar a deficiências no desenvolvimento encefálico, impactando no comportamento da prole ao longo da vida (SPENCER, 2017; SPENCER et al., 2017).

Dessa forma, durante os períodos citados, a mãe necessita de um estado nutricional adequado, obtido através de uma alimentação equilibrada, com consumo e absorção de nutrientes em quantidades suficientes. Uma má-nutrição materna pode desencadear alterações que vão repercutir ao longo da vida da prole, gerando impactos na memória, cognição, emocionalidade, aspectos motores e sociais (MORGANE et al., 1993; PRADO; DEWEY, 2014; SPENCER et al., 2017). Como exemplo, pode-se citar dietas ricas em gorduras saturadas, que podem ter impacto negativo no desenvolvimento e no comportamento da prole (SPENCER et al., 2017).

Estudos epidemiológicos reportam essa interrelação entre o estado nutricional da mãe e alterações comportamentais na prole. Existem evidências que a obesidade materna humana aumenta o risco de desenvolvimento nos descendentes de: transtornos da ansiedade e depressão (MINA et al., 2017), autismo (LI et al., 2016), dificuldades em externalizar problemas (MINA et al., 2017; VAN LIESHOUT; ROBINSON; BOYLE, 2013), esquizofrenia (KHANDAKER; DIBBEN; JONES, 2012; MACKAY et al., 2017), compulsão alimentar (LYDECKER; GRILO, 2017), transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (ROBINSON et al., 2020), além de prejuízos na memória e cognição (KRZECZKOWSKI et al., 2018).

De forma semelhante, trabalhos com roedores confirmam essa relação observada nos humanos. Estudos que avaliaram a prole de mães que receberam dieta hiperlipídica demonstraram: prejuízos na memória (CORDNER et al., 2019; GRAF et al., 2016), comportamento tipo-ansioso (GLEDNING; FISHER; JASONI, 2018; WINTHER et al., 2018), menor locomoção (SASAKI; MCGOWAN; ERB, 2018), diminuição do comportamento de brincar (RIBEIRO et al., 2018) e compulsão alimentar (DESAI; HAN; ROSS, 2016; NAEF et al., 2011).

A neuroinflamação é um processo que ocorre quando há um estado pró-inflamatório no sistema nervoso central (SNC). É importante ressaltar que a neuroinflamação vem sendo apontada como um dos mecanismos responsáveis pelas alterações comportamentais na prole, originadas a partir da dieta hiperlipídica e/ou da obesidade materna (SULLIVAN et al., 2015; THOMPSON et al., 2018). Mães obesas ou que possuem uma dieta rica em gorduras saturadas podem apresentar um estado de inflamação crônica de baixo grau (SCHEJA; HEEREN, 2019), o que aumenta o risco da passagem de agentes pró-inflamatórios para a prole (SULLIVAN et al., 2015; THOMPSON et al., 2018).

Um dos meios que essa passagem pode ocorrer, é através da placenta (AYE et al., 2014; REYNOLDS et al., 2015; ROBERTS et al., 2011; SABEN et al., 2013), o outro é por meio do leite materno (ARAD et al., 2017; SASO et al., 2019; WHITAKER et al., 2017). Ressalta-se que durante as fases iniciais da vida, a prole possui uma barreira hematoencefálica (BHE) ainda em desenvolvimento, o que facilita a entrada de agentes neurotóxicos ou moléculas efetoras (como mediadores pró-inflamatórios) no SNC em formação, gerando um estado neuroinflamatório (AFROZ; ALVIÑA, 2019; MILLER et al., 2016; SAUNDERS et al., 2014).

Diante deste quadro, estratégias que busquem minimizar os impactos da dieta materna, suprimindo ou atenuando um estado neuroinflamatório da prole se tornam necessárias. Estudos vêm apontando a utilização do efeito tolerante (ou de condicionamento) ao LPS com alto potencial para proteção ou atenuação da inflamação (HUANG et al., 2015; SEELEY; GHOSH, 2017). Baixas doses de LPS são suportadas em modelos animais sem indução de óbito, proporcionando uma tolerância à reexposição ao LPS ou a outros agentes inflamatórios, nesse último caso, sendo chamado de tolerância cruzada. O mecanismo pelo qual esse efeito de tolerância (e da tolerância cruzada) ao LPS ocorre, parece envolver a supressão da resposta inflamatória através de uma hiporresponsividade nos *toll-like receptors 4* (TLR₄) presentes nas membranas dos macrófagos (SEELEY; GHOSH, 2017).

Nesse contexto, vários estudos demonstraram uma tolerância cruzada promovida pela reexposição ao LPS a vários agentes pró-inflamatórios, tais como: redução da inflamação contra crises epiléticas induzidas por choque eletroconvulsivo (AMINI et al., 2018); lesão de isquemia-reperusão renal (HE et al., 2014; WANG et al., 2018); inflamação alérgica das vias aéreas (KUMAR; ADHIKARI, 2017); e lesões traumáticas encefálicas (TURNER et al., 2017). Destaca-se ainda um único trabalho na literatura que avaliou o efeito de tolerância cruzada ao LPS em relação a uma dieta hiperlipídica materna (HUANG et al., 2015). No

entanto, o estudo de Huang et al. (2015) teve como foco apenas a avaliação da morfologia e inflamação no hipocampo da prole após a aplicação de LPS em ratas-mães que receberam dieta hiperlipídica na gestação e lactação, sem ter avaliado nenhum aspecto do comportamento desses animais. No decorrer desse texto serão abordados mais detalhes do trabalho de Huang et al. (2015), que serviu de base para desenvolvimento da tese.

Portanto, os principais questionamentos levantados no presente trabalho foram: (1) a tolerância ao LPS poderia exercer uma proteção na memória da prole adolescente de ratas-mães tratadas durante as fases de gestação e lactação com uma dieta hiperlipídica? (2) esse efeito (dentro das mesmas condições de tratamento) poderia exercer uma proteção também nos comportamentos do tipo ansiedade? A principal hipótese levantada é que a reexposição a baixas doses do LPS durante a gestação poderia exercer um efeito atenuador/supressivo na inflamação promovida pela dieta materna. Por sua vez, esse efeito levaria a uma diminuição na concentração de citocinas pró-inflamatórias ou o aumento de anti-inflamatórias, em regiões encefálicas importantes como o hipocampo e a amígdala, gerando proteção na memória e no comportamento do tipo ansioso, respectivamente.

2 OBJETIVOS

Avaliar o efeito protetor da tolerância ao LPS sobre os parâmetros neuroinflamatórios e do estado redox, além da memória e o comportamento tipo-ansiedade na prole adolescente de ratas Wistar tratadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação. Em cada capítulo serão abordados também os objetivos específicos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Inflamação

A inflamação é um processo complexo e dinâmico, que ocorre devido à alguma alteração na homeostasia do organismo. Geralmente, processos inflamatórios acontecem em três situações fisiopatológicas: na infecção, em uma injúria, ou através de um estresse tecidual ou má-função de um sistema. De forma a manter o equilíbrio, o sistema imune, através de reações locais e sistêmicas de variados tipos celulares, sinais químicos e vias de sinalização, é responsável por minimizar os potenciais riscos advindos dessas situações fisiopatológicas, reparando o tecido e restaurando a homeostasia, ou, em alguns casos, se adaptando ao estresse. Nesse segundo caso, podem ocorrer consequências patológicas, tais como sepse, fibrose, metaplasia e crescimento de tumores (MEDZHITOV, 2008).

Um processo inflamatório também possui um caráter temporal, com respostas agudas e/ou crônicas. A fase aguda tem duração de minutos a dias, envolvendo uma série de reações complexas na tentativa de estabelecer uma resolução para a infecção por microrganismos ou situação de injúria. O processo se inicia pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*; PAMP's) ou associados a danos (*damage-associated molecular patterns*; DAMP's), que ocorrem por meio da ação de células como macrófagos, mastócitos, células dendríticas ou células epiteliais, que possuem receptores específicos para esse reconhecimento. A partir desse processo, iniciam-se os eventos vasculares (vasodilatação local e aumento da permeabilidade dos capilares) para formação do exsudado e migração de leucócitos (predominantemente neutrófilos) para o foco da lesão. O início da inflamação é caracterizado pela liberação de mediadores inflamatórios, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as interleucinas (IL), moléculas de adesão, mediadores vasoativos e espécies reativas de oxigênio (ERO's) que medeiam a inflamação e produção de sinais cardinais como edema, dor, rubor, febre e perda da função (ABBAS, 2008; SELL, 2001). É esperado que a inflamação aguda, por meio principalmente da ação dos neutrófilos ativados localmente, seja capaz de solucionar essa quebra na homeostasia e promover o retorno do equilíbrio, no entanto, caso isso não ocorra, o processo inflamatório persiste e adquire novas características (MEDZHITOV, 2008).

Na fase crônica da inflamação, o infiltrado inicial de neutrófilos é substituído por outros tipos celulares, como macrófagos e células T. Se mesmo assim, o combinado de ambas

não for suficiente para resolução e retorno à uma situação de equilíbrio, há a formação de granulomas e tecidos linfoides terciários. Essa fase pode ter duração de semanas a meses, com intensa proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual, que possibilitam o reparo e a cicatrização dos tecidos lesionados (ABBAS, 2008; SELL, 2001).

Além disso, o sistema imune pode ser classificado por meio dos seus subsistemas, que se diferem, principalmente, pela velocidade e especificidade de atuação, sendo eles a imunidade inata e a adaptativa. Indivíduos vertebrados nascem com a imunidade inata desenvolvida, ou seja, a mesma não se molda de acordo com a presença de um antígeno, porém, a principal implicação dessa característica marcante é que a sua diversidade em reconhecimento é limitada. Suas células de defesa são estimuladas a partir de PAMP's ou DAMP's, se encontrando em tecidos periféricos, nas portas de entrada para combater os agentes infecciosos, como a pele e mucosas (bucal, nasal, geniturinária). Pode-se dizer que os principais constituintes da imunidade inata são as barreiras físicas e químicas, os neutrófilos, células fagocitárias e células matadoras naturais (*natural killer's*; NK's), além das proteínas plasmáticas (incluindo frações do sistema de complemento e outros mediadores inflamatórios) (ABBAS, 2008; SELL, 2001).

Por sua vez, a imunidade adaptativa possui como principal característica a adaptação à presença de um antígeno, sendo moldada à medida que o indivíduo evolui e é exposto aos mais diferentes tipos de agentes. Suas células possuem receptores individualizados, gerando uma especificidade muito fina para reconhecer epítomos específicos nos antígenos. Importante dizer também que, uma vez que a sua diversidade de receptores é bem extensa, seu reconhecimento é igualmente grande, promovendo imunidade para uma infinidade de agentes de longa duração (formação de “memória” imunológica). Os componentes da imunidade adquirida são os linfócitos, que se localizam (em sua maioria) circulando entre os órgãos linfoides, que são responsáveis por reproduzir ou armazenar células linfoides, como: baço, linfonodos, medula óssea e placas de Peyer (ABBAS, 2008; MEDZHITOV, 2008; SELL, 2001; VIVIER; MALISSEN, 2005).

Embora didaticamente exista uma separação lógica entre a imunidade inata e a adaptativa, é importante entender que ambas atuam de forma integrada. Na presença de um estímulo nocivo ao tecido, as células imunes inatas (por exemplo: macrófagos, monócitos, neutrófilos e células dendríticas) são ativadas e respondem de forma inespecífica produzindo mediadores para uma resposta inflamatória local, atraindo mais fagócitos, como macrófagos, monócitos, neutrófilos e células dendríticas. Esses mediadores incluem as citocinas pró-

inflamatórias, como o TNF- α , e as interleucinas IL-1 β e IL-6. Essas citocinas sinalizam o prolongamento da resposta inflamatória e o início da resposta imune adquirida através da atração de leucócitos e linfócitos. A resposta imune adaptativa cria uma memória imunológica, onde os linfócitos produzem uma resposta celular e humoral tóxica para os agentes potencialmente prejudiciais, além da produção de anticorpos contra esses patógenos (MEDZHITOV, 2008).

Após os eventos citados acima, o processo inflamatório geralmente evolui para a restauração da homeostase funcional, classicamente definido como resolução da inflamação. Para que isso ocorra, uma nova cascata de eventos é necessária, iniciando pela eliminação dos agentes prejudiciais que levaram a inflamação, principalmente pela ação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Subsequentemente, a síntese de mediadores pró-inflamatórios é suspensa e aqueles remanescentes são catabolizados, interrompendo o recrutamento de leucócitos e a formação do edema. Em contrapartida, esses eventos são contrabalanceados pela liberação concomitante de "sinais de parada", que servem para moderar a gravidade da inflamação, caso ela se torne excessiva e cause lesão do tecido, sendo eles a liberação de IL-10, prostaglandina E2 (PGE2) e fatores que controlam a magnitude da resposta dos receptores TLR e sinalização do fator nuclear κ B (*nuclear factor κ B*; NF- κ B). Em seguida, independente se a resposta inflamatória foi originada a partir de processos da imunidade inata ou da adaptativa, as células imunes são eliminadas do tecido lesado, seja por apoptose, através da reentrada na circulação sistêmica, ou por drenagem linfática (FULLERTON; GILROY, 2016).

Ademais, existem outras vias que respondem aos processos inflamatórios, de forma a contribuir na resolução e retorno da homeostase. São exemplos desse balanço anti-inflamatório as vias neuroendócrinas, tais como o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), através da liberação de glicocorticoides (cortisol em humanos ou corticosterona em roedores) e do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, por meio do nervo vago e da acetilcolina (LEITE et al., 2016; PAVLOV; TRACEY, 2004).

Em situações de estresse ou de inflamação, a ativação do eixo HPA induz a produção pelo hipotálamo do hormônio liberador de corticotrofina (*corticotropin-releasing hormone*; CRH), que por sua vez, estimula na pituitária/hipófise a síntese do hormônio adrenocorticotrófico (*Adrenocorticotrophic hormone*; ACTH). O ACTH é liberado na corrente sanguínea, se ligando a receptores presentes nas células adrenocorticais presentes nas glândulas suprarrenais, estimulando a síntese de cortisol/corticosterona a partir de moléculas

de colesterol. Uma vez na corrente sanguínea, o cortisol/corticosterona tem um papel importante no controle da inflamação, atuando em diversos níveis. Por exemplo, durante a inflamação, o cortisol/corticosterona inibe a transcrição do NF- κ B, que é um complexo proteico fundamental na síntese de citocinas pró-inflamatórias, além de inibição de outros fatores dentro dessa via, como a proteína ativadora 1 (*Activator protein 1*; AP-1) e o fator regulador de interferon 3 (*interferon-regulatory factor 3*; IRF3). Ainda, os glicocorticoides são responsáveis por: ativar genes que codificam a expressão de inibidores da via dos receptores *toll*; inibir a produção de eicosanoides e bradicinina, o que diminui a vasodilatação e a permeabilidade no local da inflamação; inibir a transcrição endotelial de integrinas; e promover uma *downregulation* de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Além disso, na fase de resolução, os glicocorticoides estimulam os macrófagos a produzirem mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10 e o fator de transformação do crescimento beta (*transforming growth factor beta*; TGF- β). Portanto, em vista de todos esses efeitos, pode-se dizer que o resultado final da atuação dos glicocorticoides é uma ação anti-inflamatória, no auxílio de retorno à homeostase (CAIN; CIDLOWSKI, 2017).

A ação anti-inflamatória da via colinérgica é exercida através da acetilcolina (ACh), que se liga a células imunes ativadas, tais como macrófagos e micróglia, pela interação com o receptor nicotínico $\alpha 7$. A ativação desse receptor leva à estimulação da via Jak/STAT3 (sinal transdutor e ativador da transcrição gênica) que suprime a ativação dos receptores do tipo *toll*, que uma vez estimulados, por exemplo pelo LPS, levam à ativação do NF κ B, que é responsável pela transcrição de mediadores inflamatórios. Dessa forma, a via colinérgica tem como resultado final uma ação anti-inflamatória, para regresso a uma situação de equilíbrio (LEITE et al., 2016).

3.2 Neuroinflamação

Está bem estabelecido na literatura que inflamações sistêmicas podem desencadear processos neuroinflamatórios (LEITE et al., 2016). As vias pelas quais uma inflamação sistêmica pode influenciar à nível central são diversas, no entanto, as principais estão relacionadas a BHE. Mesmo em situações fisiológicas, é conhecido que algumas citocinas, incluindo a IL-1, IL-6 e o TNF- α , podem atravessar a BHE, proporcionando assim uma ligação direta entre os mediadores inflamatórios da periferia e o sistema nervoso central. Assim, uma alta liberação dessas citocinas em uma inflamação sistêmica pode influenciar no

estado neuroimune, desencadeando uma inflamação central (ERICKSON; DOHI; BANKS, 2012; QUAN, 2008).

Além disso, durante uma inflamação sistêmica, uma alta liberação de citocinas pode ter efeitos nas células endoteliais da BHE, levando à modulação dos aspectos restritivos dessa barreira. Esses efeitos incluem alterações do citoesqueleto de actina e na expressão de zonas de oclusão, permitindo uma maior entrada de mediadores inflamatórios por vias trans e paracelulares. Por fim, as próprias células endoteliais da BHE podem ser ativadas por citocinas circulantes, causando secreção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas no parênquima encefálico (ERICKSON; DOHI; BANKS, 2012; QUAN, 2008).

Os eventos que ocorrem na sequência da entrada de mediadores inflamatórios ao cérebro estão relacionados à ativação microglial. As células microgliais alteram o seu fenótipo, saindo de um estado de repouso (morfologia ramificada) para um pró-inflamatório (morfologia amebóide), sendo, a partir desse processo, aptas a realizar fagocitose e apresentação de antígenos, além de liberar vários mediadores (incluindo IL-1 β , IL-6, TNF- α e ERO's), contribuindo assim para o desenvolvimento e modulação da resposta inflamatória no cérebro (LAFRANCE et al., 2010). Além da micróglia, outras células componentes da glia, como os astrócitos e oligodendrócitos também secretam moduladores inflamatórios durante esse processo, auxiliando no estímulo de desencadeamento para um estado neuroinflamatório (CORREALE; VILLA, 2004).

A micróglia pode ser ativada na presença de patógenos, dano tecidual, neurotoxinas, infecção, lesão ou mesmo em uma situação de estimulação anormal, como a que ocorre durante uma inflamação sistêmica exacerbada. No entanto, altas concentrações de mediadores pró-inflamatórios liberados pela micróglia ativada podem proporcionar danos às células encefálicas, através da fagocitose ou estimulação apoptótica de outros neurônios. Nessas situações, a neurotoxicidade promovida pela micróglia ativada, pode não apenas causar danos a curto prazo que seriam reversíveis, mas também levando a efeitos prejudiciais e persistentes. Em termos de neuroinflamação crônica, essas células podem permanecer ativadas por longos períodos, liberando citocinas e moléculas neurotóxicas que contribuem para processos neurodegenerativos à longo prazo (SHABAB et al., 2017).

Neste contexto, estudos utilizando a tomografia por emissão de pósitrons (*Positron emission tomography*; PET), avaliação do líquido cefalorraquidiano ou exames *post-mortem*, indicam evidências de que diversos transtornos mentais estejam relacionados a estados neuroinflamatórios, dentre estes, demência e *déficits* cognitivos (FAN et al., 2017;

HAMELIN et al., 2016; ZHANG, 2015), ataques epiléticos (PETIT-PEDROL et al., 2014), esquizofrenia (BLOOMFIELD et al., 2016; COUGHLIN et al., 2016; TAKANO et al., 2010), depressão (LI; SAGAR; KERI, 2018a, 2018b), autismo (LEE et al., 2017; MORGAN et al., 2014; TETREAULT et al., 2012), Alzheimer (SURIDJAN et al., 2015) e estresse (BAKER et al., 2001). Embora existam sólidas evidências de que esses transtornos mentais sejam causados por mecanismos fisiopatológicos comuns de desregulação neuroimune, não se sabe ainda o motivo pelo qual a inflamação central evolui para tantos fenótipos distintos. Ademais, não se sabe de que forma ela ocorre e quais os fatores envolvidos para a sua vulnerabilidade, seja para o desenvolvimento de doenças neurológicas (Alzheimer, demência e ataques epiléticos) ou psiquiátricas (esquizofrenia, depressão, autismo e estresse).

Recentemente, diversos estudos vêm sendo realizados para entender os fatores que aumentam a possibilidade do desenvolvimento de neuroinflamação, e, conseqüentemente, de transtornos mentais. Dentro destes, a obesidade materna durante as fases iniciais da vida (gestação e lactação) figura como uma “ponte” entre alterações neuroimunes na prole e a evolução ao longo da vida para algum fenótipo de doença neurológica ou psiquiátrica (CIRULLI; MUSILLO; BERRY, 2020; CORDNER et al., 2019; FISCH et al., 2019; GRAF et al., 2016).

3.3 Dieta materna e neuroinflamação da prole

Uma alimentação equilibrada, com absorção de diversos nutrientes em quantidades adequadas, é um elemento fundamental durante a fase de desenvolvimento na primeira infância. Os períodos de gravidez, lactação e início da infância são considerados cruciais na formação do encéfalo, sendo a base da formação cognitiva, motora, social e emocional. Dessa forma, uma alimentação materna balanceada de forma quantitativa e qualitativa, é necessária para a obtenção de um estado nutricional adequado e para o completo desenvolvimento físico, emocional e cognitivo da prole (MORGANE et al., 1993; PRADO; DEWEY, 2014).

Embora hoje tenha-se o conhecimento da importância da alimentação para promoção da saúde, as taxas de sobrepeso e obesidade no mundo vêm apresentando resultados na contramão. Estima-se que aproximadamente 1,9 bilhão de adultos maiores de 18 anos apresentem algum grau de sobrepeso/obesidade. Já entre as mulheres em idade fértil (18-35 anos), 15% da população mundial está nessa condição, sendo que, nos países da América Latina, essa situação se torna mais grave, onde os índices sobem para 50% de mulheres

obesas/sobrepeso dentro dessa faixa etária. Ainda é importante ressaltar que crianças e adolescentes (5-18 anos) também se enquadram nesta classificação, cerca de 340 milhões em todo o mundo estão com algum grau de obesidade ou com sobrepeso, o que pode estar relacionado à alimentação materna (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017, 2016).

Em paralelo ao crescimento epidêmico da obesidade, também vem sendo observado mundialmente o aumento no desenvolvimento de transtornos mentais (COLLABORATORS, 2018). Estima-se que 10% da população possua algum tipo de transtorno mental, um índice que foi avaliado em 195 países ao redor do mundo (COLLABORATORS, 2018; VIGO; THORNICROFT; ATUN, 2016). Alinhando essas duas vertentes epidêmicas, ou seja, de aumento da obesidade e do crescimento de transtornos mentais, a obesidade materna durante as fases de gestação e lactação aparece como uma possível fonte desencadeadora. Estudos epidemiológicos apontam para uma relação direta entre obesidade materna e um risco aumentado de desenvolvimento na prole de ansiedade e depressão (MINA et al., 2017), autismo (LI et al., 2016), dificuldade em externalizar problemas (MINA et al., 2017; VAN LIESHOUT; ROBINSON; BOYLE, 2013), esquizofrenia (KHANDAKER; DIBBEN; JONES, 2012; MACKAY et al., 2017), transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (ROBINSON et al., 2020) e problemas cognitivos (KRZECZKOWSKI et al., 2018).

Como citado anteriormente, um dos mecanismos propostos para a propagação de transtornos mentais na prole de mães obesas, pode envolver alterações imunes que culminam com a indução de neuroinflamação (CIRULLI; MUSILLO; BERRY, 2020). Entretanto, para que ocorra um estado neuroinflamatório na prole, é necessário, primeiramente, a participação da mãe neste processo. A seguir, serão apresentados os possíveis mecanismos pelos quais ocorre a partir da mãe, a transferência de mediadores inflamatórios para a prole em formação. Posteriormente, serão elucidados os impactos da neuroinflamação durante a vida desses indivíduos.

Uma das principais consequências da obesidade é o acúmulo de tecido adiposo, que é decorrente de um aumento constante da energia diária ingerida em relação ao gasto energético (MORGEN; SORENSEN, 2014). Dessa forma, a constante expansão (hiperplasia) e aumento de tamanho (hipertrofia) dos adipócitos, principais componentes do tecido adiposo, promove inflamação local, através da alteração fenotípica dos macrófagos para um estado pró-inflamatório e infiltração de células imunes no tecido. Este processo inflamatório observado nos adipócitos de indivíduos obesos tem a característica de ser de baixo grau e estar constantemente presente (SCHEJA; HEEREN, 2019). Essa alteração também pode ocorrer

com mães obesas durante as fases de gestação e lactação, com aumento da ativação de macrófagos e produção de citocinas no tecido adiposo, que por sua vez podem atingir a corrente sanguínea materna (BROADNEY et al., 2017; ELFEKY et al., 2017; PANAGOS et al., 2016).

Durante a gestação, dois mecanismos explicam a relação entre obesidade materna e inflamação na prole, e ambos envolvem a placenta. O primeiro está relacionado às vias STAT3 e p38-MAPK. A fosforilação de p38-MAPK em resíduos específicos de treonina e tirosina, ativa fatores de transcrição como c-fos, c-jun e ATF, regulando a expressão de genes pró-inflamatórios na célula (WHITMARSH, 2010). De forma semelhante, a via STAT3 também pode regular a expressão de genes inflamatórios direta ou indiretamente (LEVY; LEE, 2002). Em conjunto, ambas as vias citadas demonstraram estarem ativadas nas placentas de mães obesas (AYE et al., 2014; ROBERTS et al., 2011; SABEN et al., 2013). Adicionalmente, o aumento na expressão de outras vias inflamatórias foi relatado em mães obesas, como o aumento da ativação de NF- κ B e FOXO4 nuclear, que foi significativamente associado com a ativação de JNK e estresse oxidativo nas placentas. É importante ressaltar que essa modulação inflamatória na placenta materna pode alterar a regulação do transporte de nutrientes, com aumento no aporte de aminoácidos e ácidos graxos para o feto, este último, ainda, com atividade pró-inflamatória pela promoção da elevação de adiposidade na prole (AYE; JANSSON; POWELL, 2015; CALABUIG-NAVARRO et al., 2017).

O segundo mecanismo durante a fase de gestação está relacionado ao metabolismo dos ácidos graxos, que podem se acumular e comprometer o funcionamento da placenta. As placentas de mães obesas têm uma quantidade maior de lipídios armazenados, o que possivelmente está relacionado a uma regulação positiva de PPAR γ , um fator de transcrição ativado por lipídios que regula a expressão de genes de esterificação e armazenamento de gorduras (CALABUIG-NAVARRO et al., 2017; HIRSCHMUGL et al., 2016; SABEN et al., 2013). Devido à grande quantidade de ácidos graxos disponíveis na corrente sanguínea, provenientes principalmente da dieta materna (mas também em alguns casos devido à resistência à insulina e aumento da lipólise) (CALABUIG-NAVARRO et al., 2017), há uma ativação da via PPAR γ , que estimula a transcrição de genes chaves (DGAT1, SCD1 e ACC) envolvidos na esterificação e armazenamento de lipídios (SCHAIFF et al., 2005). Além disso, há uma mudança em genes que influenciam etapas determinantes na oxidação de ácidos graxos, como o CPT1 e o PPAR α , que têm sua expressão reduzida na placenta de mães obesas (CALABUIG-NAVARRO et al., 2017; VISIEDO et al., 2013). Essas alterações no

metabolismo dos ácidos graxos placentários pode ser um mecanismo compensatório para a mãe impedir que uma grande quantidade de lipídios chegue ao feto, proporcionando maior armazenamento destes na placenta (CALABUIG-NAVARRO et al., 2017), mesmo que, em alguns casos, essa passagem para a prole ocorra (AYE; JANSSON; POWELL, 2015). Porém, como consequência desse armazenamento lipídico, ocorre também um aumento na produção de radicais livres pela degradação dos ácidos graxos disponíveis, que por sua vez, podem levar à inflamação local, levando mais uma vez à passagem de mediadores para o feto (CALABUIG-NAVARRO et al., 2017).

Estudos com roedores vêm consistentemente reportando essas interações entre a mãe obesa e problemas na placenta durante a fase de gestação. Reynolds et al. (2015) usaram ratas Sprague Dawley tratadas durante a gravidez com dieta hiperlipídica e encontraram um aumento TNF- α no sangue e na placenta materna. Ademais, os autores desse estudo ainda demonstraram: acúmulo de lipídios na placenta; maior expressão de GLUT1, GLUT4, SNAT2 e SNAT4, que podem causar alterações no crescimento e desenvolvimento da prole, por serem importantes transportadores de glicose (GLUT1 e GLUT 4) e aminoácidos (SNAT2 e SNAT4). Resultados semelhantes foram encontrados por Louwagie et al. (2018), onde as mães tratadas com dieta hiperlipídica durante a gestação apresentaram: níveis mais elevados de triglicerídeos e ácidos graxos no sangue; maior expressão dos transportadores GLUT1 e acúmulo de lipídeos na placenta; além de níveis mais elevados de TNF- α placentário. Leirós et al. (2018) também encontraram nas placentas de mães obesas e no fígado da prole um aumento nos marcadores CD11b e c-Kit⁺/CD45⁺, que podem estar relacionados à inflamação sistêmica e ao comprometimento dos sistemas hematopoiéticos dos filhotes, respectivamente.

Diferentemente, durante a lactação, os mecanismos para a promoção de um estado inflamatório na prole a partir da mãe obesa envolvem o leite materno. Os lipídios são o segundo macronutriente mais comum no leite humano e estão presentes principalmente na forma de ácidos graxos, contribuindo com mais da metade do valor calórico total (SOSA-CASTILLO; RODRÍGUEZ-CRUZ; MOLTÓ-PUIGMARTÍ, 2017). Esses ácidos graxos do leite materno são produzidos diretamente a partir da síntese na glândula mamária (ácidos graxos com cadeia de carbono até C14:0) ou obtidos diretamente através da dieta (maior que C14:0) (SOSA-CASTILLO; RODRÍGUEZ-CRUZ; MOLTÓ-PUIGMARTÍ, 2017). Vários estudos demonstram que a dieta materna pode influenciar tanto na síntese direta nas glândulas mamárias, quanto na utilização de ácidos graxos sistêmicos para incorporação ao leite materno, podendo apresentar alterações em sua composição (incorporação de até 30% a mais

dos ácidos graxos totais) dentro de 8 a 10 horas após a ingestão de uma refeição hiperlipídica (ELLSWORTH et al., 2020; GARCÍA-RAVELO et al., 2018; SOSA-CASTILLO; RODRÍGUEZ-CRUZ; MOLTÓ-PUIGMARTÍ, 2017; WU et al., 2018). Destaca-se que, uma maior presença de ácidos graxos saturados no leite materno, ou uma alta proporção entre ácidos linoleico e linolênico (n:6/n:3), confere ao leite uma característica pró-inflamatória. A oferta desse tipo de alimentação à prole lactente pode gerar disfunções metabólicas, aumento da adiposidade, e, conseqüentemente, levar à inflamação nos filhotes (DE LA GARZA PUENTES et al., 2019; PANAGOS et al., 2016).

Apesar de poucos estudos dentro dessa temática em humanos, uma outra forma da mãe influenciar no estado inflamatório da prole durante a lactação seria através da passagem direta de mediadores no leite materno. Como exemplo, Saso et al. (2019) relataram aumento de várias citocinas no leite materno (TNF- α , IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4 e IL-6) de mães lactantes que possuíam peso corporal elevado. Whitaker et al. (2017) encontraram uma correlação entre mulheres obesas e a presença de proteína C reativa (PCR) no leite materno. Não se sabe se a PCR pode sobreviver à digestão nos neonatos, no entanto, nesse caso, a mesma poderia promover um desequilíbrio na microbiota intestinal, alterando a absorção intestinal e levando a distúrbios metabólicos que poderiam promover estados pró-inflamatórios (GÉRARD, 2016; WHITAKER et al., 2017).

Portanto, em conjunto, a obesidade materna durante as fases de gestação e lactação pode promover a passagem de mediadores ou mesmo alterar a composição dos macronutrientes (principalmente aumentando a concentração de ácidos graxos) que são passados para a prole, influenciando em um estado pró-inflamatório sistêmico nos descendentes. É importante ressaltar que, indivíduos nas primeiras fases da vida (feto ou recém-nascido) não possuem uma BHE totalmente desenvolvida, levando ao aumento na proporção da passagem de moléculas efetoras (como citocinas e outros agentes pró-inflamatórios) e de substâncias neurotóxicas (AFROZ; ALVIÑA, 2019; MILLER et al., 2016; SAUNDERS et al., 2014). Isso indica que há uma relação mais forte entre inflamação sistêmica e neuroinflamação durante essas fases, o que pode afetar algumas funções encefálicas que estão em um período de pleno desenvolvimento (NAJJAR et al., 2013).

Em humanos, são considerados etapas vulneráveis do neurodesenvolvimento as fases uterina, neonatal e os primeiros anos de vida, enquanto em roedores os períodos em que o encéfalo é mais susceptível a insultos compreendem as três semanas pré-natal e as duas primeiras pós-natal (RICE; BARONE JR, 2000). Dentre esses insultos, destaca-se a ativação

imune, que pode ser atingida de diversas formas, como através da dieta materna, como citado anteriormente (SOCH; SPENCER, 2020; SPENCER, 2017). A ativação microglial exacerbada e altos níveis de citocinas podem desempenhar um papel na limitação da plasticidade e no comprometimento de várias etapas da formação encefálica durante esses períodos. Por exemplo, pode-se citar problemas nas fases de proliferação, migração neuronal e crescimento de axônios, mielinização, sinaptogênese e apoptose. É necessário destacar que ao alterar alguma (ou muitas) dessas etapas, a ativação microglial exacerbada e, conseqüentemente, um estado neuroinflamatório, pode levar a conseqüências irreversíveis no comportamento ao longo da vida da prole (GRAHAM et al., 2018; HE et al., 2005; RUDOLPH et al., 2018; TCHESALOVA; POSILLICO; TRONSON, 2018).

Confirmando essas afirmações, estudos com roedores reportam a relação entre a obesidade materna com a neuroinflamação e mudanças de comportamento na prole ao longo da vida. Já foram observadas elevações de marcadores inflamatórios principalmente no hipocampo (GRAF et al., 2016; LIU et al., 2020; TEO; MORRIS; JONES, 2017; WINTHER et al., 2018) hipotálamo (LEMES et al., 2018; ORNELLAS et al., 2016) e amígdala (SASAKI et al., 2013; SMITH et al., 2020) dos filhotes oriundos de mães com dieta hiperlipídica. Esses achados foram relacionados a problemas de memória e aprendizagem, por meio dos testes de reconhecimento de objetos e dos labirintos de Barnes e em Y (CORDNER et al., 2019; GRAF et al., 2016; MUCCELLINI et al., 2019; PASE et al., 2017); altos níveis de comportamento tipo ansioso, avaliados por meio de vocalização ultrassônica e dos testes de labirinto em cruz elevado e campo aberto (ABUAISH; SPINIELI; MCGOWAN, 2018; GLENDINING; FISHER; JASONI, 2018; SASAKI et al., 2013; WINTHER et al., 2018); além de compulsão alimentar (ORNELLAS et al., 2016).

Diante desse cenário, fica evidente a necessidade da criação de estratégias que possam ser utilizadas como intervenções a serem feitas durante as fases iniciais da vida (gestação e/ou lactação) que possam melhorar ou prevenir alterações neuroimunes provocadas pela dieta materna (HOFFMAN; REYNOLDS; HARDY, 2017; SOCH; SPENCER, 2020). O pré-condicionamento ou tolerância ao LPS surge como uma alternativa para modulação neuroimune e em estudos de intervenção. Ao utilizar a tolerância ao LPS, há um processo de proteção ou atenuação às respostas inflamatórias promovidas por aplicações subsequentes, ou seja, há um efeito de hiporresponsividade, que pode ser utilizado, inclusive, para a supressão/atenuação da resposta a outros agentes inflamatórios (BAKUNINA; PARIANTE;

ZUNSZAIN, 2015; SEELEY; GHOSH, 2017; SPENCER; FIELD; PITTMAN, 2010). Isto posto, as características do LPS e o seu efeito de tolerância serão discutidos na próxima seção.

3.4 Lipopolissacarídeo

Os lipopolissacarídeos ou lipoglicanos são classificados como endotoxinas e são componentes estruturais da membrana de bactérias gram-negativas, possuindo fundamental importância para sua morfologia e função (BATINIĆ et al., 2016; TEO; MORRIS; JONES, 2017). Estruturalmente, o LPS apresenta uma ligação covalente entre uma bicamada de açúcar (hidrofílica) e outra de lipídeos (hidrofóbica), sendo esta última a responsável pela ação antigênica do mesmo, através da ativação dos receptores TLR₄, que estão envolvidos em respostas inflamatórias no hospedeiro (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

Após a ativação dos receptores TLR₄ pela ligação do LPS, esses podem estimular inúmeras vias de sinalização, como as proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), a AP-1, o transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT-1), e o IRF3, além da via do NF-κB, que é considerada umas das principais na mediação inflamatória (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006) e será descrita de forma mais específica a seguir.

A ligação do LPS nos TLR₄ promove o recrutamento de uma proteína adaptadora, a MyD88, mediante a ação da cinase associada ao receptor do IL-1 (*IL-1R-associated kinase*; IRAK). Em seguida, ocorre uma autofosforilação do IRAK que se dissocia do complexo e interage com o TRAF-6 (*necrosis factor receptor associated factor 6*). A partir do TRAF-6 ocorre a ativação da via do NF-κB, através da fosforilação das proteínas IκB por cinases específicas (*IκB kinase*; IKK) (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). O NF-κB então se desloca para o núcleo, onde promove a transcrição de inúmeros genes que atuam na expressão de mediadores inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, TNF-α, dentre outras (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

A aplicação de LPS sistêmico, na maioria das vezes por via intraperitoneal, vem sendo utilizada para mimetizar os processos inflamatórios de algumas doenças, com indução de inflamação sistêmica e de neuroinflamação (MWANZA et al., 2002). O baixo custo de aquisição dessa endotoxina e a sua alta efetividade na indução tanto da inflamação na periferia, como também à nível central, coloca o modelo de LPS como uma alternativa em estudos que necessitem da modulação do sistema imune.

Como exemplo, os efeitos da aplicação de LPS ($0,25 \text{ mg.kg}^{-1}$) intraperitoneal em ratas Sprague-Dawley durante o 15º dia gestacional – processo conhecido também como ativação imune materna – promoveu aumento nos níveis das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF α no sangue materno, líquido amniótico e no encéfalo da prole após apenas 4 horas da aplicação. Além disso, na adolescência da prole, foi observado diminuição da interação social e da exploração no campo aberto (OSKVIG et al., 2012). De forma semelhante, ratas Wistar gestantes receberam a aplicação de LPS ($0,25 \text{ mg.kg}^{-1}$) intraperitoneal também no 15º dia gestacional. Foram encontrados aumento nos marcadores do estresse oxidativo (malondialdeído e proteína carbonilada) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF α) no líquido amniótico e no encéfalo da prole, poucas horas após a administração. Na prole adulta, foi observado prejuízos na memória através do teste de reconhecimento de objetos (SIMÕES et al., 2018). Esses resultados da literatura indicam que a aplicação de LPS intraperitoneal durante a gestação pode induzir neuroinflamação na prole, fato que, provavelmente, é o fator desencadeador das alterações comportamentais observadas durante a vida (OSKVIG et al., 2012; SIMÕES et al., 2018).

Entretanto, recentemente, estudos vêm trazendo uma nova abordagem para a aplicação experimental de LPS. A reexposição ao LPS por mais de uma aplicação pode reduzir a pirogenicidade dessa endotoxina, enquanto reexposições repetidas demonstraram maior efeito de tolerização, com indução de hiporresponsividade inflamatória, podendo perdurar o efeito por semanas (SEELEY; GHOSH, 2017). É interessante notar que esse efeito apresenta-se conservado na maioria das espécies de mamíferos, tendo sido reportado em roedores (BAKUNINA; PARIANTE; ZUNSZAIN, 2015; BANASIKOWSKI et al., 2015; SPENCER; FIELD; PITTMAN, 2010), primatas (KAMPERSCHROER et al., 2019) e humanos (DE VOS et al., 2009; DRAISMA et al., 2009).

Em relação ao mecanismo pelo qual ocorre essa modulação da resposta inflamatória ocorre, estudos anteriores demonstraram que a reexposição ao LPS promoveu: redução na expressão celular de TLR $_4$ e na associação entre MyD88-TLR $_4$ (CHANG et al., 2014; LAJQI et al., 2019); diminuição na atividade da cinase associada ao IRAK; redução na fosforilação das cinases p38 e JNK (*c-Jun amino-terminal kinase*) (STARK et al., 2016), além da regulação negativa na expressão do NF κ B (STARK et al., 2016; YU et al., 2018). Todos esses fatores são elementos chave na cascata da resposta inflamatória que culmina com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, portanto, a tolerância ao LPS pode ter como efeito final uma redução na inflamação. Adicionalmente, outros estudos evidenciaram aumento na

concentração de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, quando o LPS era administrado repetidas vezes em roedores (BISWAS; LOPEZ-COLLAZO, 2009; HOBBS et al., 2018; LEITE et al., 2016; LIU et al., 2017; VERGADI; VAPORIDI; TSATSANIS, 2018). Esse fato pode ser explicado através da regulação negativa tardia de genes associados à expressão dessa citocina, como o microRNA-98 (miR-98) e o microRNA-21 (miR-21) (JI et al., 2018; LIU et al., 2011; NAHID et al., 2013; SHEEDY, 2015; SHEEDY et al., 2010).

O mais interessante do efeito de tolerância ao LPS é que essa abordagem não só leva a uma hiperresponsividade duradoura à reexposição a essa endotoxina, como também parece promover um efeito protetor no comportamento de roedores (BAKUNINA; PARIANTE; ZUNZAIN, 2015; BANASIKOWSKI et al., 2015; SEELEY; GHOSH, 2017; SPENCER; FIELD; PITTMAN, 2010). No trabalho de Banasikowski et al. (2015) baixas doses de LPS demonstraram efeito tipo-ansiolítico no teste claro-escuro. No entanto, a reexposição a essa endotoxina promoveu um efeito de tolerância e diminuiu a ansiedade dos roedores nesse teste, de uma forma dependente da dose e proporcional ao tempo de exposição. Em outro estudo, a aplicação de LPS ($0,3\text{mg.kg}^{-1}$) nos dias gestacionais 16 e 17, promoveu na prole adulta (fêmeas) proteção na memória espacial, avaliada através do labirinto aquático de Morris (CHLODZINSKA et al., 2011).

Por fim, uma última e importante aplicabilidade da tolerância ao LPS deve ser ressaltada, o efeito de tolerância cruzada a outros agentes inflamatórios. Alguns estudos demonstraram esse efeito obtido da reexposição ao LPS em associação com vários outros agentes pró-inflamatórios, tais como: redução da inflamação contra crises epiléticas induzidas por choque eletroconvulsivo (AMINI et al., 2018); lesão de isquemia-reperfusão renal (HE et al., 2014; WANG et al., 2018); inflamação alérgica das vias aéreas (KUMAR; ADHIKARI, 2017); e lesões traumáticas encefálicas (TURNER et al., 2017). Os resultados desses estudos indicam que a tolerância ao LPS pode promover um efeito de hiporresponsividade a outros agentes também, não somente à sua própria reexposição, possuindo potencial para ser empregado na intervenção ou na prevenção de processos inflamatórios.

Dentro da temática do presente trabalho, um único estudo na literatura utilizou o LPS para promover um efeito de tolerância à dieta materna hiperlipídica. Huang et al. (2015) administraram dieta hiperlipídica (do 1º dia pré-natal ao 21º dia pós-natal) e LPS (no 8º, 10º e 12º dias pré-natal; dose de $0,4\text{ mg.kg}^{-1}$ por dia) em ratas, e avaliaram na prole adulta o perfil inflamatório, a morfologia celular e a expressão de proteínas relacionadas à cognição no

hipocampo. A prole das mães que receberam ambos os tratamentos (dieta hiperlipídica e LPS) apresentou células hipocampais com núcleo, membranas e cromatina sem alterações, bem como o perfil inflamatório semelhante ao grupo controle, enquanto nos animais que as mães tiveram somente um dos tratamentos (LPS ou dieta hiperlipídica isolados) modificações morfológicas (neurônios degenerados, desarranjados ou com alterações nos núcleos e cromatina) e o aumento de IL-6 e TNF- α hipocampais foram observados. Huang et al. (2015) também demonstraram que o modelo citado pode alterar a expressão de proteínas relacionadas ao estado cognitivo. A expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e da proteína Tau estavam diminuídas no hipocampo dos animais que as mães receberam os dois tratamentos em conjunto (dieta hiperlipídica e LPS), fato não observado quando os tratamentos eram isolados.

Dentro do contexto apresentado, os capítulos a seguir irão abordar os efeitos promovidos na prole pela reexposição ao LPS durante a gestação de ratas-mães que receberam dieta hiperlipídica durante as fases de gestação e lactação. No primeiro capítulo será dado foco ao perfil inflamatório e estado redox das estruturas encefálicas do córtex pré-frontal e do hipocampo, além da avaliação da memória de objetos de curto e longo prazo da prole na adolescência. No segundo capítulo, as análises de citocinas e o estado redox serão apresentados para a região da amígdala, bem como a concentração de corticosterona plasmática e avaliação de comportamentos do tipo-ansiedade na prole.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K. **Imunologia celular e molecular**. 7.ed., Rio de Janeiro:Elsevier, 2011.

ABUAISH, Sameera; SPINIELI, Richard L.; MCGOWAN, Patrick O. Perinatal high fat diet induces early activation of endocrine stress responsivity and anxiety-like behavior in neonates. **Psychoneuroendocrinology**, [on-line], v. 98, p. 11–21, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306453018302907>>

AFROZ, Kazi Farhana; ALVIÑA, Karina. Maternal elevated salt consumption and the development of autism spectrum disorder in the offspring. **Journal of Neuroinflammation**, [on-line], v. 16, n. 265, p. 1–11, 2019. Disponível em: <<https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-019-1666-2>>

AKIRA, Shizuo; UEMATSU, Satoshi; TAKEUCHI, Osamu. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, [on-line], v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>>

AMINI, Elham et al. Brain Lipopolysaccharide Preconditioning-Induced Gene Reprogramming Mediates a Tolerance State in Electroconvulsive Shock Model of Epilepsy. **Frontiers in Pharmacology**, [on-line], 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00416>>

ARAD, Michal et al. Immune activation in lactating dams alters sucklings' brain cytokines and produces non-overlapping behavioral deficits in adult female and male offspring: A novel neurodevelopmental model of sex-specific psychopathology. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 63, p. 35–49, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159117300156>>

AYE, Irving L. M. H. et al. Increasing Maternal Body Mass Index Is Associated with Systemic Inflammation in the Mother and the Activation of Distinct Placental Inflammatory Pathways. **Biology of Reproduction**, [on-line], v. 90, n. 6, p. 1–9, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.116186>>

AYE, Irving L. M. H.; JANSSON, Thomas; POWELL, Theresa L. TNF- α stimulates System A amino acid transport in primary human trophoblast cells mediated by p38 MAPK signaling. **Physiological Reports**, [on-line], v. 3, n. 10, p. 1–11, 2015. Disponível em: <<https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.14814/phy2.12594>>

BAKER, D. G. et al. Plasma and cerebrospinal fluid interleukin-6 concentrations in posttraumatic stress disorder. **Neuroimmunomodulation**, [on-line], v. 9, n. 4, p. 209–217, 2001. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/Abstract/49028>>

BAKUNINA, Nataliia; PARIANTE, Carmine M.; ZUNZAIN, Patricia A. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. **Immunology**, [on-line], v. 144, n. 3, p. 365–373, 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imm.12443>>

BANASIKOWSKI, Tomek J. et al. Repeated exposure of male mice to low doses of lipopolysaccharide: Dose and time dependent development of behavioral sensitization and tolerance in an automated light–dark anxiety test. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v.

286, p. 241–248, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432815001485>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

BATINIĆ, Bojan et al. Lipopolysaccharide exposure during late embryogenesis results in diminished locomotor activity and amphetamine response in females and spatial cognition impairment in males in adult, but not adolescent rat offspring. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v. 299, p. 72–80, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432815302989>>

BISWAS, Subhra K.; LOPEZ-COLLAZO, Eduardo. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. **Trends in Immunology**, [on-line], v. 30, n. 10, p. 475–487, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1471490609001549>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

BLOOMFIELD, Peter S. et al. Microglial Activity in People at Ultra High Risk of Psychosis and in Schizophrenia: An [(11)C]PBR28 PET Brain Imaging Study. **The American journal of psychiatry**, [on-line], v. 173, n. 1, p. 44–52, 2016.

BROADNEY, M. M. et al. Impact of parental obesity on neonatal markers of inflammation and immune response. **International Journal of Obesity**, [on-line], v. 41, n. 1, p. 30–37, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ijo.2016.187>>

CAIN, Derek W.; CIDLOWSKI, John A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nature Reviews Immunology**, [on-line], v. 17, n. 4, p. 233–247, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.1>>

CALABUIG-NAVARRO, Virtu et al. Effect of Maternal Obesity on Placental Lipid Metabolism. **Endocrinology**, [on-line], v. 158, n. 8, p. 2543–2555, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28541534>>

CHANG, Ruiming et al. LPS preconditioning ameliorates intestinal injury in a rat model of hemorrhagic shock. **Inflammation Research**, [on-line], v. 63, n. 8, p. 675–682, 2014.

CHLODZINSKA, Natalia et al. Lipopolysaccharide injected to pregnant mice affects behavior of their offspring in adulthood. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, [on-line], v. 71, n. 4, p. 519–527, 2011.

CIRULLI, Francesca; MUSILLO, Chiara; BERRY, Alessandra. Maternal Obesity as a Risk Factor for Brain Development and Mental Health in the Offspring. **Neuroscience**, [on-line], v. 447, n. February, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.01.023>>

COLLABORATORS, G. B. D. 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet (London, England)**, [on-line], v. 392, n. 10159, p. 1789–1858, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30496104>>

CORDNER, Zachary A. et al. Maternal high-fat diet results in cognitive impairment and hippocampal gene expression changes in rat offspring. **Experimental Neurology**, [on-line], v. 318, n. April, p. 92–100, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.04.018>>

CORREALE, Jorge; VILLA, Andrés. The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. **Journal of Neurology**, [on-line], v. 251, n. 11, p. 1304–1316, 2004. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00415-004-0649-z>>

COUGHLIN, J. M. et al. In vivo markers of inflammatory response in recent-onset schizophrenia: a combined study using [(11)C]DPA-713 PET and analysis of CSF and plasma. **Translational Psychiatry**, [on-line], v. 6, p. e777, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/tp201640>>

DE LA GARZA PUENTES, Andrea et al. The Effect of Maternal Obesity on Breast Milk Fatty Acids and Its Association with Infant Growth and Cognition—The PREOBE Follow-Up. **Nutrients**, [on-line], v. 11, n. 9, 2019. Disponível em: <<https://10.3390/nu11092154>>.

DE VOS, Alex F. et al. In Vivo Lipopolysaccharide Exposure of Human Blood Leukocytes Induces Cross-Tolerance to Multiple TLR Ligands. **The Journal of Immunology**, [on-line], v. 183, n. 1, p. 533 – 542, 2009. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/183/1/533.abstract>>

DESAI, Mina; HAN, Guang; ROSS, Michael G. Programmed hyperphagia in offspring of obese dams: Altered expression of hypothalamic nutrient sensors, neurogenic factors and epigenetic modulators. **Appetite**, [on-line], v. 99, p. 193–199, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195666316300228>>

DRAISMA, Annelies et al. Development of endotoxin tolerance in humans in vivo. **Critical Care Medicine**, [on-line], v. 37, n. 4, 2009. Disponível em: <https://journals.lww.com/ccmjjournal/Fulltext/2009/04000/Development_of_endotoxin_tolerance_in_humans_in.13.aspx>

DURÁN-CARABALI, L. E. et al. Preventive and therapeutic effects of environmental enrichment in Wistar rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v. 359, p. 485–497, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432818311707>>

ELFEKY, Omar et al. Influence of maternal BMI on the exosomal profile during gestation and their role on maternal systemic inflammation. **Placenta**, [on-line], v. 50, p. 60–69, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400416306749>>

ELLSWORTH, Lindsay et al. Impact of maternal overweight and obesity on milk composition and infant growth. **Maternal & Child Nutrition**, [on-line], v. 16, p. e12979, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/mcn.12979>>

ERICKSON, M. A.; DOHI, K.; BANKS, W. A. Neuroinflammation: A Common Pathway in CNS Diseases as Mediated at the Blood-Brain Barrier. **Neuroimmunomodulation**, [on-line], v. 19, n. 2, p. 121–130, 2012. Disponível em: <<https://www.karger.com/DOI/10.1159/000330247>>

FAN, Zhen et al. An early and late peak in microglial activation in Alzheimer's disease trajectory. **Brain: a journal of neurology**, [on-line], v. 140, n. 3, p. 792–803, 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/brain/article/140/3/792/2951049>>

FIGUEIRÓ, Paula W. et al. The neuroprotective role of melatonin in a gestational

hypermethioninemia model. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [on-line], v. 78, n. 1, p. 198–209, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2019.08.004>>

FISCH, Joana et al. Maternal feeding associated to post-weaning diet affects metabolic and behavioral parameters in female offspring. **Physiology & Behavior**, [on-line], v. 204, p. 162–167, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031938418311272>>. Acesso em: 20 jan. 2020.

FULLERTON, James N.; GILROY, Derek W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, [on-line], v. 15, n. 8, p. 551–567, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrd.2016.39>>

GARCÍA-RAVELO, Sara et al. Fatty Acid Composition and Eicosanoid Levels (LTE4 and PGE2) of Human Milk from Normal Weight and Overweight Mothers. **Breastfeeding Medicine**, [on-line], v. 13, n. 10, p. 702–710, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/bfm.2017.0214>>

GÉRARD, Philippe. Gut microbiota and obesity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [on-line], v. 73, n. 1, p. 147–162, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00018-015-2061-5>>

GLENDINING, Kelly A.; FISHER, Lorryn C.; JASONI, Christine L. Maternal high fat diet alters offspring epigenetic regulators, amygdala glutamatergic profile and anxiety. **Psychoneuroendocrinology**, [on-line], v. 96, p. 132–141, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306453018302099>>

GRAF, Amanda E. et al. Maternal high fat diet exposure is associated with increased hepcidin levels, decreased myelination, and neurobehavioral changes in male offspring. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 58, p. 369–378, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2016.08.005>>

GRAHAM, Alice M. et al. Maternal Systemic Interleukin-6 During Pregnancy Is Associated With Newborn Amygdala Phenotypes and Subsequent Behavior at 2 Years of Age. **Biological Psychiatry**, [on-line], v. 83, n. 2, p. 109–119, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.05.027>>

HAMELIN, Lorraine et al. Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18 F-DPA-714 PET imaging. **Brain**, [on-line], v. 139, n. 4, p. 1252–1264, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/brain/aww017>>

HE, Fei et al. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. **Nature Neuroscience**, [on-line], v. 8, n. 5, p. 616–625, 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15852015>>

HE, Kang et al. Lipopolysaccharide-induced cross-tolerance against renal ischemia-reperfusion injury is mediated by hypoxia-inducible factor-2 α -regulated nitric oxide production. **Kidney International**, [on-line], v. 85, n. 2, p. 276–288, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0085253815561929>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

HIRSCHMUGL, B. et al. Maternal obesity modulates intracellular lipid turnover in the

human term placenta. **Nature Publishing Group**, [on-line], v. 41, n. 2, p. 317–323, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2016.188>>

HOBBS, Stuart et al. LPS-stimulated NF- κ B p65 dynamic response marks the initiation of TNF expression and transition to IL-10 expression in RAW 264.7 macrophages. **Physiological Reports**, [on-line], v. 6, n. 21, p. e13914–e13914, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30426723>>

HOFFMAN, Daniel J.; REYNOLDS, Rebecca M.; HARDY, Daniel B. Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms. **Nutrition Reviews**, [on-line], v. 75, n. 12, p. 951–970, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nutrit/nux053>>

HUANG, C. F. et al. Effect of prenatal exposure to LPS combined with pre- and post-natal high-fat diet on hippocampus in rat offspring. **Neuroscience**, [on-line], v. 286, n. December, p. 364–370, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452214010343>>

Jl, Yang-Fei et al. MicroRNA-132 attenuates LPS-induced inflammatory injury by targeting TRAF6 in neuronal cell line HT-22. **Journal of Cellular Biochemistry**, [on-line], v. 119, n. 7, p. 5528–5537, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jcb.26720>>

KAMPERSCHROER, Cris et al. Utilization of lipopolysaccharide challenge in cynomolgus macaques to assess IL-10 receptor antagonism. **Journal of Immunotoxicology**, [on-line], v. 16, n. 1, p. 164–172, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/1547691X.2019.1656683>>

KHANDAKER, G. M.; DIBBEN, C. R. M.; JONES, P. B. Does maternal body mass index during pregnancy influence risk of schizophrenia in the adult offspring? **Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, [on-line], v. 13, n. 6, p. 518–527, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22188548/>>

KRZECZKOWSKI, John E. et al. Neurodevelopment in 3–4 year old children exposed to maternal hyperglycemia or adiposity in utero. **Early Human Development**, [on-line], v. 125, p. 8–16, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378378218303542>>

KUMAR, Sudhir; ADHIKARI, Atin. Dose-dependent immunomodulating effects of endotoxin in allergic airway inflammation. **Innate Immunity**, [on-line], v. 23, n. 3, p. 249–257, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28142300/>>

LAFRANCE, Véronique et al. Leptin modulates cell morphology and cytokine release in microglia. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 24, n. 3, p. 358–365, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159109005145>>

LAJQI, Trim et al. Memory-Like Inflammatory Responses of Microglia to Rising Doses of LPS: Key Role of PI3K γ . **Frontiers in Immunology**, [on-line], v. 10, n. 2492, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.02492>>

LEE, Andrew S. et al. Developmental microglial priming in postmortem autism spectrum disorder temporal cortex. **Brain Behavior and Immunity**, [on-line], v. 62, p. 193–202, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2017.01.019>>

LEIRÓS, Luana et al. Hematopoietic changes in the offspring induced by maternal overweight: Effect on placenta and fetal liver populations. **Placenta**, [on-line], v. 64, p. 7–16, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400418300407>>

LEITE, Hércules Ribeiro et al. Vesicular acetylcholine transporter knock down-mice are more susceptible to inflammation, c-Fos expression and sickness behavior induced by lipopolysaccharide. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 57, p. 282–292, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159116301155>>

LEMES, Simone Ferreira et al. Maternal Consumption of High-fat Diet in Mice Alters Hypothalamic Notch Pathway, NPY Cell Population and Food Intake in Offspring. **Neuroscience**, [on-line], v. 371, p. 1–15, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452217308461>>

LEVY, David E.; LEE, Chien-kuo. What does Stat3 do? **The Journal of Clinical Investigation**, [on-line], v. 109, n. 9, p. 1143–1148, 2002. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/15650>>

LI, Hua; SAGAR, Aadi P.; KERI, Szabolcs. Translocator protein (18kDa TSPO) binding, a marker of microglia, is reduced in major depression during cognitive-behavioral therapy. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, [on-line], v. 83, p. 1–7, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.12.011>>

LI, Hua; SAGAR, Aadi P.; KERI, Szabolcs. Microglial markers in the frontal cortex are related to cognitive dysfunctions in major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, [on-line], v. 241, p. 305–310, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.08.021>>

LI, Ya-Min et al. Association Between Maternal Obesity and Autism Spectrum Disorder in Offspring: A Meta-analysis. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, [on-line], v. 46, n. 1, p. 95–102, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10803-015-2549-8>>

LIU, Wen-Chung et al. Maternal high fructose-induced hippocampal neuroinflammation in the adult female offspring via PPAR γ -NF- κ B signaling. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [on-line], p. 108378, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286319307673>>

LIU, Yang et al. MicroRNA-98 negatively regulates IL-10 production and endotoxin tolerance in macrophages after LPS stimulation. **FEBS Letters**, [on-line], v. 585, n. 12, p. 1963–1968, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.029>>

LIU, Yang et al. Peripheral immune tolerance alleviates the intracranial lipopolysaccharide injection-induced neuroinflammation and protects the dopaminergic neurons from neuroinflammation-related neurotoxicity. **Journal of Neuroinflammation**, [on-line], v. 14, n. 1, p. 223, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29145874>>

LOUWAGIE, Eli J. et al. Placental lipid processing in response to a maternal high-fat diet and diabetes in rats. **Pediatric Research**, [on-line], v. 83, n. 3, p. 712–722, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29166372>>

LYDECKER, Janet A.; GRILO, Carlos M. Children of parents with BED have more eating

behavior disturbance than children of parents with obesity or healthy weight. **The International journal of eating disorders**, [on-line], v. 50, n. 6, p. 648–656, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27859458>>

MACKAY, Euan et al. Association of Gestational Weight Gain and Maternal Body Mass Index in Early Pregnancy With Risk for Nonaffective Psychosis in Offspring. **JAMA Psychiatry**, [on-line], v. 74, n. 4, p. 339–349, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2016.4257>>

MEDZHITOV, Ruslan. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, [on-line], v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature07201>>

MILLER, Stephanie M. et al. The blood-brain barrier ; protecting the developing fetal brain. **Placenta**, [on-line], v. 54, p. 1–6, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.12.005>>

MINA, T. H. et al. Prenatal exposure to very severe maternal obesity is associated with adverse neuropsychiatric outcomes in children. **Psychological Medicine**, [on-line], v. 47, n. 2, p. 353–362, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0033291716002452>>

MORGAN, John T. et al. Stereological study of amygdala glial populations in adolescents and adults with autism spectrum disorder. **PLoS one**, [on-line], v. 9, n. 10, p. e110356, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25330013/>>

MORGANE, Peter J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [on-line], v. 17, n. 1, p. 91–128, 1993. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763405802349>>

MORGEN, Camilla Schmidt; SORENSEN, Thorkild I. A. Obesity: global trends in the prevalence of overweight and obesity. **Nature reviews. Endocrinology**, [on-line], v. 10, n. 9, p. 513–514, 2014.

MUCCELLINI, Amanda Brondani et al. Maternal and post-natal obesity alters long-term memory and hippocampal molecular signaling of male rat. **Brain Research**, [on-line], v. 1708, p. 138–145, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006899318306395>>. Acesso em: 19 jan. 2020.

MWANZA, A. M. et al. Postovulatory effect of intravenous administration of lipopolysaccharide (E. coli, O55:B5) on the contractile activity of the oviduct, ova transport, binding of accessory spermatozoa to the zona pellucida and embryo development in sows. **Reproduction in Domestic Animals**, [on-line], v. 37, n. 5, p. 269–274, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12354178/>>

NAEF, L. et al. Maternal high-fat intake alters presynaptic regulation of dopamine in the nucleus accumbens and increases motivation for fat rewards in the offspring. **Neuroscience**, [on-line], v. 176, p. 225–236, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452210016428>>

NAHID, Md A. et al. Regulation of TLR2-Mediated Tolerance and Cross-Tolerance through IRAK4 Modulation by miR-132 and miR-212. **The Journal of Immunology**, [on-line], v. 190, n. 3, p. 1250 - 1263, 2013. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/190/3/1250.abstract>>

NAJJAR, Souhel et al. Neuroinflammation and psychiatric illness. **Journal of Neuroinflammation**, [on-line], v. 10, n. 1, p. 816, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-43>>

ORNELLAS, Fernanda et al. Combined parental obesity augments single-parent obesity effects on hypothalamus inflammation, leptin signaling (JAK/STAT), hyperphagia, and obesity in the adult mice offspring. **Physiology & Behavior**, [on-line], v. 153, p. 47–55, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938415301487>>

OSKVIG, Devon B. et al. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 26, n. 4, p. 623–634, 2012. Disponível em: < [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889-1591\(12\)00017-7](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889-1591(12)00017-7)>

PANAGOS, P. G. et al. Breastmilk from obese mothers has pro-inflammatory properties and decreased neuroprotective factors. **Journal of Perinatology**, [on-line], v. 36, n. 4, p. 284–290, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/jp.2015.199>>

PASE, Camila Simonetti et al. Maternal trans fat intake during pregnancy or lactation impairs memory and alters BDNF and TrkB levels in the hippocampus of adult offspring exposed to chronic mild stress. **Physiology & Behavior**, [on-line], v. 169, p. 114–123, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938416305911>>

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Neural regulators of innate immune responses and inflammation. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, [on-line], v. 61, n. 18, p. 2322–2331, 2004. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-004-4102-3>>

PETIT-PEDROL, Mar et al. Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABAA receptor: a case series, characterisation of the antigen, and analysis of the effects of antibodies. **The Lancet. Neurology**, [on-line], v. 13, n. 3, p. 276–286, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4838043/> >

PRADO, Elizabeth L.; DEWEY, Kathryn G. Nutrition and brain development in early life. **Nutrition Reviews**, [on-line], v. 72, n. 4, p. 267–284, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/nure.12102>>

QUAN, Ning. Immune-To-Brain Signaling: How Important are the Blood–Brain Barrier-independent Pathways? **Molecular Neurobiology**, [on-line], v. 37, n. 2, p. 142–152, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12035-008-8026-z>>

RAETZ, Christian R. H.; WHITFIELD, Chris. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual review of biochemistry**, [on-line], v. 71, p. 635–700, 2002. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12045108/>>

REYNOLDS, Clare M. et al. Maternal high fat and/or salt consumption induces sex-specific inflammatory and nutrient transport in the rat placenta. **Physiological Reports**, [on-line], v. 3, n. 5, p. e12399, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25991721>>

RIBEIRO, Ana Cláudia Alves Freire et al. Cafeteria diet during the gestation period programs developmental and behavioral courses in the offspring. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [on-line], v. 68, p. 45–52, 2018. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0736574818300091>>

RICE, D.; BARONE JR, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental health perspectives**, [on-line], v. 108 Suppl, n. Suppl 3, p. 511–533, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10852851>>

ROBERTS, K. A. et al. Placental structure and inflammation in pregnancies associated with obesity. **Placenta**, [on-line], v. 32, n. 3, p. 247–254, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400410005382>>

ROBINSON, Sonia L. et al. Parental Weight Status and Offspring Behavioral Problems and Psychiatric Symptoms. **The Journal of Pediatrics**, [on-line], v. 220, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022347620300299>>

RUDOLPH, Marc D. et al. Maternal IL-6 during pregnancy can be estimated from newborn brain connectivity and predicts future working memory in offspring. **Nature Neuroscience**, [on-line], v. 21, n. 5, p. 765–772, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41593-018-0128-y>>

SABEN, Jessica et al. Early growth response protein-1 mediates lipotoxicity-associated placental inflammation: role in maternal obesity. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, [on-line], v. 305, n. 1, p. E1–E14, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23632636>>

SASAKI, A. et al. Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. **Neuroscience**, [on-line], v. 240, p. 1–12, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452213001851>>

SASAKI, Aya; MCGOWAN, Patrick O.; ERB, Suzanne. A study of the effects of maternal high fat diet on behavioural responses to acute and repeated administrations of cocaine in rat offspring. **Neuroscience Letters**, [on-line], v. 673, p. 157–162, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.03.019>>

SASO, Anja et al. Breast Milk Cytokines and Early Growth in Gambian Infants. **Frontiers in Pediatrics**, [on-line], v. 6, n. 414, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fped.2018.00414>>

SAUNDERS, Norman R. et al. The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. **Frontiers in Neuroscience**, [on-line], v. 8, p. 404, 2014. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2014.00404>>

SCHAIFF, W. Timothy et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor signaling regulate fatty acid uptake by primary human placental trophoblasts. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [on-line], v. 90, n. 7, p. 4267–4275, 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article/90/7/4267/2837438>>

SCHEJA, Ludger; HEEREN, Joerg. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. **Nature Reviews Endocrinology**, [on-line], v. 15, n. 9, p. 507–524, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41574-019-0230-6>>

SEELEY, John J.; GHOSH, Sankar. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. **Journal of Leukocyte Biology**, [on-line], v. 101, n. 1, p. 107–119, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jlb.101.1.107>>

em: <<https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0316-118RR>>

SELL, Stewart. **Immunology, Immunopathology, and Immunity**. 6.ed. New York: American Society for Microbiology, 2001.

SHABAB, Tara et al. Neuroinflammation pathways: a general review. **International Journal of Neuroscience**, [on-line], v. 127, n. 7, p. 624–633, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1212854>>

SHEEDY, Frederick J. et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. **Nature Immunology**, [on-line], v. 11, n. 2, p. 141–147, 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ni.1828>>

SHEEDY, Frederick J. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. **Frontiers in Immunology**, [on-line], v. 6, p. 19, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310327/>>

SIMÕES, Lutiana Roque et al. Maternal immune activation induced by lipopolysaccharide triggers immune response in pregnant mother and fetus, and induces behavioral impairment in adult rats. **Journal of Psychiatric Research**, [on-line], v. 100, p. 71–83, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022395617311822>>

SMITH, Brittany L. et al. Adolescent microglia play a role in executive function in male mice exposed to perinatal high fat diet. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 84, p. 80–89, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159119306312>>

SOCH, Alita; SPENCER, Sarah J. Consequences of early life overfeeding for microglia – Perspectives from rodent models. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 88, p. 256–261, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159120300520>>

SOSA-CASTILLO, Elizabeth; RODRÍGUEZ-CRUZ, Maricela; MOLTÓ-PUIGMARTÍ, Carolina. Genomics of lactation: role of nutrigenomics and nutrigenetics in the fatty acid composition of human milk. **British Journal of Nutrition**, [on-line], v. 118, n. 3, p. 161–168, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0007114517001854>>

SPENCER, S. J.; FIELD, E.; PITTMAN, Q. J. Neonatal programming by neuroimmune challenge: effects on responses and tolerance to septic doses of lipopolysaccharide in adult male and female rats. **Journal of Neuroendocrinology**, [on-line], v. 22, n. 4, p. 272–281, 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2826.2010.01967.x>>

SPENCER, Sarah J. et al. Food for thought: how nutrition impacts cognition and emotion. **npj Science of Food**, [on-line], v. 1, n. 1, p. 7, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41538-017-0008-y>>

SPENCER, Sarah J. Perinatal programming by inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 63, p. 1–7, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159117300491?via%3Dihub>>. Acesso em: 26 jan. 2020.

STARK, Ryan J. et al. Endothelial cell tolerance to lipopolysaccharide challenge is induced by monophosphoryl lipid A. **Clinical Science**, [on-line], v. 130, n. 6, p. 451–461, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1042/CS20150592>>

STONE, Vinicius et al. Gestational caloric restriction improves redox homeostasis parameters in the brain of Wistar rats: a screening from birth to adulthood. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [on-line], v. 67, p. 138–148, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286318306211>>

SULLIVAN, Elinor L. et al. Maternal high-fat diet programming of the neuroendocrine system and behavior. **Hormones and Behavior**, [on-line], v. 76, p. 153–161, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0018506X15000586>>

SURIDJAN, I. et al. In-vivo imaging of grey and white matter neuroinflammation in Alzheimer's disease: a positron emission tomography study with a novel radioligand, [18F]-FEPPA. **Molecular Psychiatry**, [on-line], v. 20, n. 12, p. 1579–1587, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/mp.2015.1>>

TAKANO, Akihiro et al. Peripheral benzodiazepine receptors in patients with chronic schizophrenia: a PET study with [11C]DAA1106. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, [on-line], v. 13, n. 7, p. 943–950, 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ijnp/article/13/7/943/668667>>

TCHESSALOVA, Daria; POSILLICO, Caitlin Kelly; TRONSON, Natalie Celia. Neuroimmune Activation Drives Multiple Brain States. **Frontiers in Systems Neuroscience**, [on-line], v. 12, n. 39, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnsys.2018.00039>>

TEO, Jonathan D.; MORRIS, Margaret J.; JONES, Nicole M. Maternal obesity increases inflammation and exacerbates damage following neonatal hypoxic-ischaemic brain injury in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 63, p. 186–196, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159116304731>>

TETREAULT, Nicole A. et al. Microglia in the cerebral cortex in autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, [on-line], v. 42, n. 12, p. 2569–2584, 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10803-012-1513-0>>

THOMPSON, Jacqueline R. et al. Maternal Diet, Metabolic State, and Inflammatory Response Exert Unique and Long-Lasting Influences on Offspring Behavior in Non-Human Primates. **Frontiers in Endocrinology**, [on-line], 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00161>>

TURNER, Ryan C. et al. Single low-dose lipopolysaccharide preconditioning: neuroprotective against axonal injury and modulates glial cells. **Neuroimmunology and neuroinflammation**, [on-line], v. 4, p. 6–15, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28164149>>

VAN LIESHOUT, Ryan J.; ROBINSON, Monique; BOYLE, Michael H. Maternal Pre-Pregnancy Body Mass Index and Internalizing and Externalizing Problems in Offspring. **The Canadian Journal of Psychiatry**, [on-line], v. 58, n. 3, p. 151–159, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/070674371305800305>>

VERGADI, Eleni; VAPORIDI, Katerina; TSATSANIS, Christos. Regulation of Endotoxin Tolerance and Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome by Non-coding RNAs. **Frontiers in immunology**, [on-line], v. 9, p. 2705, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30515175>>

VIGO, Daniel; THORNICROFT, Graham; ATUN, Rifat. Estimating the true global burden of mental illness. **The Lancet Psychiatry**, [on-line], v. 3, n. 2, p. 171–178, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215036615005052>>

VISIEDO, Francisco et al. High glucose levels reduce fatty acid oxidation and increase triglyceride accumulation in human placenta. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, [on-line], v. 305, n. 2, p. E205-12, 2013. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpendo.00032.2013>>

VIVIER, Eric; MALISSEN, Bernard. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. **Nature Immunology**, [on-line], v. 6, n. 1, p. 17–21, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ni1153>>

WANG, Zhe et al. Lipopolysaccharide preconditioning increased the level of regulatory B cells in the spleen after acute ischaemia/reperfusion in mice. **Brain Research**, [on-line], v. 1701, p. 46–57, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006899318302932>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

WHITAKER, Kara M. et al. Associations of Maternal Weight Status Before, During, and After Pregnancy with Inflammatory Markers in Breast Milk. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, [on-line], v. 25, n. 12, p. 2092–2099, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28985033>>

WHITMARSH, Alan J. A central role for p38 MAPK in the early transcriptional response to stress. **BMC Biology**, [on-line], v. 8, n. 47, p. 8–10, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-47>>

WHO, World Health Organization. **Obesity among women**. 2016. Disponível em: <https://www.who.int/gho/urban_health/physiological-risk-factors/women_obesity/en/index1.html>

WHO, World Health Organization. **Overweight and obesity**. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/>.

WINTHER, Gudrun et al. Maternal High-fat Diet Programs Offspring Emotional Behavior in Adulthood. **Neuroscience**, [on-line], v. 388, p. 87–101, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452218304895>>

WU, Xianli et al. Human Milk Nutrient Composition in the United States: Current Knowledge, Challenges, and Research Needs. **Current Developments in Nutrition**, [on-line], v. 2, n. 7, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30087951/>>

YU, Shuo et al. Protection of Lipopolysaccharide (LPS) Preconditioning against Endotoxin-Induced Uveitis (EIU) in Rats is Associated with Overexpression of Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase M (IRAK-M). **Ocular Immunology and Inflammation**, [on-line], v. 26, n. 6, p. 943–950, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09273948.2017.1291842>>

ZHANG, Jing. Mapping neuroinflammation in frontotemporal dementia with molecular PET imaging. **Journal of Neuroinflammation**, [*on-line*], v. 12, n. 1, p. 108, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12974-015-0236-5>>

CAPÍTULO 1

A tolerância ao LPS aumenta a IL-10 hipocampal e evita a perda de memória de curto prazo na prole de machos adolescentes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica

1 INTRODUÇÃO

Os períodos de gestação e lactação são fundamentais para o desenvolvimento encefálico da prole (DURÁN-CARABALI et al., 2019; FIGUEIRÓ et al., 2019; STONE et al., 2019). Em roedores, a neurogênese do córtex cerebral e do hipocampo ocorre entre a segunda semana do período pré-natal e a primeira semana pós-natal (RICE; BARONE JR, 2000; SEMPLE et al., 2013). Ademais, essas fases iniciais estão ligadas ao pico da gliogênese, ocorrendo um aumento da densidade axonal e dendrítica, o que leva à consolidação do sistema imunológico (BOCKHORST et al., 2008; CATALANI et al., 2002; HOLSAPPLE; WEST; LANDRETH, 2003; SEMPLE et al., 2013). Dessa forma, a gestação e a lactação são consideradas muito sensíveis a agressões, como dietas desequilibradas e/ou ativação imunológica. Dependendo das condições e do tempo de exposição, tais insultos podem provocar impactos nos processos cognitivos e de memória ao longo da vida da prole (SPENCER, 2017; SPENCER et al., 2017).

Recentemente, as dietas maternas hiperlipídicas vêm sendo associadas a alterações nos níveis celulares, estruturais e metabólicos do desenvolvimento encefálico da prole (CIRULLI; MUSILLO; BERRY, 2020; CORDNER et al., 2019a; FISCH et al., 2019; GRAF et al., 2016). A nível celular, é importante ressaltar o processo de neuroinflamação, que pode levar a alterações irreversíveis no comportamento (SULLIVAN et al., 2015; THOMPSON et al., 2018). Vários estudos associam a inflamação em regiões encefálicas como o hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala e hipotálamo à disfunções na prole relacionadas ao aprendizado, memória, ansiedade, e distúrbios metabólicos (CORDNER et al., 2019a; DIAS-ROCHA et al., 2018; GLENDINING; FISHER; JASONI, 2018; GRAF et al., 2016; LEMES et al., 2018). Destaca-se ainda que, em estudos anteriores, a inflamação hipocampal da prole de mães com dieta hiperlipídica levou à prejuízos nos processos cognitivos (CORDNER et al., 2019a) e de aprendizagem e memória da prole (GRAF et al., 2016; MINA et al., 2017).

A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio também figura como uma alteração pertinente a nível celular encefálico. Alguns trabalhos na literatura demonstraram a ocorrência de estresse oxidativo em regiões como o hipocampo e o córtex, levando a prejuízos no comportamento da prole (HATANAKA; WADA; KABUTA, 2016; MACIEL AUGUST et al., 2020). Além disso, existe uma forte associação entre o consumo de dietas hiperlipídicas, estresse oxidativo do hipocampo e prejuízos na memória de reconhecimento de objetos (TEIXEIRA et al., 2020; WANG et al., 2020).

A ativação imune materna (AIM) ocorre quando a mãe é exposta a uma infecção durante a gravidez ou lactação, o que pode levar a efeitos prejudiciais na prole (KNUESEL et al., 2014; MEEHAN et al., 2017). Estudos com roedores indicam que quando a AIM é induzida pela aplicação de LPS também pode induzir neuroinflamação e alterações comportamentais (FERNÁNDEZ DE COSSÍO et al., 2017; KENTNER et al., 2016; LABROUSSE et al., 2018; SPENCER; GALIC; PITTMAN, 2011; STRALEY et al., 2017). Porém, quando essa ativação imune é realizada repetidas vezes e em baixas doses, ocorre um efeito chamado de tolerância ou pré-condicionamento ao LPS. Essa tolerância confere proteção contra aplicações subsequentes do LPS, ou mesmo uma supressão/atenuação da resposta a outros mediadores inflamatórios (BAKUNINA; PARIANTE; ZUNSZAIN, 2015; SEELEY; GHOSH, 2017; SPENCER; FIELD; PITTMAN, 2010).

Em seu estudo, Huang et al. (2015) demonstraram que a tolerância ao LPS durante a gravidez pode promover uma resposta imunossupressora na prole, protegendo a mesma contra a inflamação hipocampal causada pela dieta hiperlipídica materna. Esse efeito de tolerância cruzada do LPS possui potencial para ser utilizado como uma intervenção a ser realizada nas fases iniciais da vida, de forma a atenuar ou prevenir a inflamação causada pela dieta materna (HOFFMAN; REYNOLDS; HARDY, 2017). No entanto, ainda não há relatos sobre a verificação da tolerância ao LPS em testes de memória de animais expostos a dieta hiperlipídica materna durante a gestação e a lactação.

Nesse contexto, este capítulo levanta a hipótese de que a tolerância ao LPS pode resultar em uma hiporresponsividade inflamatória no córtex pré-frontal e no hipocampo da prole adolescente de mães tratadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação. Espera-se ainda que a diminuição de citocinas pró-inflamatórias (ou aumento das anti-inflamatórias), bem como a atenuação do estresse oxidativo nessas regiões encefálicas, possa levar a um efeito protetor na memória de curto e longo prazo da prole adolescente.

2 OBJETIVOS

Avaliar o efeito protetor da tolerância ao LPS sobre os parâmetros neuroinflamatórios, do estado redox e da memória na prole adolescente de ratas Wistar tratadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação.

2.1 Objetivos específicos

1. Analisar o perfil inflamatório (citocinas pró e anti-inflamatórias) no córtex pré-frontal e hipocampo da prole;
2. Analisar o estado redox (marcadores do estresse oxidativo e da atividade antioxidante) no córtex pré-frontal e hipocampo da prole;
3. Analisar a concentração do fator neurotrófico derivado do encéfalo (*brain derived neurotrophic factor - BDNF*) no hipocampo;
4. Avaliar o comportamento da prole em relação ao teste de reconhecimento de objetos (variações de curto e longo prazo).

3 METODOLOGIA

3.1 Animais e desenho experimental

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Nutrição Experimental (LabNutrex) e de Inflamação e Metabolismo (LIM) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha (UFVJM). O manuseio e a eutanásia ocorreram de acordo com os princípios éticos para uso de animais de laboratório (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA, 2016). O projeto obteve aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFVJM) sob o protocolo 024/17 (ANEXO I).

Foram utilizados 40 ratas fêmeas (adultas), 20 ratos machos (adultos) e 240 ratos (filhotes) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), provenientes do LabNutrex/UFVJM. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm) acondicionadas sobre estantes ventiladas (Alesco[®]), sob condições padrões (umidade natural; temperatura de 23°C ± 2; e ciclo claro/escuro de 12 horas, com início do ciclo claro às 6:00 horas da manhã).

Inicialmente, as 40 ratas Wistar nulíparas com 80 dias de idade foram colocadas no início do ciclo escuro (19:00 horas) em gaiolas com a presença de ratos machos Wistar virgens (80-90 dias de idade) para acasalamento. O esquema de acasalamento foi poligâmico (1 macho para 2 fêmeas). Todos os dias, no início do ciclo claro (7:00 horas) era feito o esfregaço vaginal para avaliação da presença de espermatozoides ou do *plug* na vagina das ratas. A presença de um dos dois (*plug* ou esperma) era considerado como a confirmação de cópula e indício do início da gravidez (FIGURA 1).

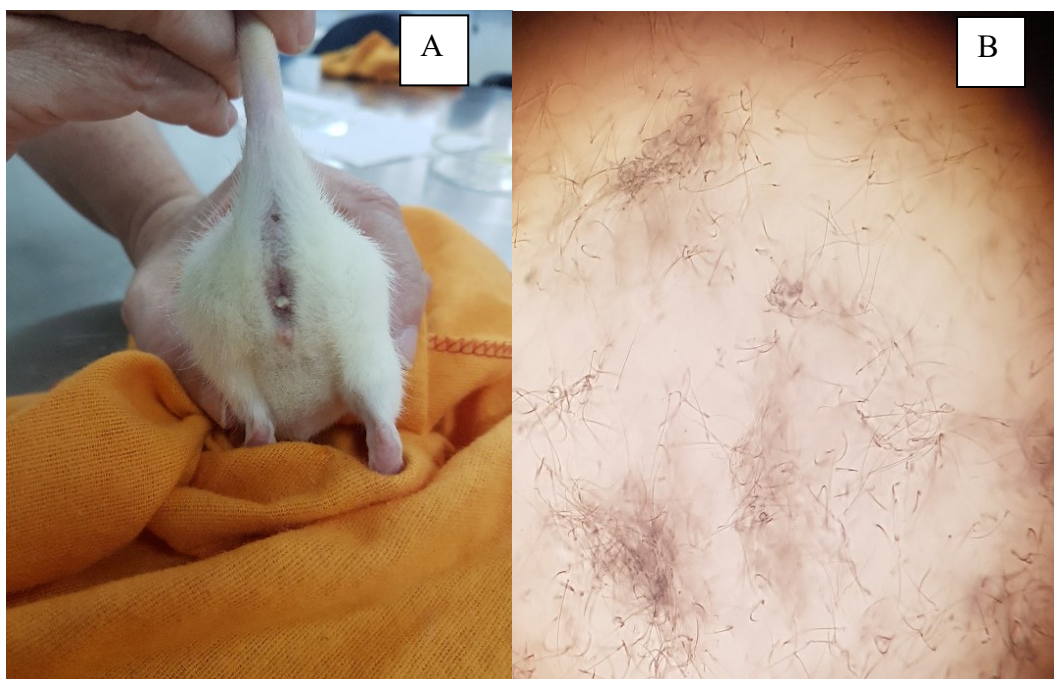


FIGURA 1 – Presença de *plug* vaginal na fêmea (A) e lâmina de esfregaço contendo inúmeros espermatozoides na objetiva de 20x (B). A presença do *plug* ou dos espermatozoides era considerado como confirmação da cópula e indício do início da gravidez. Fonte das imagens: banco de dados do próprio autor.

Com a confirmação da cópula, as fêmeas eram destinadas ao alojamento isolado nas gaiolas, sendo definido esse como o dia “zero” da gravidez (G0). A partir do G0 as mães receberam dietas distintas, compondo os grupos:

- Controle – os animais receberam dieta padrão (ração Nuvilab[®] CR-1) e água *ad libitum* (n = 20);
- Hiperlipídico – os animais receberam dieta padrão (ração Nuvilab[®] CR-1) acrescida de banha de porco (Sadia[®]) e água *ad libitum* (n = 20).

Para elaboração da dieta hiperlipídica, primeiramente era feita a moagem da ração (Nuvilab[®]), e, após, era realizada a incorporação da banha de porco (Sadia[®]) derretida. Essa mistura passava por um misturador automatizado, com o intuito de obter uma dieta hiperlipídica homogênea e que possuísse 45% de calorias provenientes de gordura, conforme indicado em estudos anteriores (HASEBE et al., 2019; LIANG et al., 2019). A composição química e a densidade energética das dietas estão demonstradas na Tabela 1.

TABELA 1 – Composição química e densidade energética da dieta padrão (ração Nuvilab[®]) e da dieta hiperlipídica.

	Dieta padrão	Dieta hiperlipídica
Carboidratos (g.100 ⁻¹)	54,67	45,49
Proteínas (g.100 ⁻¹)	20,73	17,25
Gorduras totais (g.100 ⁻¹)	7,25	22,76
Carboidratos (%)	57,00	39,92
Proteínas (%)	24,18	15,13
Gorduras totais (%)	18,81	44,95
Carboidratos (kcal.100 ⁻¹)	218,68	181,97
Proteínas (kcal.100 ⁻¹)	82,92	68,99
Gorduras totais (kcal.100 ⁻¹)	65,25	204,89
Total (kcal.100 ⁻¹)	366,85	455,85

As dietas foram ofertadas durante 42 dias para as fêmeas, compreendendo assim 21 dias de gestação (G0 – G21) e 21 dias de lactação (L0 – L21). A partir do 8º dia de gestação (G8), as ratas-mães foram subdivididas aleatoriamente para receberem por via intraperitoneal os tratamentos: veículo (salina – NaCl 0,8%) ou LPS (0,1mg.kg⁻¹; LPS de *Escherichia coli* 0111:B4; Sigma Aldrich[®]), ambos em volume de 1,0ml.kg⁻¹. Estes tratamentos ainda se repetiram no G10 e G12. Todo o procedimento descrito nessa seção, bem como as dietas e aplicação do LPS foram adaptados do estudo de Huang et al. (2015).

Com o intuito de minimizar os fatores genéticos, os filhotes nascidos no mesmo dia foram misturados e distribuídos aleatoriamente entre as ninhadas, que foram formadas com 8 filhotes cada (6 machos e 2 fêmeas). No 21º dia de lactação (L21) ocorreu o desmame da prole. No presente trabalho, somente foram utilizados os animais machos, que foram redistribuídos individualmente em novas gaiolas. Esses animais receberam até o 50º dia de vida (PN50) dieta padrão e água *ad libitum*. Dessa forma, a prole foi classificada nos grupos:

- **Controle** – filhotes machos das mães que receberam dieta padrão (Nuvilab[®]) e aplicação intraperitoneal de salina (n = 60);
- **Lipopolissacarídeo (LPS)** – filhotes machos das mães que receberam dieta padrão (Nuvilab[®]) e aplicação intraperitoneal de LPS (n = 60);
- **Hiperlipídica (HP)** – filhotes machos das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina (n = 60);

- **Lipopolissacarídeo + Hiperlipídica (LPS+HP)** – filhotes machos das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS (n = 60).

Entre dois a três animais de cada ninhada foram aleatoriamente escolhidos para realização dos testes descritos nessa tese. Para este capítulo em particular, uma parte do quantitativo total de cada grupo foi utilizada, de forma a se obter um número de animais suficiente para realização do teste de reconhecimento de objetos com duas variações (curto e longo prazo), além das análises de inflamação e estado redox no encéfalo. Esta subdivisão dos animais pode ser melhor compreendida na Figura 2.

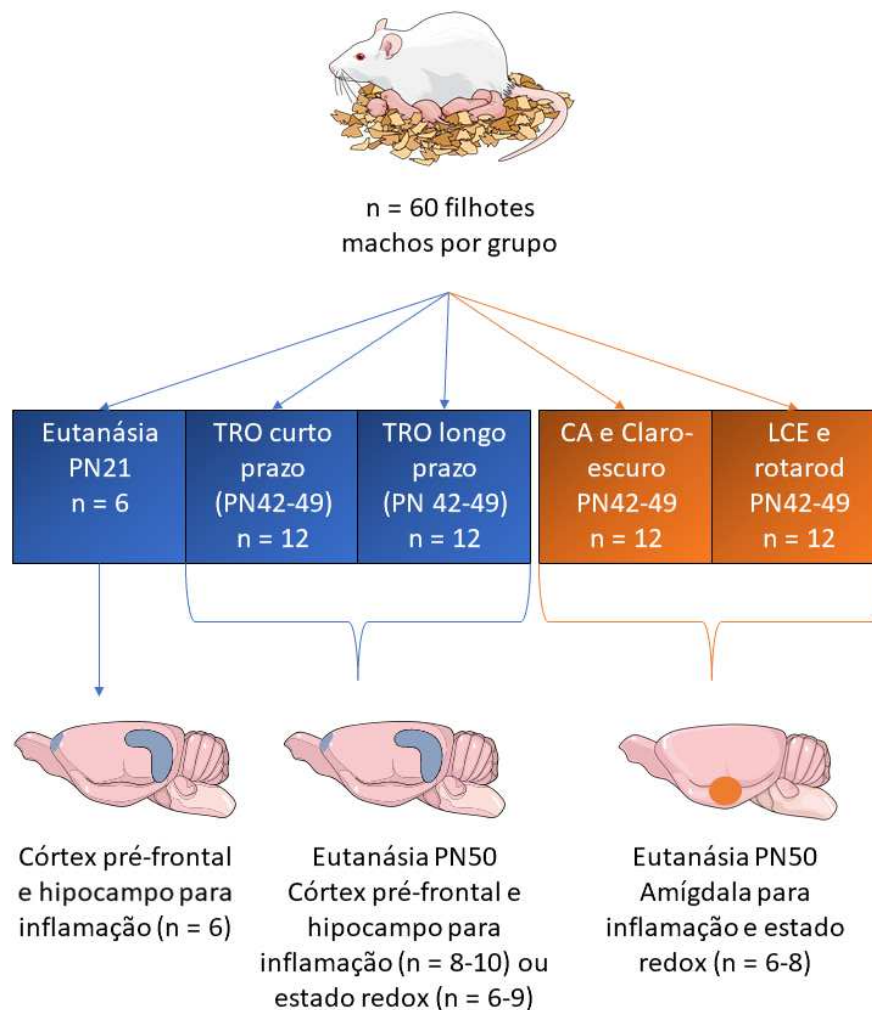


FIGURA 2 – Esquema de distribuição dos animais após a lactação. Cada grupo de animais (Controle, LPS, HP e LPS+HP) possuía 60 machos (prole). Esses foram distribuídos aleatoriamente para obtenção do quantitativo de animais necessários para realização dos testes comportamentais (teste de reconhecimento de objetos – TRO; campo aberto – CA; transição claro-escuro; labirinto em cruz elevado – LCE e rotarod). O valor de “n” representado na figura estabelece o número de animais por grupo que realizaram os testes. Os capítulos dessa tese também foram divididos de acordo com os testes comportamentais, sendo que: as duas variações do TRO ficaram no primeiro capítulo (quadros em azul); enquanto os outros testes ficaram no segundo capítulo (quadros em laranja).

Portanto, entre o 42º e o 49º dia pós-natal (PN42 a PN49), a prole adolescente realizou os testes comportamentais (teste de reconhecimento de objetos de curto e longo prazo). Os animais foram eutanasiados em dois momentos distintos, no 21º dia pós-natal (n = 6; PN21) e no 50º dia pós-natal (n = 24; PN50).

3.2 Testes comportamentais

Todos os testes comportamentais foram realizados por um único experimentador na sala de comportamento do LabNutrex. A sala conta com a presença de um exaustor (auxilia na troca do ar e também serve como um abafador de ruídos) e lâmpada fluorescente no teto (iluminação de 130 lux). Todos os procedimentos descritos foram realizados pela manhã (07:00 às 12:00 horas), em duplo cego, com a realização de filmagens por uma câmera (Sony® Handycam) acoplada ao teto da sala, para posterior análise por dois pesquisadores experientes.

Os filhotes machos realizaram os testes comportamentais entre o PN42 e o PN49, sendo escolhidos de forma aleatória para cada teste, mas, levando em consideração que apenas 2-3 animais de cada ninhada poderiam executar um mesmo teste. Uma semana antes todos os animais passaram por um procedimento de *handling*, que foi executado durante os sete dias, uma única vez por dia, com duração de um minuto. Ademais, cada animal foi levado à sala de comportamento com uma antecedência de 20 minutos antes do início do teste para aclimatização.

3.2.1 Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO)

Para realização do TRO, primeiramente, os animais foram expostos à uma arena de campo aberto (70 x 70 x 50 cm) pelo período de 10 minutos. Após esse procedimento de

habituação, foi realizado no mesmo aparato o TRO. Esta técnica é utilizada para avaliação de alterações na memória de objetos de curta (minutos a horas) e longa duração (dias). O teste se baseia na capacidade do roedor de reconhecer um objeto que previamente teve contato. Para o reconhecimento, é necessário (1) o julgamento da familiaridade do objeto pelo animal; (2) a reaquisição da memória daquele item. Além disso, para que essas etapas sejam concluídas, são necessárias diversas estruturas encefálicas, dentre elas os córtex frontal, perirrinal, entorrinal e parahipocampal, além do hipocampo (BALDERAS; RODRIGUEZ-ORTIZ; BERMUDEZ-RATTONI, 2015; COHEN; STACKMAN JR., 2015).

No teste de memória de curta duração, uma hora após a primeira seção no campo aberto, os mesmos animais foram reexpostos à arena, contendo dessa vez colados em seu assoalho uma bola (plástico; cor verde; formato esférico) e uma peça de Lego[®] (plástico; cor vermelho; formato retangular). Esses objetos foram chamados de A e B, respectivamente, e o tempo de permanência na arena foi de 5 minutos. Essa etapa é caracterizada como “familiarização”, onde os animais reconhecem os novos objetos na arena. Terminando o tempo de exposição os animais voltaram para suas respectivas caixas. Após mais uma hora, novamente os animais foram colocados na arena, dessa vez contendo em seu assoalho a bola (objeto A) e um novo objeto, uma pirâmide (crystal; cor branca; formato piramidal), que foi designado como objeto C. Essa etapa é conhecida como “etapa de teste” e é verificada principalmente a interação do animal com o novo objeto. Para o teste de memória de longa duração os mesmos procedimentos foram seguidos, com a exceção do tempo de retenção entre cada etapa, que nesse caso foi de 24 horas.

Para ambas as memórias (curta e longa duração) foram avaliadas a interação ativa do animal com cada um dos objetos, considerando-se os atos de: cheirar, lambe, morder e tocar com o focinho ou com a pata como exploração do objeto em questão. Animais que exploraram menos de 15 segundos os dois objetos (tanto na fase de familiarização como na fase teste) foram retirados do teste. A Figura 3 é uma ilustração do TRO.

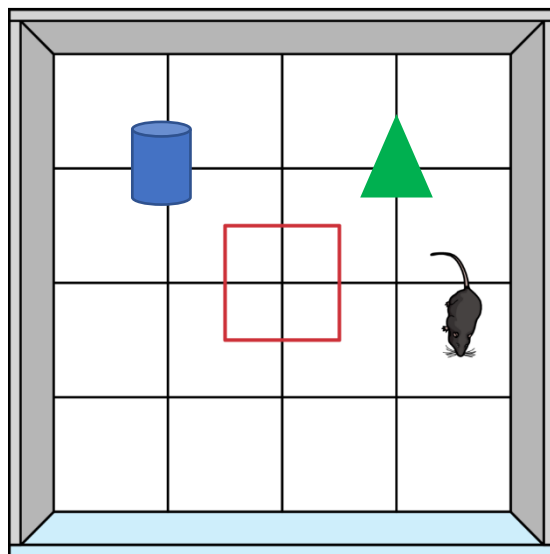


FIGURA 3 – Representação do Teste de Reconhecimento de Objetos com exemplos de dois objetos na arena. Cada animal foi colocado no centro da arena (demarcação vermelha) e sua interação com cada objeto avaliada durante 5 minutos em cada uma das fases (familiarização ou teste).

Por fim, para ambas as memórias (curto e longo prazo), foi calculado o índice de reconhecimento (IR) (HORIGUCHI; HUANG; MELTZER, 2011; TEIXEIRA et al., 2020) através da equação:

$$IR = \frac{\textit{interação com novo objeto} - \textit{interação com objeto familiar}}{\textit{total de interação com os dois objetos}}$$

3.3 Eutanásia e análises bioquímicas

Os animais foram decapitados durante os dias PN21 e PN50 no período da tarde (14:00 às 18:00 horas). O encéfalo foi rapidamente retirado (aproximadamente 1 minuto) e colocado em uma solução gelada (4°C) de tampão fosfato salina (*phosphate buffered saline* - PBS: NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 8,1mM; KH₂PO₄ 1,5mM). Após esse procedimento, o córtex pré-frontal e o hipocampo foram dissecados, lavados em PBS, armazenados em eppendorf, e levados ao ultra freezer imediatamente (-80°C). Aproximadamente metade das amostras encefálicas (córtex pré-frontal e hipocampo) retiradas foram destinadas à avaliação do perfil inflamatório, enquanto a outra metade foi utilizada para determinar o estado redox (exceto para os animais PN21, onde todo o material foi utilizado

para o perfil inflamatório). Ademais, no hipocampo dos animais PN50 foi realizada a análise de BDNF.

3.3.1 Estado redox

As amostras foram homogenizadas em PBS gelado (50mM; pH 7,0; 4°C) e centrifugadas sob refrigeração (4°C) a 750g por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado para analisar as enzimas antioxidantes (superóxido dismutase – SOD; glutathiona-s-transferase – GST); a capacidade antioxidante total não-enzimática (*Ferric-reducing ability of plasma* - FRAP); e o índice de peroxidação lipídica (*Thiobarbituric acid reactive substances* - TBARS). O precipitado formado foi usado para a determinação de proteína carbonilada (FREITAS et al., 2018; MELO et al., 2019). Todas as avaliações do estado redox foram corrigidas de acordo com o total de proteína nas amostras pelo método de Bradford (1976).

O ensaio FRAP se baseia na capacidade antioxidante do tecido de reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} na amostra (BENZIE; STRAIN, 1996). São exemplos de antioxidantes não-enzimáticos a glutathiona reduzida, o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E) e o ácido úrico. O complexo Fe^{2+} -TPTZ (ferritripidiltriazida) tem uma cor azul intensa, o que possibilita ser monitorado por espectrofotometria. Para a realização do ensaio, é acrescentada na amostra o reagente FRAP (acetato de sódio 0,3mol/L pH 3,6; 2,4,6-tripiridil-s-triazina 10mmol/L; e $FeCl_3$ 20mmol/L) e a leitura feita a 595nm em espectrofotômetro. Os resultados obtidos pelas amostras são comparados frente a uma curva padrão de $FeSO_4$, sendo reportados em nM $FeSO_4$ /mg proteína (FREITAS et al., 2018).

As enzimas antioxidantes avaliadas (SOD e GST) fazem parte de uma linha de defesa endógena para suprimir ou prevenir modificação oxidativa não controlada de proteínas, lipídios e DNA, protegendo as células contra danos que podem ser irreversíveis (ULRICH; JAKOB, 2019). Para a avaliação da atividade da SOD, foi adicionado na amostra uma solução contendo 50mM KH_2PO_4 e 1mM de ácido dietileno-triamino-pentacético. Posteriormente, 0,2mM de pirogalol foi adicionado, sendo sua oxidação medida rapidamente em leitor de microplacas a 420nm por 250 segundos (com intervalos de 10 segundos entre cada leitura). Uma unidade de enzima é considerada como a quantidade que causou a inibição da auto-oxidação do pirogalol em 50% por miligrama de proteína (U/mg de proteína) (Marklund and Marklund, 1974; Melo et al., 2019).

A atividade da GST foi estimada espectrofotometricamente, tal como descrito anteriormente por Habig, Pabst e Jakoby (1974). O ensaio ocorreu de acordo com a formação de glutatona conjugada com 2,4-dinitroclorobenzeno (coeficiente de extinção molar: $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mmol} \times \text{L}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Uma unidade da atividade de GST foi definida como a quantidade da enzima que catalisou a formação de um μmol de produto $\times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$ (BASTOS et al., 2020).

O método de TBARS tem como objetivo avaliar se existe um dano causado na membrana celular do tecido pela presença de radicais livres, através da reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído (1,1,3,3-tetraetoxipropano; MDA), resultando em uma coloração rosa em condições ácidas (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Para a determinação de TBARS, uma solução contendo ácido acético (2,5M; pH 3,4), ácido tiobarbiturico (0,8%) e doadecil sulfato de sódio (8;1%) foi adicionada na amostra por 90 minutos à 95°C (aquecimento em banho maria). Posteriormente foi feita a leitura a 532nm utilizando o MDA como padrão, sendo os resultados expressos em nmol MDA/mg proteína (FREITAS et al., 2018; MELO et al., 2019). A concentração de proteína carbonilada foi avaliada no precipitado do tecido usando o método com adição de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) à amostra, com monitoramento espectrofotométrico a 370 nm (BASTOS et al., 2020).

3.3.2 Perfil inflamatório: análise de citocinas

Foram realizadas as análises de citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1 β [IL-1 β]; interleucina-6 [IL-6]; e fator de necrose tumoral- α [TNF- α]) e anti-inflamatória (interleucina-10 [IL-10]) pela técnica de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) (R&D Systems®, Minneapolis, EUA). Primeiramente, as amostras foram homogenizadas juntamente com uma solução de extração (NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05%; Albumina de soro bovino 0,5%; Fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 μ l de aprotinina), centrifugadas sob refrigeração (4°C) a 2714 g por 10 minutos, e o sobrenadante recolhido, aliquoteado e estocado a -80°C.

Foram utilizadas placas de 96 poços cobertas com anticorpo purificado dissolvido em PBS (pH 7,4) e incubadas *overnight* (4°C). Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS acrescido de Tween 20 e bloqueadas com uma solução de soro de albumina bovino (*bovine serum albumine*; BSA) em PBS (a 1% p/v) por 2 horas, sob agitação. Para incorporação das amostras, essas foram previamente diluídas (1:3) na mesma solução de BSA/PBS e

adicionadas em duplicata nos poços, seguido de nova incubação *overnight* (4°C). No dia seguinte, foi adicionado anticorpo específico biotilado, e, após 1 hora, foi utilizada uma solução de estreptavidina acoplada a enzima peroxidase (HRP, 1:4000), seguido de incubação por 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente. A reação foi desenvolvida pela adição de 100µl/poço do cromógeno ortofenilenodiamina (OPD 4mg/ml), contendo H₂O₂ em tampão citrato pH 5,0. A interrupção da reação foi realizada adicionando-se 50µL de H₂SO₄ (1M) à placa, sendo a absorbância obtida verificada em leitor de microplacas a 492nm. A concentração referente a cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão correspondente e expressa em pg/mL (FREITAS et al., 2018; LEITE et al., 2016).

3.3.3 Fator neurotrófico derivado do encéfalo (*Brain derived neurotrophic factor - BDNF*)

O BDNF foi quantificado somente no hipocampo dos animais PN50 através da técnica de ELISA, de acordo com o fabricante (R&D Systems®, Minneapolis, EUA). As amostras homogenizadas em PBS foram adicionadas à placa de 96 poços contendo anticorpo específico para BDNF, na presença também de um diluente (RD1-123), e incubadas durante 2 horas sob agitação. Após, os poços foram aspirados e lavados com uma solução de lavagem por 4 vezes. O conjugado de BDNF foi adicionado a cada placa, e nova incubação foi realizada por um período de 1 hora sob agitação, seguido de novo procedimento de lavagem. Por fim, foram acrescentados a solução contendo o substrato (seguida de incubação a 30 minutos protegido da luz) e a solução *stop*. A leitura foi realizada em leitor de microplacas a 450nm, e os resultados corrigidos pela concentração de proteína na amostra (BRADFORD, 1976).

3.4 Análise estatística

Para realizar a análise estatística foi utilizado o *software* Statistica®, versão 10.0. Os gráficos foram elaborados com o auxílio do GraphPad Prism®, versão 7.0. O *software* G*Power (versão 3.1.9.2) foi usado para a análise de potência (α err prob = 0,05). A normalidade da amostra foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição paramétrica foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de duas vias, com dieta (padrão ou hiperlipídica) e tratamento (salina ou LPS) como fatores entre os grupos. O teste de Newman-Keuls foi utilizado como *post hoc*, quando apropriado ($p < 0,05$). Os dados com distribuições não-paramétricas foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e o teste de

Dunn, quando necessário. Os resultados foram representados como gráficos do tipo *box-and-whiskers*, sendo que, o *box* representava os valores do 25° ao 75° percentil, as linhas do meio refletiam os valores das medianas, e cada ponto no gráfico era equivalente a um dos valores individuais observados.

4 RESULTADOS

4.1 TRO: Memória de curto-prazo

Durante a fase de familiarização do TRO de curta duração, nenhuma diferença significativa foi demonstrada em relação ao tempo de exploração entre os objetos A e B pelos grupos (FIGURA 4A). No entanto, na fase teste, uma diferença significativa foi observada na interação entre os fatores dieta e tratamento ($F_{(1, 38)} = 4,31, p < 0,05; \text{power: } 1,00$). Os grupos LPS+HP ($p < 0,05$), LPS ($p < 0,001$) e Controle ($p < 0,001$) obtiveram um maior tempo de interação com o objeto C comparado ao objeto A, fato que não foi demonstrado para o grupo HP (FIGURA 4B). Quando analisado o fator dieta, também foi reportada diferença significativa entre os grupos ($F_{(1, 38)} = 19,25, p < 0,001; \text{power: } 1,00$). Os grupos de dieta hiperlipídica interagiram menos com o objeto C em relação aos grupos de dieta padrão. O IR calculado também demonstrou diferença significativa na interação dos fatores dieta e tratamento ($F_{(1, 38)} = 0,78, p < 0,05; \text{power: } 1,00$). O grupo HP reportou um prejuízo na memória de curto prazo, através de um menor IR calculado em relação aos grupos LPS ($p < 0,01$) e Controle ($p < 0,01$) (FIGURA 4C). Além disso, para o IR, foi verificada diferença significativa considerando apenas o fator dieta ($F_{(1, 38)} = 12,35, p < 0,01; \text{power: } 1,00$). Os grupos de dieta hiperlipídica demonstraram menor IR que os grupos de dieta padrão.

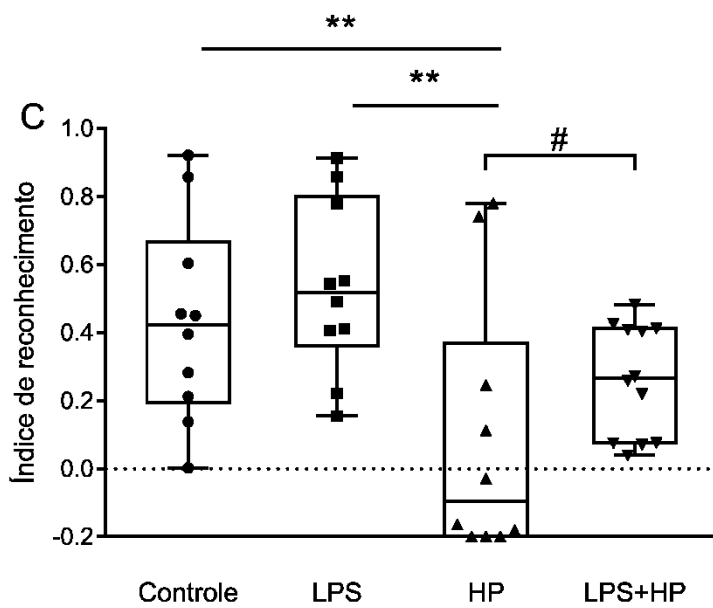
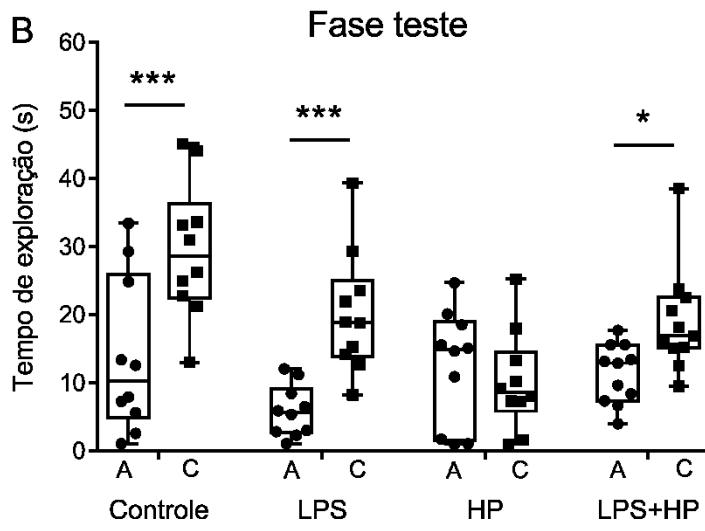
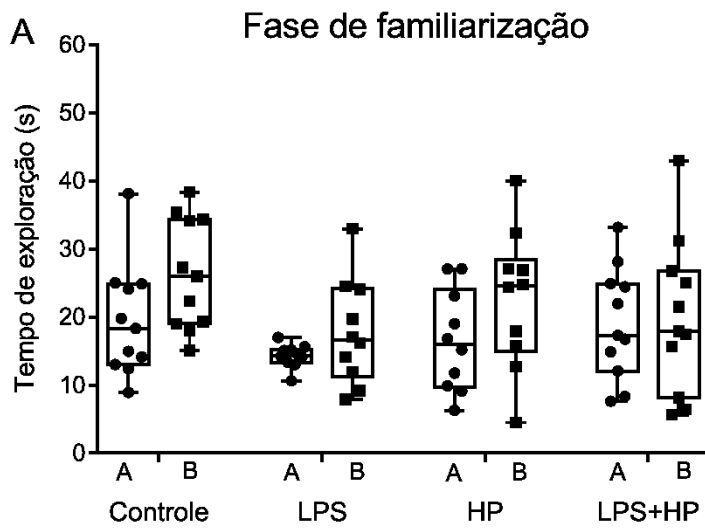


FIGURA 4 – Tempo de exploração nas fases de familiarização (A) e teste (B); além do índice de reconhecimento (C) do teste de reconhecimento de objetos para memória de curto prazo. Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através de gráfico *box and whiskers*. $n = 10-12$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (interação dieta \times tratamento); # $p < 0.05$ (fator dieta); usando a ANOVA e o teste de Newman Keuls.

4.2 TRO: Memória de longo-prazo

A avaliação do TRO para a variação de memória de longo prazo não demonstrou diferença significativa durante a fase de familiarização (FIGURA 5A). No entanto, na fase teste, todos os grupos demonstraram um maior tempo de exploração ($F_{(1, 32)} = 2,23$, $p < 0,01$; power: 1,00) do objeto C em comparação com o objeto A (FIGURA 5B). Além disso, não houve diferença significativa na avaliação do IR (FIGURA 5C).

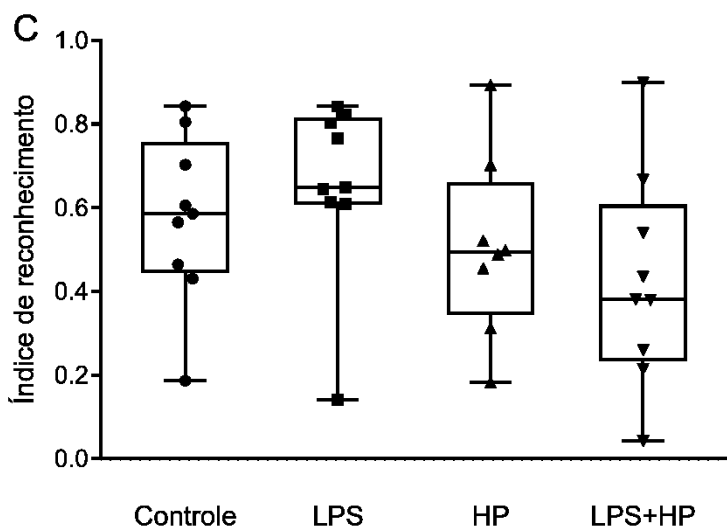
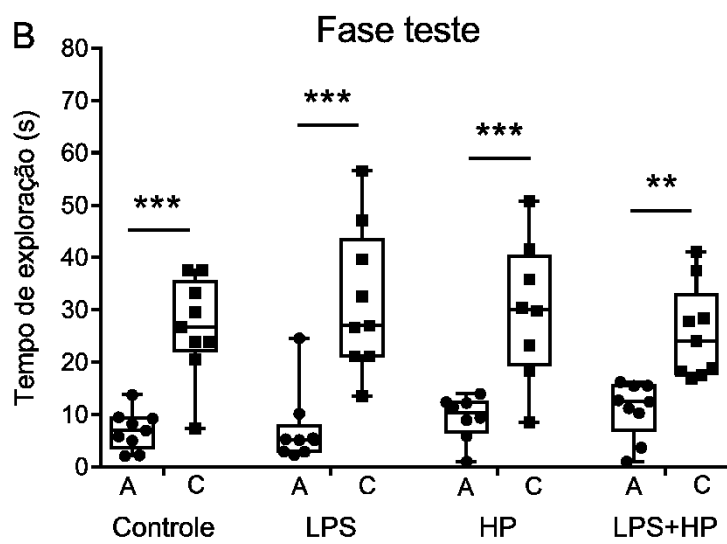
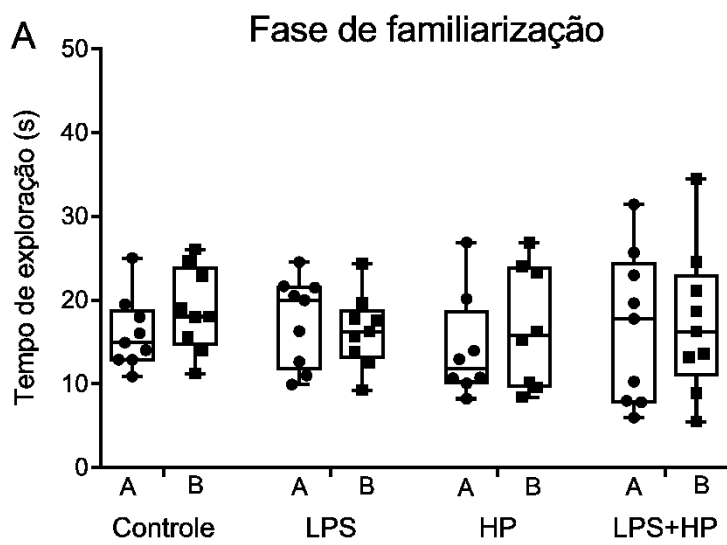


FIGURA 5 – Tempo de exploração nas fases de familiarização (A) e teste (B); além do índice de reconhecimento (C) do teste de reconhecimento de objetos para memória de longo prazo. Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através de gráfico *box and whiskers*. n = 9; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ usando a ANOVA e o teste de Newman Keuls.

4.3 Estado redox

Em relação à avaliação dos níveis de FRAP no córtex pré-frontal, foi demonstrada uma diferença significativa na interação dos fatores dieta e tratamento ($F_{(1, 26)} = 0,73, p < 0,05$; power: 0,99). A capacidade antioxidante do grupo LPS+HP foi maior que a dos grupos Controle ($p < 0,05$) e LPS ($p < 0,05$) (FIGURA 6A). Além disso, uma diferença foi observada para o fator dieta ($F_{(1, 26)} = 9,23, p < 0,01$; power: 1,00). Os grupos de dieta hiperlipídica apresentaram uma maior capacidade FRAP em relação aos de dieta padrão no córtex pré-frontal. Nenhuma diferença foi encontrada nas análises de GST ($p = 0,74$), SOD ($p = 0,43$), TBARS ($p = 0,27$) e proteína carbonilada ($p = 0,72$) para o córtex pré-frontal (FIGURA 6B-6E).

Córtex pré-frontal - PN50

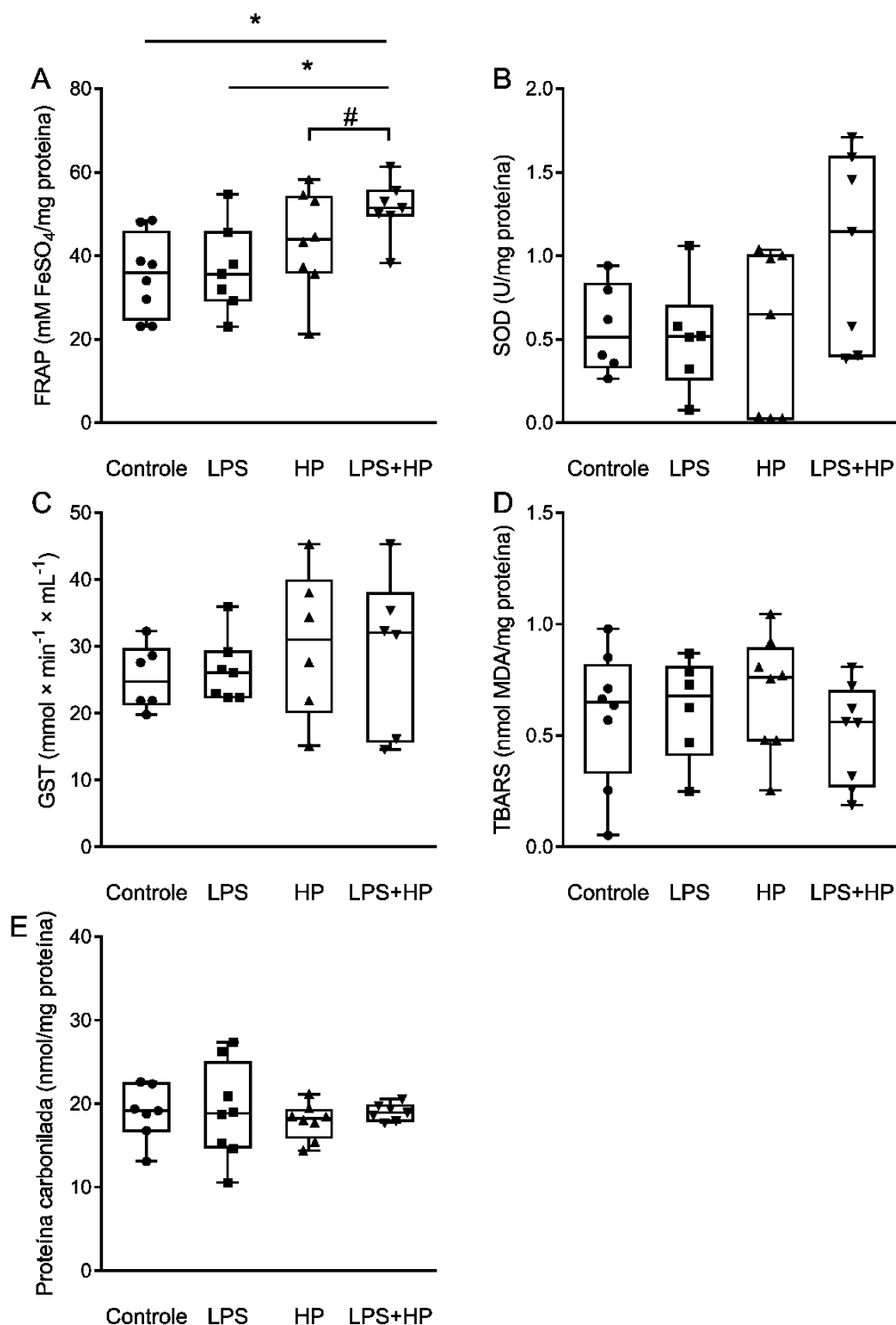


FIGURA 6 – Capacidade antioxidante FRAP (A), atividade da SOD (B) e da GST (C), além dos níveis de TBARS (D) e de proteína carbonilada (E) no córtex pré-frontal dos animais no 50º dia pós-natal (PN50). Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta

hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através de gráfico *box and whiskers*. n = 6-9; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (interação dieta x tratamento); # $p < 0.05$ (fator dieta) usando a ANOVA e o teste de Newman Keuls.

Resultados semelhantes foram encontrados na análise do FRAP no hipocampo. Uma diferença significativa foi observada na interação dos fatores dieta e tratamento ($F_{(1, 31)} = 12,71, p < 0,05$; power: 1,00), onde o grupo LPS+HP apresentou níveis de FRAP maiores ($p < 0,05$) que o grupo Controle (FIGURA 7A). Além disso, um efeito de dieta também foi encontrado ($F_{(1, 31)} = 3,92, p < 0,05$; power: 1,00). Uma alta capacidade antioxidante não-enzimática foi demonstrada nos grupos de dieta hiperlipídica em relação aos de dieta padrão. Adicionalmente, um efeito de tratamento também foi observado ($F_{(1, 32)} = 5,75, p < 0,05$; power: 1,00). Os grupos em que as mães receberam aplicação de LPS reportaram maiores níveis de FRAP em relação aos grupos que receberam salina.

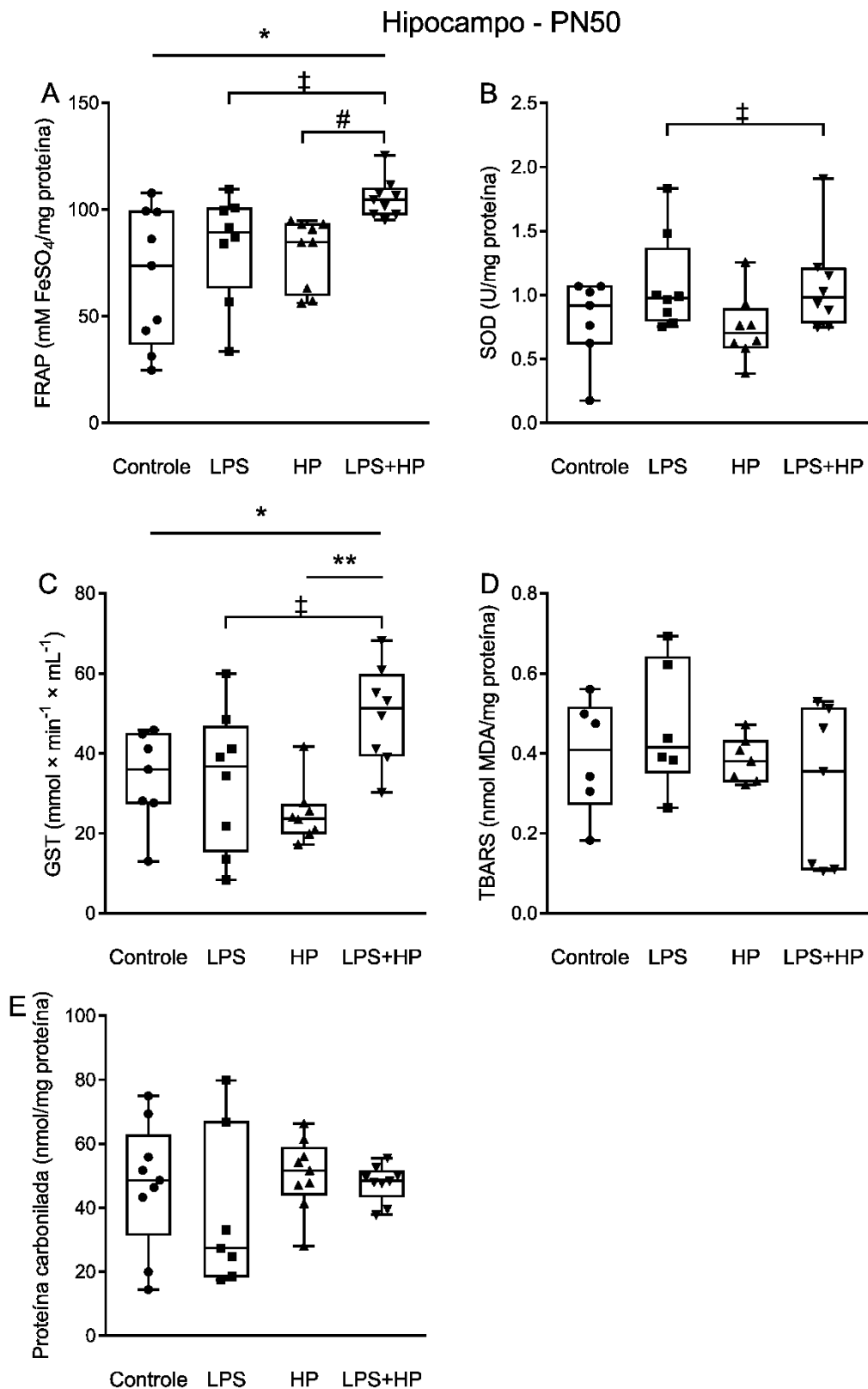


FIGURA 7 – Capacidade antioxidante FRAP (A), atividade da SOD (B), GST, níveis de TBARS (D) e de proteína carbonilada (E) no hipocampo dos animais no 50º dia pós-natal (PN50). Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação

intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através de gráfico *box and whiskers*. n = 6-9; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (interação dieta x tratamento); # $p < 0.05$ (fator dieta); ‡ $p < 0.05$ (fator tratamento) usando a ANOVA e o teste de Newman Keuls.

Na análise da atividade da SOD hipocampal uma diferença foi encontrada para o fator tratamento ($F_{(1, 27)} = 6,35$, $p < 0,05$; power: 1,00). Os grupos de tolerância ao LPS apresentaram maior atividade de SOD em comparação com os que receberam salina (FIGURA 7B).

A atividade da GST no hipocampo demonstrou diferença significativa na interação dos fatores dieta e tratamento ($F_{(1, 27)} = 7,36$, $p < 0,05$; power: 1,00). O grupo LPS+HP apresentou maior atividade dessa enzima em relação aos grupos HP ($p < 0,01$) e Controle ($p < 0,05$) (FIGURA 7C). Ademais, um efeito de tratamento foi observado para a avaliação da atividade da GST ($F_{(1, 27)} = 6,83$, $p < 0,05$; power: 1,00). Os grupos que receberam LPS demonstraram maior atividade dessa enzima em comparação com os grupos que receberam salina. Nenhuma diferença foi reportada para os níveis de TBARS ($p = 0,24$) e proteína carbonilada ($p = 0,24$) no hipocampo (FIGURA 7D-7E).

4.4 Neuroinflamação e concentração de BDNF

Na avaliação da prole PN21, nenhuma diferença significativa foi encontrada para os níveis de IL-6 ($p = 0,40$), TNF- α ($p = 0,85$), e IL-10 ($p = 0,70$) no córtex pré-frontal (FIGURA 8A-8C).

Córtex Pré-frontal - PN21

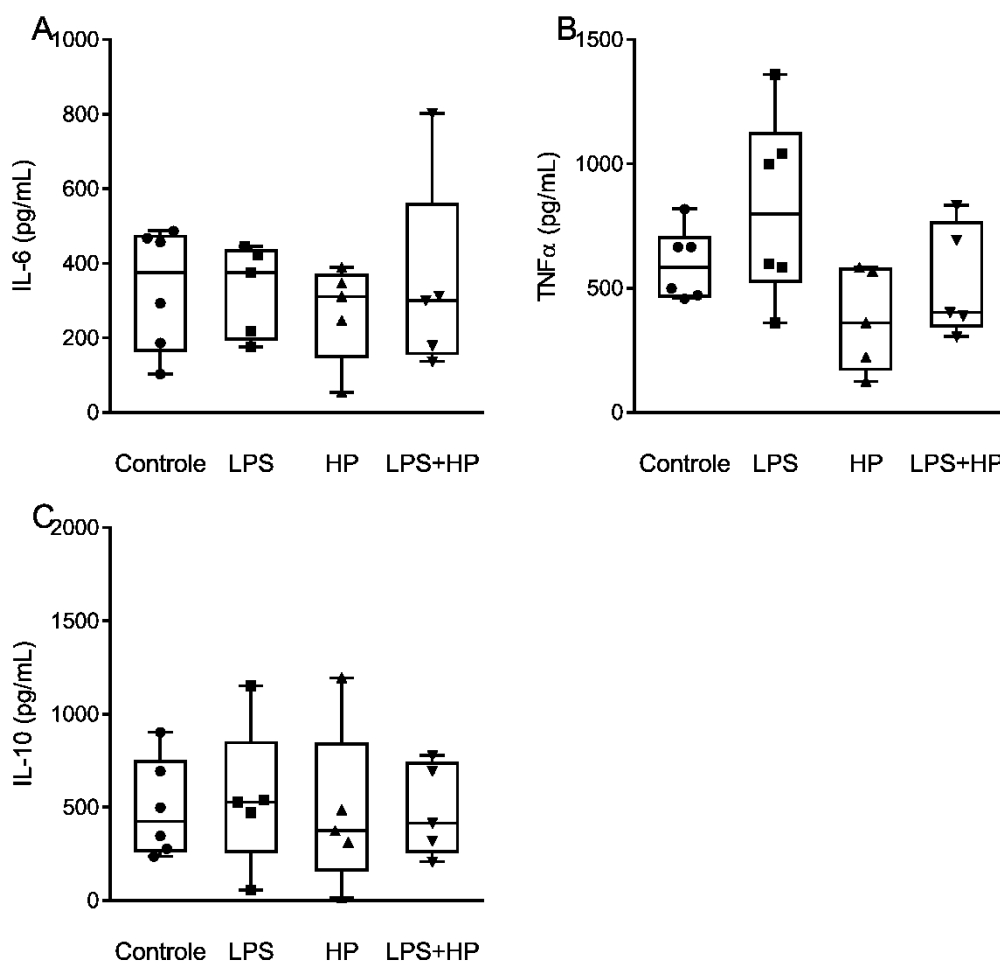


FIGURA 8 – Concentração de IL-6 (A), TNF- α (B), e IL-10 (C) no córtex pré-frontal dos animais no 21º dia pós-natal (PN21). Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através de gráfico *box and whiskers*. $n = 5-6$; para análise dos dados foi utilizada a ANOVA e o teste de Newman Keuls.

No hipocampo dos animais PN21, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de TNF- α ($p = 0,54$) (FIGURA 9B). No entanto, diferenças significativas na interação dieta e tratamento para a concentração hipocampal de IL-6 ($F_{(1, 16)} = 6,31$, $p < 0,05$; power: 1,00) e IL-10 ($F_{(1, 16)} = 2,33$, $p < 0,05$; power: 1,00) foram observadas. O grupo HP demonstrou maiores níveis de IL-6 em comparação com o grupo Controle ($p < 0,05$), LPS ($p < 0,05$) e LPS+HP ($p < 0,01$) (FIGURA 9B); enquanto que os níveis de IL-10 foram menores no grupo HP em relação ao grupo LPS+HP ($p < 0,05$) (FIGURA 9C). Ademais, para a

avaliação de IL-6 hipocampal, um efeito de tratamento foi observado ($F_{(1, 16)} = 16,97$, $p < 0,01$; power: 1,00). A prole das mães que receberam LPS demonstrou menores níveis de IL-6 do que a prole em que as mães receberam salina.

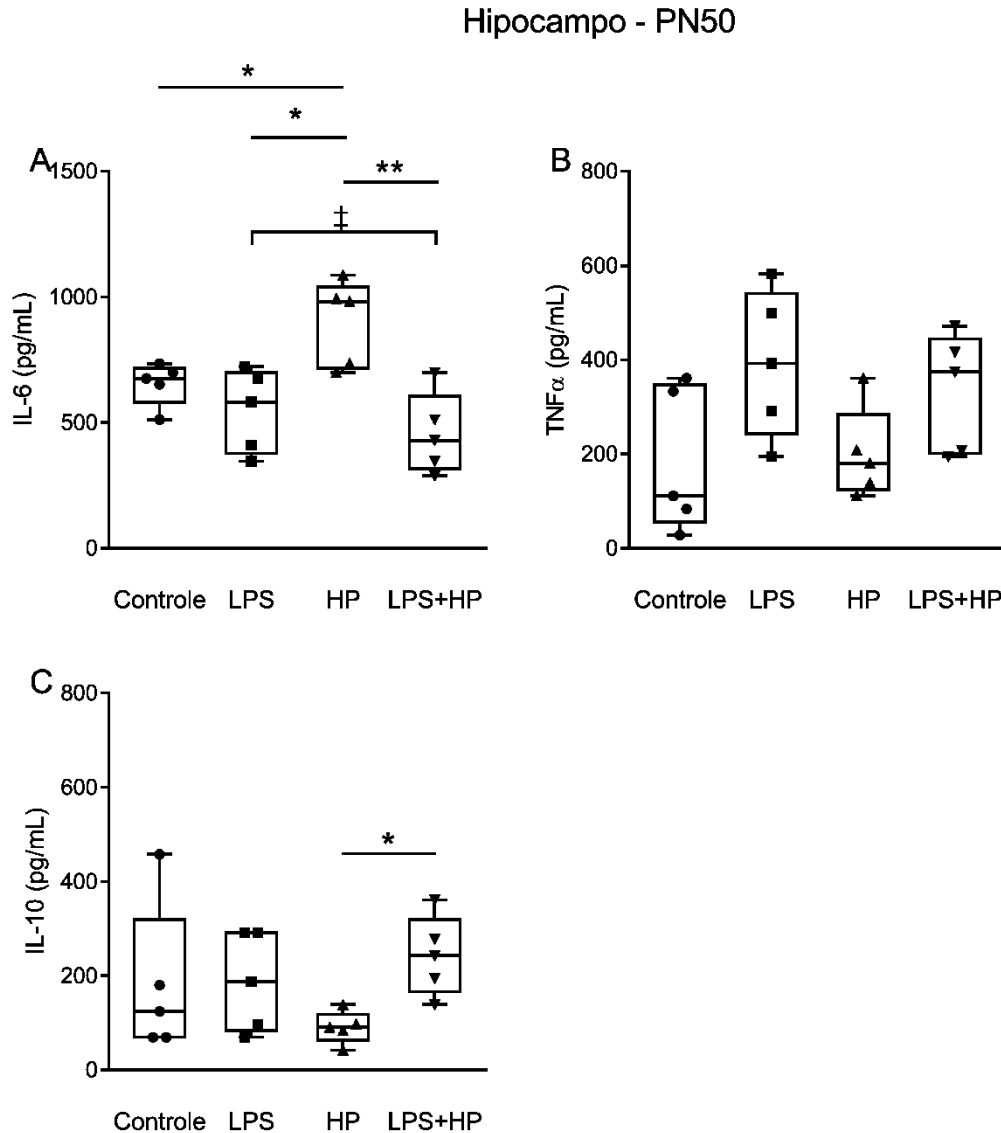


FIGURA 9 – Concentração de IL-6 (A), TNF- α (B), e IL-10 (C) no hipocampo dos animais no 21º dia pós-natal (PN21). Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através de gráfico *box and whiskers*. $n = 5-6$; $p < 0,05$, $**p < 0,01$ (interação dieta \times tratamento); $\ddagger p < 0,05$ (fator tratamento) usando ANOVA e o teste de Newman Keuls.

Na avaliação dos animais PN50, nenhuma diferença significativa foi reportada nos níveis de IL-1 β ($p = 0,63$), IL-6 ($p = 0,77$), TNF- α ($p = 0,19$) e IL-10 ($p = 0,64$) no córtex pré-frontal (FIGURA 10A-10D).

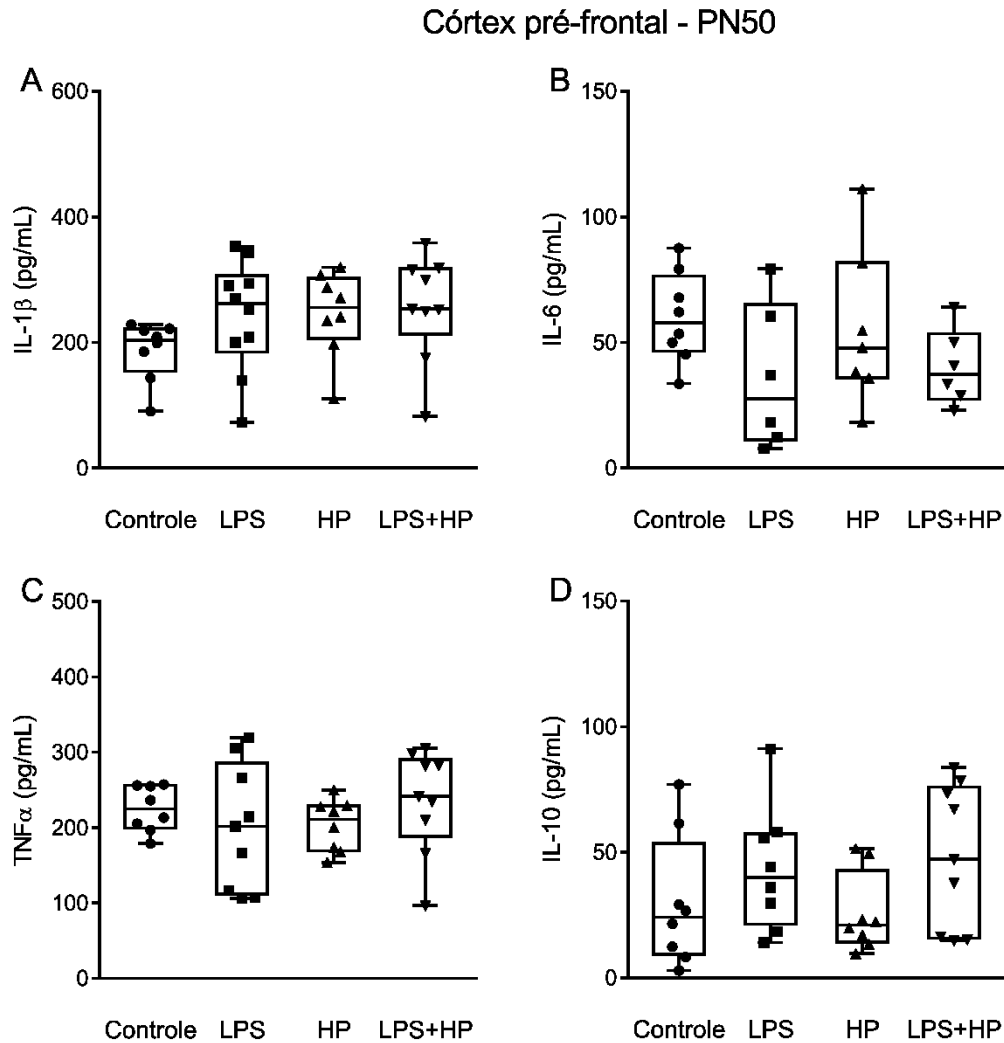


FIGURA 10 – Concentração de IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF- α (C), e IL-10 (D) no córtex pré-frontal dos animais no 50º dia pós-natal (PN50). Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através de gráfico *box and whiskers*. $n = 8-10$; para análise dos dados foi utilizada a ANOVA e o teste de Newman Keuls.

O mesmo ocorreu para as concentrações hipocâmpicas de IL-1 β ($p = 0,14$), IL-6 ($p = 0,96$), e TNF α ($p = 0,42$) (FIGURA 11A-11C). Por outro lado, no hipocampo desses animais, os níveis de IL-10 demonstraram uma diferença significativa na interação entre dieta e

tratamento ($F_{(1, 29)} = 0.34$, $p < 0.05$; power: 0.70). A concentração de IL-10 hipocampal foi maior no grupo LPS+HP comparado aos grupos LPS ($p < 0,05$) e Controle ($p < 0,05$) (FIGURA 11D).

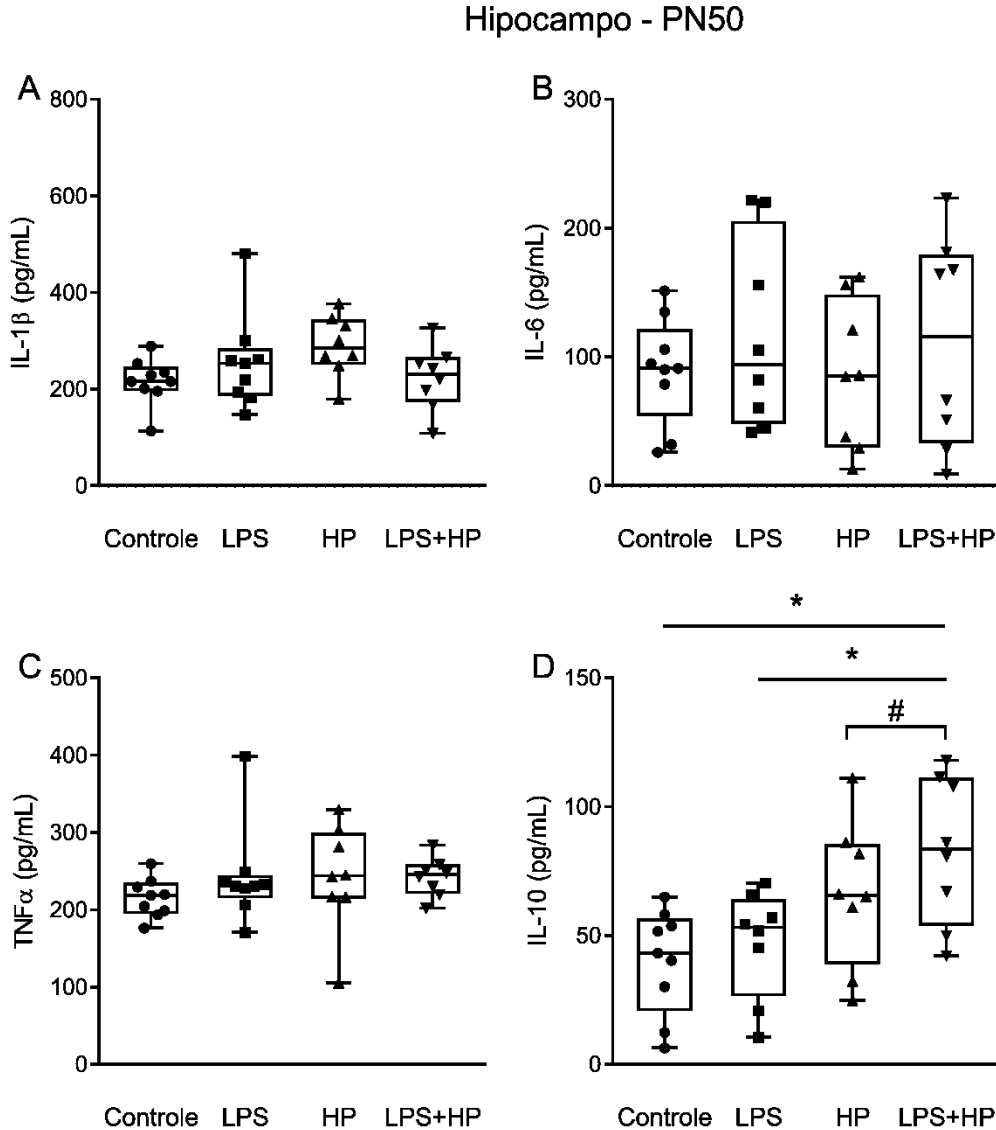


FIGURA 11 – Concentração de IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF- α (C), e IL-10 (D) no hipocampo dos animais no 50^o dia pós-natal (PN50). Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através de gráfico *box and whiskers*. $n = 8-10$; $p < 0.05$ (interação dieta \times tratamento); $\#p < 0.05$ (fator dieta) usando ANOVA e o teste de Newman Keuls.

Não foi observado nenhum efeito de dieta, tratamento, ou dieta e tratamento para a concentração de BDNF no hipocampo dos animais PN50 ($p = 0,83$) (FIGURA 12).

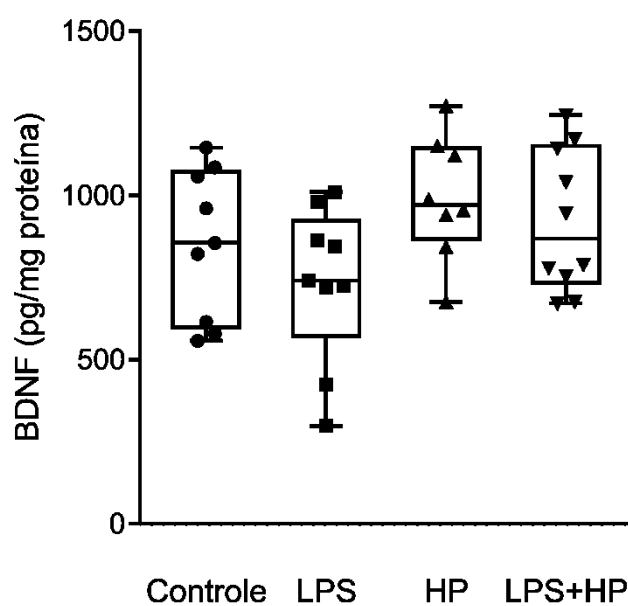


FIGURA 12 – Concentração de BDNF no hipocampo dos animais no 50º dia pós-natal (PN50). Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através de gráfico *box and whiskers*. n = 8-10; para análise dos dados foi utilizada a ANOVA e o teste de Newman Keuls.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou os efeitos da tolerância cruzada perante a exposição pré-natal ao LPS em relação aos parâmetros de neuroinflamação, estado redox e na memória de reconhecimento de objetos de ratos nascidos de mães tratadas com dieta hiperlipídica (gestação e lactação). Os resultados demonstram que a dieta materna hiperlipídica isoladamente durante a gestação e lactação pode induzir a prejuízos na memória de curto prazo (mas não na de longo prazo). No entanto, o mesmo não é observado na prole das mães que receberam a dieta hiperlipídica associada à reexposição ao LPS, que, além de não apresentarem nenhum prejuízo na memória, reportaram menores níveis hipocampais de IL-6 (PN21) e maiores níveis de IL-10 (PN21 e PN50).

Em roedores, existe uma forte correlação na literatura entre a utilização de dietas maternas hiperlipídicas e o desenvolvimento de neuroinflamação na prole (CORDNER et al., 2019b; GRAF et al., 2016; WINTHER et al., 2018). Especificamente, vários estudos demonstraram a associação desse tipo de dieta materna com a inflamação hipocampal (DIAS et al., 2020; GRAF et al., 2016; LIU et al., 2019; WINTHER et al., 2018). Dois mecanismos são apontados como possíveis causadores da inflamação encefálica da prole, cada qual ligado a uma das fases iniciais da vida (gestação ou lactação) e também à imaturidade da barreira hematoencefálica dos filhotes (AFROZ; ALVIÑA, 2019; MILLER et al., 2016; SAUNDERS et al., 2014).

Dietas hiperlipídicas (principalmente quando ricas em gorduras do tipo saturadas) podem causar nas mães em fase de gestação um estado de inflamação crônica de baixo grau (SCHEJA; HEEREN, 2019). Como consequência dessa inflamação latente materna, pode ocorrer o aumento na expressão placentária de genes pró-inflamatórios, culminando com a transferência de citocinas da mãe para o feto (CIRULLI; MUSILLO; BERRY, 2020; GIRARD et al., 2010; REYNOLDS et al., 2015). De forma semelhante, a passagem de agentes pró-inflamatórios para o feto pode ocorrer durante a lactação, através da transferência direta pelo leite materno (DI BENEDETTO et al., 2019; PANAGOS et al., 2016). Além disso, embora somente essa passagem de citocinas da mãe para a prole já seja suficiente para deflagração de neuroinflamação, adicionalmente, a transferência de ácidos graxos saturados da dieta materna foi evidenciada tanto na gestação (via placenta) como na lactação (via leite materno) (CALABUIG-NAVARRO et al., 2017; ELLSWORTH et al., 2020; GARCÍA-RAVELO et al., 2018; HIRSCHMUGL et al., 2016; PANAGOS et al., 2016; SABEN et al.,

2013; SOSA-CASTILLO; RODRÍGUEZ-CRUZ; MOLTÓ-PUIGMARTÍ, 2017). Isoladamente, os ácidos graxos saturados também podem induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias na prole. Ademais, estudos envolvendo a aplicação intracerebroventricular de ácidos graxos demonstraram que esses podem ativar os TLR₄, levando à maior expressão de marcadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , e IL-6 (LI et al., 2020; MILANSKI et al., 2009).

Em associação, as hipóteses levantadas para a transferência de mediadores inflamatórios (ou de ácidos graxos) durante as fases de gestação e lactação podem explicar o aumento na concentração de IL-6 hipocampal apresentada pelo grupo HP. A transferência de citocinas pró-inflamatórias da mãe para o feto/neonato, associado a uma barreira hematoencefálica ainda em desenvolvimento, e, também a um SNC imaturo, pode ter resultado em neuroinflamação (HALE et al., 2015; KANG et al., 2014). De acordo com Rudolph et al. (2018), a elevação nos níveis de IL-6 pode alterar as etapas de proliferação, diferenciação, crescimento axonal, sinaptogênese, e da sobrevivência celular. Como consequência, devido à importância desses processos na maturação encefálica, prejuízos na memória da prole podem ser observados ao longo da vida.

Em consonância com essas evidências, o estudo de Huang et al. (2015) demonstrou que a prole de mães alimentadas com dieta hiperlipídica apresentou maiores expressões de IL-6, TNF- α e proteína Tau no hipocampo (este último, um biomarcador da doença de Alzheimer). O mesmo não ocorreu com os filhotes das mães que receberam a associação entre dieta materna hiperlipídica e reexposição ao LPS, que apresentaram níveis semelhantes desses marcadores em relação ao grupo controle. Assim, os resultados reportados por Huang et al. (2015) demonstram um claro efeito de tolerância cruzada à dieta materna promovido pela reexposição pré-natal ao LPS, promovendo uma proteção contra a inflamação hipocampal. De forma semelhante, outros estudos demonstraram o potencial de tolerância cruzada do LPS para efetivamente suprimir/atenuar respostas inflamatórias originadas de outros agentes/fontes (AMINI et al., 2018; HE et al., 2014; KUMAR; ADHIKARI, 2017; TURNER et al., 2017; WANG et al., 2018).

No presente estudo, o grupo LPS+HP não apresentou elevação de IL-6, diferentemente dos animais HP ao desmame (PN21). Além disso, o grupo LPS+HP reportou maiores concentrações hipocampais de IL-10 ao desmame (PN21) e também na fase de adolescência (PN50), indicando um efeito de tolerância cruzada à dieta materna promovido pela reexposição ao LPS. Estudos anteriores demonstraram que a tolerância ao LPS pode

promover uma supressão à resposta inflamatória, através dos mecanismos: redução na expressão celular de TLR₄ e na associação entre MyD88-TLR₄ (CHANG et al., 2014; LAJQI et al., 2019); diminuição na atividade da cinase associada ao receptor de interleucina-1 (*interleukin-1 receptor associated kinase* – IRAK); redução na fosforilação das cinases p38 e JNK (*c-Jun amino-terminal kinase*), além da regulação negativa na expressão do fator nuclear kappa B (*nuclear factor kappa-B* – NFκB). Ademais, é importante ressaltar que o aumento na concentração de IL-10 foi reportada por outros autores, utilizando modelos diferentes, quando o LPS era administrado repetidas vezes em roedores (BISWAS; LOPEZ-COLLAZO, 2009; HOBBS et al., 2018; LEITE et al., 2016; LIU et al., 2017; VERGADI; VAPORIDI; TSATSANIS, 2018).

A IL-10 possui a capacidade de controlar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, através da regulação da atividade da glia (LEITE et al., 2016; XIU et al., 2016). Além disso, existe uma forte correlação entre o aumento de IL-10 e a melhora de diversos processos cognitivos (AROSIO et al., 2004; BARROETA-ESPAR et al., 2019; TEGELER et al., 2016; VARGAS-ALARCÓN et al., 2016). Portanto, os resultados aqui demonstrados indicam que a tolerância cruzada promovida pela reexposição ao LPS pode promover uma proteção em relação à dieta hiperlipídica materna, um efeito que parece ser dependente do aumento na concentração de IL-10 hipocampal. Um possível mecanismo para a elevação dessa citocina em particular seria através da regulação negativa tardia dos genes microRNA-98 (miR-98) e positiva do microRNA-21 (miR-21) (JI et al., 2018; LIU et al., 2011; NAHID et al., 2013; SHEEDY, 2015; SHEEDY et al., 2010). No entanto, mais estudos são necessários para avaliar essa hipótese.

Com relação ao estado redox, no presente estudo, uma maior capacidade antioxidante não-enzimática (FRAP) e também uma elevada atividade na enzima GST foram demonstradas no hipocampo do grupo LPS+HP. Além disso, foi reportada uma alta atividade da SOD hipocampal na prole das mães que receberam a reexposição ao LPS. Dietas hiperlipídicas podem ocasionar a elevação de espécies reativas de oxigênio no tecido encefálico da prole, causando danos às proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Além disso, a oxidação de proteínas pode levar à liberação de sinais inflamatórios, resultando em neuroinflamação (CIRULLI; MUSILLO; BERRY, 2020; HATANAKA; WADA; KABUTA, 2016; MACIEL AUGUST et al., 2020). Por outro lado, na tentativa de contenção do estresse oxidativo do tecido, existe um processo fisiológico de aumento das moléculas antioxidantes (não-enzimáticas e enzimáticas),

de forma a tentar manter a homeostase celular (BAKUNINA; PARIANTE; ZUNSZAIN, 2015).

Nesse contexto, estudos anteriores demonstraram que dietas maternas obesogênicas podem levar ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes no encéfalo da prole (HATANAKA; WADA; KABUTA, 2016; HE et al., 2017; MACIEL AUGUST et al., 2020). De forma similar, a tolerância ao LPS pode induzir uma maior expressão do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 - Nfr2*) e, conseqüentemente, levar ao aumento de enzimas antioxidantes (BORDET et al., 2000; LI et al., 2016). Em ambos os casos, a inflamação e as espécies reativas de oxigênio produzidas pela dieta hiperlipídica ou pela aplicação do LPS, podem ter induzido uma resposta antioxidante na tentativa de retorno à homeostase do sistema. Adicionalmente, a utilização de duas fontes pró-inflamatórias em associação (dieta materna hiperlipídica e LPS) pode ter estimulado uma maior resposta antioxidante, evidenciada tanto no córtex pré-frontal como no hipocampo dos animais LPS+HP.

Em particular, a melhora do sistema de defesa antioxidante na região do hipocampo, está fortemente relacionado com uma melhora na memória (MARTINS et al., 2017; NEVES et al., 2015; ROSSI DARE et al., 2019). A associação entre a dieta hiperlipídica materna e a reexposição ao LPS, pode ter promovido uma resposta antioxidante protetora, possivelmente envolvendo a via do Nfr2, com elevação da capacidade antioxidante enzimática e não-enzimática (STONE et al., 2019). Portanto, assim como a elevação das concentrações de IL-10 no hipocampo, o aumento observado na capacidade antioxidante do grupo LPS+HP pode ter contribuído para a proteção da memória nas duas variações (curto e longo prazo) do teste de reconhecimento de objetos.

Um resultado inesperado do presente trabalho foi em relação aos níveis de BDNF hipocampais, visto que, o grupo HP demonstrou concentração similar dessa neurotrofina em relação ao grupo Controle. A maioria dos estudos encontrados que avaliaram a expressão de BDNF na prole após a utilização de uma dieta hiperlipídica materna, demonstrou que, tanto em ratos adultos como em adolescentes, os níveis dessa neurotrofina haviam diminuído frente ao controle (MUCCELLINI et al., 2019; PAGE; JONES; ANDAY, 2014; PANETTA et al., 2017; TOZUKA et al., 2010). Porém, outros estudos reportaram que a diminuição do BDNF não é observada após o desmame ou na fase adulta (CORDNER et al., 2019b; JAWALE; JOSHI; KALE, 2018), mas, somente após o nascimento dos animais (JAWALE; JOSHI; KALE, 2018). Portanto, é possível que uma alteração nos níveis de BDNF hipocampais tenha

ocorrido somente nos primeiros dias de vida dos animais, ou mesmo durante a lactação, não sendo evidenciada essa mudança durante a adolescência. Para avaliar essa suposição, os próximos estudos devem realizar dosagens de BDNF em outras faixas etárias (ex: ao nascimento e anterior ao desmame), bem como avaliar outros fatores neurotróficos, para identificar se há alguma relação entre estes marcadores, a neuroinflamação e a memória.

O grupo HP apresentou prejuízos na memória de curto prazo, como já havia sido reportado no estudo de Graf et al. (2016), que utilizaram metodologia semelhante. Porém, esse mesmo efeito não foi observado no grupo HP para a memória de longo prazo no teste de reconhecimento de objetos. Não foram encontrados trabalhos que utilizassem metodologia semelhante (dieta hiperlipídica durante as fases de gestação e lactação) e que avaliassem essas duas variações de memória em função do tempo (curto e longo prazo). No entanto, outros modelos demonstraram resultados semelhantes ao do presente trabalho, reportando prejuízos na memória de curto prazo, sem que o mesmo ocorresse para a memória de longo prazo (HALL et al., 2016; SAKAGUCHI; SAKURAI, 2020; SHIPTON et al., 2014).

O processo de reconhecimento de objetos é dependente de várias regiões do encéfalo, dentre elas estão o hipocampo, e os córtex pré-frontal e perirrinal, que formam entre si um circuito (BARKER; WARBURTON, 2020; HAN et al., 2019; WARBURTON; BROWN, 2015). Estudos sugerem que a manipulação do córtex perirrinal pode levar a uma amnésia de curto-prazo, mas, o mesmo não é observado a longo prazo (BARKER et al., 2006; TINSLEY et al., 2011). Ademais, Sakaguchi e Sakurai (2020) recentemente demonstraram que lesões no hemisfério direito do hipocampo podem promover déficit na memória de curto prazo. Em contraste, o mesmo estudo demonstrou que lesões isoladas no hemisfério esquerdo podem prejudicar apenas a memória de longo prazo. Embora no presente trabalho não tenha sido avaliado o córtex perirrinal, ou cada lado do hipocampo individualmente, o aumento da IL-6 hipocampal demonstrado no grupo HP pode ter levado ao comprometimento desse circuito, gerando perda da memória de curto prazo. A IL-6 tem sido consistentemente implicada em *déficits* de memória e é um mecanismo endógeno para limitar a plasticidade cerebral, o que indica que o aumento nos seus níveis no grupo HP possa ter levado aos prejuízos observados no TRO (DONZIS; TRONSON, 2014; RUDOLPH et al., 2018; TCHESSALOVA; POSILLICO; TRONSON, 2018).

A principal hipótese deste trabalho era que a reexposição ao LPS poderia gerar um efeito tolerante, de forma a proporcionar uma proteção em relação à inflamação causada pela dieta materna, o que resultaria na preservação da memória dos animais. Apesar de não haver

consenso na literatura sobre qual a estrutura encefálica que possui um papel central na habilidade do animal de reconhecer um novo objeto, várias evidências indicam que o córtex pré-frontal e o hipocampo possuem importância fundamental nesse processo (ALLEN et al., 2020; BALDUCCI et al., 2017; KODALI et al., 2018; SOCH et al., 2016; TUSCHER et al., 2018). Esse trabalho é, provavelmente, o primeiro a reportar um efeito protetor da tolerância cruzada do LPS à dieta materna, sem prejuízos na memória de curto ou longo prazo nos animais LPS+HP. Além disso, esse efeito parece estar associado a um aumento na capacidade antioxidante e na concentração de IL-10 hipocampal, o que confirma a hipótese inicial.

Entretanto, algumas limitações foram notadas para o presente trabalho. Em primeiro lugar, animais *knockout* para a expressão de IL-10 poderiam ter sido utilizados para o melhor entendimento do papel dessa citocina no efeito protetor gerado pela tolerância ao LPS. Em segundo lugar, ainda não está claro qual a importância do sistema antioxidante na proteção da memória desses animais. O uso de drogas que alteram a produção de espécies reativas, bem como a avaliação da expressão de Nrf2, poderiam ser elementos fundamentais para entender o papel do estado redox nesse contexto. Em terceiro lugar, o uso de fêmeas em estudos futuros é necessário, uma vez que o dimorfismo sexual é comum em estudos que utilizam dietas maternas ou AIM. As fêmeas podem ter outras respostas devido a diferentes vulnerabilidades durante o desenvolvimento, regulação neuroendócrina, ou efeitos placentários e epigenéticos distintos dos machos. Além disso, a avaliação de outros testes (ex: memória de local; labirinto em Y; labirinto aquático de Morris) deveriam ser realizados para compreender qual a extensão do impacto do presente modelo na memória, cognição e aprendizado. Finalmente, levando em consideração que a micróglia possui papel importante nas funções regulatórias e de sinaptogênese (DE LUCA et al., 2020) seria interessante a utilização de marcadores de ativação da microglia e experimentos envolvendo a sua ablação temporária.

Em suma, este estudo demonstrou um papel protetor promovido pela tolerância ao LPS em ratos adolescentes descendentes de mães que receberam dieta hiperlipídica durante as fases de gestação e lactação. A neuroproteção foi promovida pelo aumento na concentração de IL-10 e dos sistemas antioxidantes no hipocampo. Ressalta-se ainda que, os resultados encontrados possuem potencial para serem utilizados futuramente na proteção/prevenção de doenças mentais ou cognitivas, através do uso de agonistas do TLR₄ para promoção de uma tolerância a inflamação (HERNANDEZ et al., 2019; VENEZIA et al., 2017). Ademais, especula-se que doenças como o Alzheimer, e outras relacionadas à cognição, podem ter seu início através de processos inflamatórios durante as fases de infância e adolescência

(AXELRUD et al., 2019; PFEFFER et al., 2018; ROLLINS et al., 2019; ZHANG; LIU; CHOI, 2020). Dessa forma, estudos futuros que envolvam a promoção de tolerância/hiporresponsividade dos TRL₄ através do uso de agonistas desses receptores durante essas fases, podem ser interessantes para diminuir a progressão ou atenuar o impacto dessas doenças.

6 CONCLUSÕES

A associação da dieta hiperlipídica materna com a reexposição ao LPS promoveu um efeito tolerante na prole, resultando em uma modulação anti-inflamatória e antioxidante no hipocampo e no córtex pré-frontal. Esse efeito neuroprotetor observado preservou a memória de reconhecimento de objetos de curto e longo prazo desses animais, o que não ocorreu com a prole das mães que receberam apenas a dieta hiperlipídica.

REFERÊNCIAS

AFROZ, Kazi Farhana; ALVIÑA, Karina. Maternal elevated salt consumption and the development of autism spectrum disorder in the offspring. **Journal of Neuroinflammation**, [on-line], v. 16, n. 265, p. 1–11, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12974-019-1666-2>>

ALLEN, Leila M. et al. The hippocampus, prefrontal cortex, and perirhinal cortex are critical to incidental order memory. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v. 379, p. 112215, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432819311441>>

AMINI, Elham et al. Brain Lipopolysaccharide Preconditioning-Induced Gene Reprogramming Mediates a Tolerance State in Electroconvulsive Shock Model of Epilepsy. **Frontiers in Pharmacology**, [on-line], v. 9, n. 416, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00416/full>>

AROSIO, Beatrice et al. Interleukin-10 and interleukin-6 gene polymorphisms as risk factors for Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, [on-line], v. 25, n. 8, p. 1009–1015, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0197458003002380>>

AXELRUD, Luiza Kvitko et al. Genetic risk for Alzheimer's disease and functional brain connectivity in children and adolescents. **Neurobiology of Aging**, [on-line], v. 82, p. 10–17, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0197458019301939>>

BAKUNINA, Nataliia; PARIANTE, Carmine M.; ZUNSZAIN, Patricia A. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. **Immunology**, [on-line], v. 144, n. 3, p. 365–373, 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imm.12443>>

BALDERAS, Israela; RODRIGUEZ-ORTIZ, Carlos J.; BERMUDEZ-RATTONI, Federico. Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v. 285, p. 213–222, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.049>>

BALDUCCI, Claudia et al. Toll-like receptor 4-dependent glial cell activation mediates the impairment in memory establishment induced by β -amyloid oligomers in an acute mouse model of Alzheimer's disease. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 60, p. 188–197, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159116304755>>

BARKER, Gareth R. I. et al. The different effects on recognition memory of perirhinal kainate and NMDA glutamate receptor antagonism: implications for underlying plasticity mechanisms. **The Journal of Neuroscience**, [on-line], v. 26, n. 13, p. 3561–3566, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16571764>>

BARKER, Gareth R. I.; WARBURTON, Elizabeth Clea. Multi-level analyses of associative recognition memory: the whole is greater than the sum of its parts. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, [on-line], v. 32, p. 80–87, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352154620300243>>

BARROETA-ESPAR, Isabel et al. Distinct cytokine profiles in human brains resilient to Alzheimer's pathology. **Neurobiology of Disease**, [on-line], v. 121, p. 327–337, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996118307137>>

BASTOS, Daniel Silva Sena et al. Lipophosphoglycan-3 recombinant protein vaccine controls hepatic parasitism and prevents tissue damage in mice infected by *Leishmania infantum* chagasi. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [on-line], v. 126, p. 110097, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332220302894>>

BENZIE, Iris F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, [on-line], v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269796902924>>

BISWAS, Subhra K.; LOPEZ-COLLAZO, Eduardo. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. **Trends in Immunology**, [on-line], v. 30, n. 10, p. 475–487, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1471490609001549>>

BOCKHORST, K. H. et al. Early postnatal development of rat brain: in vivo diffusion tensor imaging. **Journal of Neuroscience Research**, [on-line], v. 86, n. 7, p. 1520–1528, 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jnr.21607>>

BORDET, Régis et al. Increase in Endogenous Brain Superoxide Dismutase as a Potential Mechanism of Lipopolysaccharide-Induced Brain Ischemic Tolerance. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, [on-line], v. 20, n. 8, p. 1190–1196, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/00004647-200008000-00004>>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [on-line], v. 72, p. 248–254, 1976. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269776905273>>

CALABUIG-NAVARRO, Virtu et al. Effect of Maternal Obesity on Placental Lipid Metabolism. **Endocrinology**, [on-line], v. 158, n. 8, p. 2543–2555, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28541534>>

CATALANI, Assia et al. Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in developing rat hippocampus. **Mechanisms of Ageing and Development**, [on-line], v. 123, n. 5, p. 481–490, 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0047637401003566>>

CHANG, Ruiming et al. LPS preconditioning ameliorates intestinal injury in a rat model of hemorrhagic shock. **Inflammation Research**, [on-line], v. 63, n. 8, p. 675–682, 2014.

CIRULLI, Francesca; MUSILLO, Chiara; BERRY, Alessandra. Maternal Obesity as a Risk Factor for Brain Development and Mental Health in the Offspring. **Neuroscience**, [on-line], n. February, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.01.023>>

COHEN, Sarah J.; STACKMAN JR., Robert W. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v. 285, p. 105–117, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432814005130>>

CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Diretrizes brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividade de ensino ou de pesquisa científica, Resolução Normativa nº 30 (2016)**. Brasil - Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, 2016.

CORDNER, Zachary A. et al. Maternal high-fat diet results in cognitive impairment and hippocampal gene expression changes in rat offspring. **Experimental Neurology**, [on-line], v. 318, n. April, p. 92–100, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.04.018>>

DE LUCA, Simone et al. Glial remodeling enhances short-term memory performance in Wistar rats. **Journal of Neuroinflammation**, [on-line], v. 17, n. 52, p. 52, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12974-020-1729-4>>

DI BENEDETTO, Maria Grazia et al. Nutritional and immunological factors in breast milk: A role in the intergenerational transmission from maternal psychopathology to child development. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 85, p. 57-68, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159119301096>>

DIAS-ROCHA, Camilla P. et al. Maternal high-fat diet induces sex-specific endocannabinoid system changes in newborn rats and programs adiposity, energy expenditure and food preference in adulthood. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [on-line], v. 51, p. 56–68, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0955286317303042>>

DIAS, Clarissa Tavares et al. Maternal high-fat diet stimulates proinflammatory pathway and increases the expression of Tryptophan Hydroxylase 2 (TPH2) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in adolescent mice hippocampus. **Neurochemistry International**, [on-line], v. 139, p. 104781, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018620301728>>

DONZIS, Elissa J.; TRONSON, Natalie C. Modulation of learning and memory by cytokines: signaling mechanisms and long term consequences. **Neurobiology of Learning and Memory**, [on-line], v. 115, p. 68–77, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.08.008>>

DURÁN-CARABALI, L. E. et al. Preventive and therapeutic effects of environmental enrichment in Wistar rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v. 359, p. 485–497, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432818311707>>

ELLSWORTH, Lindsay et al. Impact of maternal overweight and obesity on milk composition and infant growth. **Maternal & Child Nutrition**, [on-line], v. 16, n. 3, p. e12979, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/mcn.12979>>

FERNÁNDEZ DE COSSÍO, Lourdes et al. Prenatal infection leads to ASD-like behavior and altered synaptic pruning in the mouse offspring. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 63, p. 88–98, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159116304524>>

FIGUEIRÓ, Paula W. et al. The neuroprotective role of melatonin in a gestational hypermethioninemia model. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [on-line], v. 78, n. 1, p. 198–209, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2019.08.004>>

FISCH, Joana et al. Maternal feeding associated to post-weaning diet affects metabolic and behavioral parameters in female offspring. **Physiology & Behavior**, [on-line], v. 204, p. 162–167, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031938418311272>>

FREITAS, D. A. et al. High-intensity interval training improves cerebellar antioxidant capacity without affecting cognitive functions in rats. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v. 376, p. 112181, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112181>>

FREITAS, Daniel A. et al. High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats. **Physiology & Behavior**, [on-line], v. 184, p. 6–11, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031938417303785?via%3Dihub>>

GARCÍA-RAVELO, Sara et al. Fatty Acid Composition and Eicosanoid Levels (LTE4 and PGE2) of Human Milk from Normal Weight and Overweight Mothers. **Breastfeeding Medicine**, [on-line], v. 13, n. 10, p. 702–710, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/bfm.2017.0214>>

GIRARD, Sylvie et al. IL-1 Receptor Antagonist Protects against Placental and Neurodevelopmental Defects Induced by Maternal Inflammation. **The Journal of Immunology**, [on-line], v. 184, n. 7, p. 3997-4005, 2010. Disponível em: <<https://www.jimmunol.org/content/184/7/3997>>

GLENDINING, Kelly A.; FISHER, Lorryn C.; JASONI, Christine L. Maternal high fat diet alters offspring epigenetic regulators, amygdala glutamatergic profile and anxiety. **Psychoneuroendocrinology**, [on-line], v. 96, p. 132–141, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306453018302099>>

GRAF, Amanda E. et al. Maternal high fat diet exposure is associated with increased hepcidin levels, decreased myelination, and neurobehavioral changes in male offspring. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 58, p. 369–378, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2016.08.005>>

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, [on-line], v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4436300/>>

HALE, Matthew W. et al. Diet, behavior and immunity across the lifespan. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [on-line], v. 58, p. 46–62, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6248333/>>

HALL, Jessica H. et al. Tc1 mouse model of trisomy-21 dissociates properties of short- and long-term recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, [on-line], v. 130, p. 118–128, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074742716000393>>

HAN, Ren-wen et al. Nociceptin impairs acquisition of novel object recognition memory in perirhinal cortex. **Neurobiology of Learning and Memory**, [on-line], v. 162, p. 9–14, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074742719300826>>

HASEBE, Kyoko et al. Modulation of high fat diet-induced microbiome changes, but not behaviour, by minocycline. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 82, p. 309–318, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159118312418>>

HATANAKA, Yusuke; WADA, Keiji; KABUTA, Tomohiro. Maternal high-fat diet leads to persistent synaptic instability in mouse offspring via oxidative stress during lactation. **Neurochemistry International**, [on-line], v. 97, p. 99–108, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0197018616300341>>

HE, Axin et al. Prenatal high sucrose intake affected learning and memory of aged rat offspring with abnormal oxidative stress and NMDARs/Wnt signaling in the hippocampus. **Brain Research**, [on-line], v. 1669, p. 114–121, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899317302196>>

HE, Kang et al. Lipopolysaccharide-induced cross-tolerance against renal ischemia–reperfusion injury is mediated by hypoxia-inducible factor-2 α -regulated nitric oxide production. **Kidney International**, [on-line], v. 85, n. 2, p. 276–288, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0085253815561929>>

HERNANDEZ, Antonio et al. Immunobiology and application of toll-like receptor 4 agonists to augment host resistance to infection. **Pharmacological Research**, [on-line], v. 150, p. 104502, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661819320067>>

HIRSCHMUGL, B. et al. Maternal obesity modulates intracellular lipid turnover in the human term placenta. **Nature Publishing Group**, [on-line], v. 41, n. 2, p. 317–323, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2016.188>>

HOBBS, Stuart et al. LPS-stimulated NF- κ B p65 dynamic response marks the initiation of TNF expression and transition to IL-10 expression in RAW 264.7 macrophages. **Physiological Reports**, [on-line], v. 6, n. 21, p. e13914–e13914, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30426723>>

HOFFMAN, Daniel J.; REYNOLDS, Rebecca M.; HARDY, Daniel B. Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms. **Nutrition Reviews**, [on-line], v. 75, n. 12, p. 951–970, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nutrit/nux053>>

HOLSAPPLE, Michael P.; WEST, Lori J.; LANDRETH, Kenneth S. Species comparison of anatomical and functional immune system development. **Birth defects research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology**, [on-line], v. 68, n. 4, p. 321–334, 2003. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bdrb.10035>>

HORIGUCHI, Masakuni; HUANG, Mei; MELTZER, Herbert Y. Interaction of mGlu2/3 agonism with clozapine and lurasidone to restore novel object recognition in subchronic phencyclidine-treated rats. **Psychopharmacology**, [on-line], v. 217, n. 1, p. 13, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00213-011-2251-2>>

HUANG, C. F. et al. Effect of prenatal exposure to LPS combined with pre- and post-natal high-fat diet on hippocampus in rat offspring. **Neuroscience**, [on-line], v. 286, n. December, p. 364–370, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452214010343>>

JAWALE, Shruti; JOSHI, Sadhana; KALE, Anvita. Maternal dairy fat diet does not influence neurotrophin levels and cognitive performance in the rat offspring at adult age. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [on-line], v. 71, p. 18–29, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0736574818301485>>

Ji, Yang-Fei et al. MicroRNA-132 attenuates LPS-induced inflammatory injury by targeting TRAF6 in neuronal cell line HT-22. **Journal of Cellular Biochemistry**, [on-line], v. 119, n. 7, p. 5528–5537, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jcb.26720>>

KANG, Silvia S. et al. Dietary intervention rescues maternal obesity induced behavior deficits and neuroinflammation in offspring. **Journal of Neuroinflammation**, [on-line], v. 11, n. 1, p. 156, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12974-014-0156-9>>

KENTNER, Amanda C. et al. Environmental enrichment rescues the effects of early life inflammation on markers of synaptic transmission and plasticity. **Brain, behavior, and immunity**, [on-line], v. 57, p. 151–160, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889159116300587>>

KNUESEL, Irene et al. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. **Nature Reviews Neurology**, [on-line], v. 10, n. 11, p. 643–660, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.187>>

KODALI, M. et al. Curcumin treatment leads to better cognitive and mood function in a model of Gulf War Illness with enhanced neurogenesis, and alleviation of inflammation and mitochondrial dysfunction in the hippocampus. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 69, p. 499–514, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159118300096>>

KUMAR, Sudhir; ADHIKARI, Atin. Dose-dependent immunomodulating effects of endotoxin in allergic airway inflammation. **Innate Immunity**, [on-line], v. 23, n. 3, p. 249–257, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1753425917690443>>

LABROUSSE, V. F. et al. Dietary omega-3 deficiency exacerbates inflammation and reveals spatial memory deficits in mice exposed to lipopolysaccharide during gestation. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 73, n. May, p. 427–440, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.06.004>>

LAJQI, Trim et al. Memory-Like Inflammatory Responses of Microglia to Rising Doses of LPS: Key Role of PI3K γ . **Frontiers in Immunology**, [on-line], v. 10, n. 2492, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.02492>>

LEITE, Hércules Ribeiro et al. Vesicular acetylcholine transporter knock down-mice are more susceptible to inflammation, c-Fos expression and sickness behavior induced by lipopolysaccharide. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 57, p. 282–292, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159116301155>>

LEMES, Simone Ferreira et al. Maternal Consumption of High-fat Diet in Mice Alters Hypothalamic Notch Pathway, NPY Cell Population and Food Intake in Offspring. **Neuroscience**, [on-line], v. 371, p. 1–15, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452217308461>>

LI, Bin et al. A global perspective on the crosstalk between saturated fatty acids and Toll-like receptor 4 in the etiology of inflammation and insulin resistance. **Progress in Lipid**

Research, [on-line], v. 77, p. 101020, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163782719300633>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

LI, Weichao et al. Lipopolysaccharide-induced preconditioning protects against traumatic spinal cord injury by upregulating Nrf2 expression in rats. **Life Sciences**, [on-line], v. 162, p. 14–20, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320516304702>>

LIANG, Ya-Jing et al. Contribution of microglial reaction to increased nociceptive responses in high-fat-diet (HFD)-induced obesity in male mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 80, p. 777–792, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159118307633>>

LIU, Hong et al. Moderate- and Low-Dose of Atorvastatin Alleviate Cognition Impairment Induced by High-Fat Diet via Sirt1 Activation. **Neurochemical Research**, [on-line], v. 44, n. 5, p. 1065–1078, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11064-019-02738-z>>

LIU, Yang et al. MicroRNA-98 negatively regulates IL-10 production and endotoxin tolerance in macrophages after LPS stimulation. **FEBS Letters**, [on-line], v. 585, n. 12, p. 1963–1968, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.029>>

LIU, Yang et al. Peripheral immune tolerance alleviates the intracranial lipopolysaccharide injection-induced neuroinflammation and protects the dopaminergic neurons from neuroinflammation-related neurotoxicity. **Journal of Neuroinflammation**, [on-line], v. 14, n. 1, p. 223, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29145874>>

MACIEL AUGUST, Pauline et al. Effect of Maternal Exercise on Diet-induced Redox Imbalance in Hippocampus of Adult Offspring. **Neuroscience**, [on-line], 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452220302827>>

MARKLUND, Stefan; MARKLUND, Gudrun. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, [on-line], v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>>

MARTINS, Alexandre et al. Supplementation with different teas from *Camellia sinensis* prevents memory deficits and hippocampus oxidative stress in ischemia-reperfusion. **Neurochemistry International**, [on-line], v. 108, p. 287–295, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018617300268>>

MEEHAN, Crystal et al. Effects of immune activation during early or late gestation on schizophrenia-related behaviour in adult rat offspring. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 63, p. 8–20, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159116303385>>

MELO, C. S. et al. A single session of high-intensity interval exercise increases antioxidants defenses in the hippocampus of Wistar rats. **Physiology and Behavior**, [on-line], v. 211, n. 1, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031938419303099>>

MILANSKI, Marciane et al. Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for

the Pathogenesis of Obesity. **The Journal of Neuroscience**, [on-line], v. 29, n. 2, p. 359-370, 2009. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/content/29/2/359.abstract>>

MILLER, Stephanie M. et al. Review: The blood-brain barrier; protecting the developing fetal brain. **Placenta**, [on-line], v. 54, p. 1–6, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.12.005>>

MINA, T. H. et al. Prenatal exposure to very severe maternal obesity is associated with adverse neuropsychiatric outcomes in children. **Psychological Medicine**, [on-line], v. 47, n. 2, p. 353–362, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27776561/>>

MUCCELLINI, Amanda Brondani et al. Maternal and post-natal obesity alters long-term memory and hippocampal molecular signaling of male rat. **Brain Research**, [on-line], v. 1708, p. 138–145, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006899318306395>>

NAHID, Md A. et al. Regulation of TLR2-Mediated Tolerance and Cross-Tolerance through IRAK4 Modulation by miR-132 and miR-212. **The Journal of Immunology**, [on-line], v. 190, n. 3, p. 1250-1263, 2013. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/190/3/1250.abstract>>

NEVES, Ben-Hur et al. Physical exercise prevents short and long-term deficits on aversive and recognition memory and attenuates brain oxidative damage induced by maternal deprivation. **Physiology & Behavior**, [on-line], v. 152, p. 99–105, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938415301165>>

OHKAWA, Hiroshi; OHISHI, Nobuko; YAGI, Kunio. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, [on-line], v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269779907383>>

PAGE, Kathleen C.; JONES, Elizabeth K.; ANDAY, Endla K. Maternal and postweaning high-fat diets disturb hippocampal gene expression, learning, and memory function. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [on-line], v. 306, n. 8, p. R527–R537, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00319.2013>>

PANAGOS, P. G. et al. Breastmilk from obese mothers has pro-inflammatory properties and decreased neuroprotective factors. **Journal of Perinatology**, [on-line], v. 36, n. 4, p. 284–290, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/jp.2015.199>>

PANETTA, Pamela et al. Long-Term Sex-Dependent Vulnerability to Metabolic challenges in Prenatally Stressed Rats. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [on-line], v. 11, p. 113, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28706476>>

PFEFFER, Anna et al. Behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD) and impaired cognition reflect unsuccessful neuronal compensation in the pre-plaque stage and serve as early markers for Alzheimer's disease in the APP23 mouse model. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v. 347, p. 300–313, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432817319782>>

REYNOLDS, Clare M. et al. Maternal high fat and/or salt consumption induces sex-specific inflammatory and nutrient transport in the rat placenta. **Physiological Reports**, [on-line], v. 3,

n. 5, p. e12399, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25991721>>

RICE, D.; BARONE JR, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, [on-line], v. 108, Suppl. n. 3, p. 511–533, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10852851>>

ROLLINS, Colleen P. E. et al. Contributions of a high-fat diet to Alzheimer's disease-related decline: A longitudinal behavioural and structural neuroimaging study in mouse models. **NeuroImage: Clinical**, [on-line], v. 21, p. 101606, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213158218303541>>

ROSSI DARE, Leticia et al. Physical and cognitive training are able to prevent recognition memory deficits related to amyloid beta neurotoxicity. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v. 365, p. 190–197, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432818316681>>

RUDOLPH, Marc D. et al. Maternal IL-6 during pregnancy can be estimated from newborn brain connectivity and predicts future working memory in offspring. **Nature Neuroscience**, [on-line], v. 21, n. 5, p. 765–772, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41593-018-0128-y>>

SABEN, Jessica et al. Early growth response protein-1 mediates lipotoxicity-associated placental inflammation: role in maternal obesity. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, [on-line], v. 305, n. 1, p. E1–E14, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23632636>>

SAKAGUCHI, Yukitoshi; SAKURAI, Yoshio. Left-right functional difference of the rat dorsal hippocampus for short-term memory and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v. 382, n. July 2019, p. 112478, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112478>>

SAUNDERS, Norman R. et al. The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. **Frontiers in Neuroscience**, [on-line], v. 8, p. 404, 2014. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2014.00404>>

SCHEJA, Ludger; HEEREN, Joerg. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. **Nature Reviews Endocrinology**, [on-line], v. 15, n. 9, p. 507–524, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41574-019-0230-6>>

SEELEY, John J.; GHOSH, Sankar. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. **Journal of Leukocyte Biology**, [on-line], v. 101, n. 1, p. 107–119, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0316-118RR>>

SEMPLE, Bridgette D. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in Neurobiology**, [on-line], v. 106–107, p. 1–16, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583307>>

SHEEDY, Frederick J. et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. **Nature Immunology**, [on-line], v. 11, n. 2, p. 141–147, 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ni.1828>>

SHEEDY, Frederick J. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. **Frontiers in Immunology**, [on-line], v. 6, p. 19, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310327/>>

SHIPTON, Olivia A. et al. Left-right dissociation of hippocampal memory processes in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [on-line], v. 111, n. 42, p. 15238–15243, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25246561/>>

SOCH, Alita et al. Effects of exercise on adolescent and adult hypothalamic and hippocampal neuroinflammation. **Hippocampus**, [on-line], v. 26, n. 11, p. 1435–1446, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27438996/>>

SOSA-CASTILLO, Elizabeth; RODRÍGUEZ-CRUZ, Maricela; MOLTÓ-PUIGMARTÍ, Carolina. Genomics of lactation: role of nutrigenomics and nutrigenetics in the fatty acid composition of human milk. **British Journal of Nutrition**, [on-line], v.118, n. 3, p. 161–168, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28831952/>>

SPENCER, S. J.; FIELD, E.; PITTMAN, Q. J. Neonatal programming by neuroimmune challenge: effects on responses and tolerance to septic doses of lipopolysaccharide in adult male and female rats. **Journal of Neuroendocrinology**, [on-line], v. 22, n. 4, p. 272–281, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20136690/>>

SPENCER, S. J.; GALIC, M. A.; PITTMAN, Q. J. Neonatal programming of innate immune function. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, [on-line], v. 300, n. 1, p. E11-8, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3524264/>>

SPENCER, Sarah J. et al. Food for thought: how nutrition impacts cognition and emotion. **npj Science of Food**, [on-line], v. 1, n. 1, p. 7, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41538-017-0008-y>>

SPENCER, Sarah J. Perinatal programming by inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 63, p. 1–7, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159117300491?via%3Dihub>>

STONE, Vinícius et al. Gestational caloric restriction improves redox homeostasis parameters in the brain of Wistar rats: a screening from birth to adulthood. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [on-line], v. 67, p. 138–148, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286318306211>>

STRALEY, Megan E. et al. Distinct alterations in motor & reward seeking behavior are dependent on the gestational age of exposure to LPS-induced maternal immune activation. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 63, p. 21–34, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159116301519>>

SULLIVAN, Elinor L. et al. Maternal high-fat diet programming of the neuroendocrine system and behavior. **Hormones and Behavior**, [on-line], v. 76, p. 153–161, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0018506X15000586>>

TCHESSALOVA, Daria; POSILLICO, Caitlin Kelly; TRONSON, Natalie Celia. Neuroimmune Activation Drives Multiple Brain States. **Frontiers in Systems Neuroscience**,

[*on-line*], v. 12, n. 39, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnsys.2018.00039>>

TEGELER, Christina et al. The inflammatory markers CRP, IL-6, and IL-10 are associated with cognitive function—data from the Berlin Aging Study II. **Neurobiology of Aging**, [*on-line*], v. 38, p. 112–117, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0197458015005515>>

TEIXEIRA, Amanda ESCOBAR et al. Cafeteria diet administered from lactation to adulthood promotes a change in risperidone sensitivity on anxiety, locomotion, memory, and social interaction of Wistar rats. **Physiology & Behavior**, [*on-line*], v. 220, p. 112874, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938420301918>>

THOMPSON, Jacqueline R. et al. Maternal Diet, Metabolic State, and Inflammatory Response Exert Unique and Long-Lasting Influences on Offspring Behavior in Non-Human Primates. **Frontiers in Endocrinology**, [*on-line*], v. 9, n. 161, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00161>>

TINSLEY, Chris J. et al. Differing time dependencies of object recognition memory impairments produced by nicotinic and muscarinic cholinergic antagonism in perirhinal cortex. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, [*on-line*], v. 18, n. 7, p. 484–492, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3125612/>>

TOZUKA, Yusuke et al. Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. **Neurochemistry International**, [*on-line*], v. 57, n. 3, p. 235–247, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0197018610001841>>

TURNER, Ryan C. et al. Single low-dose lipopolysaccharide preconditioning: neuroprotective against axonal injury and modulates glial cells. **Neuroimmunology and Neuroinflammation**, [*on-line*], v. 4, p. 6–15, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28164149>>

TUSCHER, Jennifer J. et al. Chemogenetic inactivation of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex, individually and concurrently, impairs object recognition and spatial memory consolidation in female mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, [*on-line*], v. 156, p. 103–116, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074742718302570>>

ULRICH, Kathrin; JAKOB, Ursula. The role of thiols in antioxidant systems. **Free Radical Biology and Medicine**, [*on-line*], v. 140, n. 20, p. 14–27, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584918325425>>

VARGAS-ALARCÓN, Gilberto et al. Association of interleukin-10 polymorphisms with risk factors of Alzheimer's disease and other dementias (SADEM study). **Immunology Letters**, [*on-line*], v. 177, p. 47–52, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165247816301262>>

VENEZIA, Serena et al. Toll-like receptor 4 stimulation with monophosphoryl lipid A ameliorates motor deficits and nigral neurodegeneration triggered by extraneuronal α -synucleinopathy. **Molecular Neurodegeneration**, [*on-line*], v. 12, n. 1, p. 52, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13024-017-0195-7>>

VERGADI, Eleni; VAPORIDI, Katerina; TSATSANIS, Christos. Regulation of Endotoxin Tolerance and Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome by Non-coding RNAs. **Frontiers in Immunology**, [on-line], v. 9, p. 2705, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30515175>>

WANG, Zhe et al. Lipopolysaccharide preconditioning increased the level of regulatory B cells in the spleen after acute ischaemia/reperfusion in mice. **Brain Research**, [on-line], v. 1701, p. 46–57, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006899318302932>>

WANG, Zhengjun et al. Impairment of Long-term Memory by a Short-term High-fat Diet via Hippocampal Oxidative Stress and Alterations in Synaptic Plasticity. **Neuroscience**, [on-line], v. 424, p. 24–33, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452219307493>>

WARBURTON, E. C.; BROWN, M. W. Neural circuitry for rat recognition memory. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v. 285, p. 131–139, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.050>>

WINTHER, Gudrun et al. Maternal High-fat Diet Programs Offspring Emotional Behavior in Adulthood. **Neuroscience**, [on-line], v. 388, p. 87–101, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452218304895>>

XIU, Mei Hong et al. Contribution of IL-10 and its -592 A/C polymorphism to cognitive functions in first-episode drug-naive schizophrenia. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 57, p. 116–124, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159116300502>>

ZHANG, Zhenmei; LIU, Hui; CHOI, Seung-won. Early-life socioeconomic status, adolescent cognitive ability, and cognition in late midlife: Evidence from the Wisconsin Longitudinal Study. **Social Science & Medicine**, [on-line], v. 244, p. 112575, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0277953619305696>>

CAPÍTULO 2

A tolerância ao LPS previne comportamento tipo-ansiedade e inflamação na amígdala da prole adolescentes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica

1 INTRODUÇÃO

A ansiedade pode ser definida como um estado de alta excitação e valência negativa, sendo caracterizada por uma vigilância intensificada, mesmo sem a presença imediata de uma ameaça (CALHOON; TYE, 2015). Os transtornos de ansiedade vêm aumentando na sociedade moderna, e, hoje, já são classificados como uma das principais causas de doenças mentais em todo o mundo (EVANS-LACKO et al., 2018; RUSCIO et al., 2017). Embora possua alta prevalência em todas as faixas etárias, sua ocorrência tem aumentado em indivíduos jovens. Estima-se que os transtornos de ansiedade respondam por até 5,8% dos anos de vida ajustados por incapacidade entre adolescentes de 15 a 19 anos (MOKDAD et al. 2016).

O desenvolvimento dos transtornos de ansiedade na infância e adolescência pode estar ligado a processos inflamatórios nas fases iniciais da vida (BAKER et al., 2017; GRAHAM et al., 2016, 2018a, 2019; QIN et al., 2014; SPENCER, 2017). Estudos com roedores indicam que existe uma forte correlação entre a dieta hiperlipídica materna durante a gestação e/ou lactação e a indução de neuroinflamação na prole (CORDNER et al., 2019; DIAS-ROCHA et al., 2018; GLENDINING; FISHER; JASONI, 2018; GRAF et al., 2016; LEMES et al., 2018). Destaca-se ainda que quando essa inflamação ocorre na amígdala (KANG et al., 2014; SASAKI et al., 2013, 2014; SMITH et al., 2020; WIJENAYAKE et al., 2020) podem existir consequências nos comportamentos do tipo-ansiedade na prole (KANG et al., 2014; SASAKI et al., 2013, 2014; SMITH et al., 2020).

O consumo de dietas hiperlipídicas durante a gestação e/ou lactação pode também impactar nas funções do eixo HPA na prole. Este eixo torna-se totalmente desenvolvido por volta da segunda semana de vida em roedores, e está envolvido na regulação das respostas de ansiedade e estresse por meio da liberação final de corticosterona na corrente sanguínea (SOCH; SPENCER, 2020). Ademais, a corticosterona também desempenha um papel no controle da inflamação, via atenuação da resposta do NF- κ B e redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (SOCH; SPENCER, 2020; URBACH-ROSS; KUSNECOV, 2007). Estudos anteriores já demonstraram que dietas maternas hiperlipídicas podem levar à hipertrofia das glândulas adrenais (BOULLU-CIOCCA et al., 2005), aumentando a liberação de corticosterona (NIU et al., 2019; SASAKI et al., 2013; ZINKHAN et al., 2018), características marcantes da hiperatividade do eixo HPA.

A neuroinflamação da prole também pode ser originada devido à uma ativação imune materna (AIM). A AIM é usada em modelos animais com objetivo de simular uma infecção materna, através da administração de um agonista dos TLR, como o LPS (KENTNER et al., 2019). A aplicação de LPS em modelos de AIM é capaz de promover comportamentos tipo-ansiedade na prole (BABRI; DOOSTI; SALARI, 2014; LI et al., 2018; STRALEY et al., 2017; TELLEZ-MERLO et al., 2019), inflamação da amígdala (LI et al., 2018; O'LOUGHLIN et al., 2017) e disfunções no eixo HPA (BABRI; DOOSTI; SALARI, 2014; ZHAO et al., 2020). Porém, a AIM pode ser utilizada através da aplicação de baixas e consecutivas doses de endotoxina, um efeito chamado de pré-condicionamento ou tolerância ao LPS (SEELEY; GHOSH, 2017).

A tolerância ao LPS é capaz de atenuar uma resposta inflamatória subsequente, através de um mecanismo de hiporresponsividade, produzindo um efeito protetor no comportamento do roedor (BAKUNINA; PARIANTE; ZUNSZAIN, 2015; BANASIKOWSKI et al., 2015; SEELEY; GHOSH, 2017; SPENCER; FIELD; PITTMAN, 2010). Estudos demonstram que esse efeito da reexposição ao LPS pode promover também uma tolerância cruzada em relação a outros estímulos inflamatórios (AMINI et al., 2018; HE et al., 2014; KUMAR; ADHIKARI, 2017; TURNER et al., 2017; WANG et al., 2018), incluindo a inflamação induzida na prole pela dieta materna hiperlipídica durante as fases de gestação e lactação (HUANG et al., 2015). De forma semelhante, a tolerância ao LPS induz uma maior expressão das vias antioxidantes, o que pode contribuir para melhora de processos inflamatórios, ao reduzir a carga de espécies reativas na célula (BORDET et al., 2000; LI et al., 2016). No entanto, estudos que avaliem a capacidade da reexposição ao LPS em promover tolerância cruzada frente a inflamação causada por uma dieta materna ainda são escassos.

Portanto, o principal questionamento deste capítulo seria qual o papel exercido pela tolerância ao LPS na resposta inflamatória e estado redox da amígdala, e nos comportamentos tipo-ansiedade na prole adolescente de mães que receberam dieta hiperlipídica. A hipótese levantada é que a tolerância ao LPS poderia resultar na atenuação da inflamação e melhora no estado redox, culminando com uma não-alteração nos comportamentos do tipo-ansiedade, diferentemente do que aconteceria na prole das mães que receberam apenas a dieta hiperlipídica.

2 OBJETIVOS

Avaliar o efeito protetor da tolerância ao LPS sobre os parâmetros neuroinflamatórios, estado redox e comportamento tipo-ansiedade na prole adolescente de ratas Wistar tratadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação.

2.1 Objetivos específicos

1. Analisar o perfil inflamatório (citocinas pró e anti-inflamatórias) na amígdala da prole;
2. Analisar o estado redox (marcadores do estresse oxidativo e da atividade antioxidante) na amígdala da prole;
3. Analisar os níveis de corticosterona sanguíneos;
4. Avaliar o comportamento da prole em relação aos testes de ansiedade (campo aberto, claro-escuro, labirinto em cruz elevado) e desempenho motor (rotarod).

3 METODOLOGIA

3.1 Animais e desenho experimental

O manuseio e a eutanásia dos animais ocorreram de acordo com os princípios éticos para uso de animais de laboratório (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA, 2016). Previamente, o projeto obteve aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFVJM) sob o protocolo 024/17 (ANEXO I). Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), provenientes do LabNutrex/UFVJM, alojados em condições padrões.

Ratas Wistar fêmeas nulíparas foram colocadas no início do ciclo escuro em gaiolas com a presença de ratos machos Wistar virgens para acasalamento. Após a confirmação de cópula (presença de esperma ou *plug* vaginal), as fêmeas eram destinadas ao alojamento isolado nas gaiolas (dia zero da gravidez – G0). Nesse momento, as fêmeas receberam dietas distintas, compondo os grupos:

- Controle – os animais receberam dieta padrão (ração Nuvilab[®] CR-1) e água *ad libitum* (n = 20);
- Hiperlipídico – os animais receberam dieta padrão (ração Nuvilab[®] CR-1) acrescida de banha de porco (Sadia[®]) e água *ad libitum* (n = 20).

A dieta hiperlipídica era composta de ração (Nuvilab[®]) moída e banha de porco (Sadia[®]) derretida. A dieta hiperlipídica possuía 4,55 kcal/g (45,0% de gorduras; 50,0% de carboidratos; 15,0% de proteínas) enquanto que a dieta padrão continha 3,66 kcal/g (17,5% de gorduras; 60,0% carboidratos; 22,5% de proteínas) (HASEBE et al., 2019; LIANG et al., 2019).

As dietas foram ofertadas durante 21 dias de gestação (G0 – G21) e 21 dias de lactação (L0 – L21). Durante os dias 8, 10 e 12 da gestação (G8, G10 e G12), as ratas-mães foram subdivididas aleatoriamente para receberem por via intraperitoneal os tratamentos: veículo (salina – NaCl 0,8%) ou LPS (0,1mg.kg⁻¹), ambos em volume de 1,0ml.kg⁻¹ (HUANG et al., 2015). No nascimento dos animais, para minimizar os fatores genéticos, filhotes nascidos no mesmo dia eram misturados e distribuídos aleatoriamente entre as ninhadas (8 filhotes por ninhada – 6 machos e 2 fêmeas). Após o desmame, a prole (machos) recebeu até o

50º dia de vida (pós-natal 50; PN50) dieta padrão e água *ad libitum*, sendo classificada nos grupos:

- **Controle** – filhotes machos das mães que receberam dieta padrão (Nuvilab[®]) e aplicação intraperitoneal de salina (n = 60);
- **Lipopolissacarídeo (LPS)** – filhotes machos das mães que receberam dieta padrão (Nuvilab[®]) e aplicação intraperitoneal de LPS (n = 60);
- **Hiperlipídica (HP)** – filhotes machos das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina (n = 60);
- **Lipopolissacarídeo + Hiperlipídica (LPS+HP)** – filhotes machos das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS (n = 60).

Informações mais detalhadas sobre o desenho experimental proposto podem ser revistas no Capítulo 1. Para este capítulo, apenas uma parte do quantitativo total de cada grupo listado foi utilizado, de forma a se obter um número de animais suficiente para realização dos testes de ansiedade e desempenho motor, além das análises de inflamação e estado redox na amígdala. Importante frisar que, em cada teste descrito abaixo, foram aleatoriamente escolhidos entre dois a três animais de cada ninhada.

Portanto, entre o 42º e o 49º dia pós-natal (PN42 a PN49), a prole adolescente realizou os testes comportamentais (campo aberto, claro-escuro, labirinto em cruz elevado e rotarod). Esses animais foram eutanasiados no PN50 (n = 24).

3.2 Testes comportamentais

Todos os testes comportamentais foram realizados por um único experimentador na sala de comportamento do LabNutrex. A sala conta com a presença de um exaustor e lâmpada fluorescente no teto (iluminação de 130 lux). Todos os procedimentos descritos foram realizados pela manhã (07:00 às 12:00 horas), em duplo cego, com a realização de filmagens por uma câmera (Sony[®] Handycam) acoplada ao teto da sala, para posterior análise por dois pesquisadores experientes.

Os filhotes machos realizaram os testes comportamentais entre o PN42 e o PN49, sendo escolhidos de forma aleatória para cada teste, mas, levando em consideração que 2-3 animais de cada ninhada poderiam executar um mesmo teste. Uma semana antes, todos os

animais passaram por um procedimento de *handling*, que foi executado durante os sete dias, uma única vez ao dia, durante um minuto. Ademais, cada animal foi levado à sala de comportamento com uma antecedência de 20 minutos antes do início do teste, para aclimatização.

3.2.1 Campo Aberto (CA)

O Campo Aberto consiste em uma arena retangular, utilizada para avaliação da atividade locomotora/exploratória. Essa atividade é estimada através da área percorrida pelos animais, que pode ser medida em centímetros ou pela contagem dos quadrantes atravessados. Esse teste também pode ser utilizado para avaliação de comportamentos do tipo-ansiedade, devido à exposição do animal a um ambiente aberto e novo (MONTGOMERY, 1955). O aparato utilizado consiste em uma caixa de madeira (70 x 70 x 50 cm), com paredes laterais e o fundo (assoalho) na cor cinza claro, contendo a marcação de 16 quadrantes (cada qual com 17,5 x 17,5 cm), como ilustrado na Figura 1.

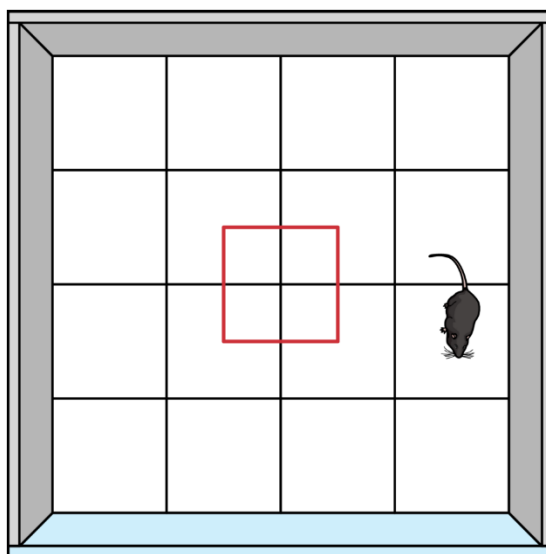


FIGURA 1 – Representação da arena de Campo Aberto. Cada animal foi colocado no centro da arena (demarcação vermelha) e filmado seus movimentos por 5 minutos.

O procedimento foi realizado de acordo com o que foi descrito por Teixeira et al. (2020). Cada animal foi colocado no centro da arena do CA e seu comportamento filmado durante 5 minutos. Ao término de cada teste, a arena foi limpa com etanol 70°. As variáveis observadas foram: frequência de entradas na zona central (definida quando o animal inseria as quatro patas na zona central); tempo gasto na zona central (tempo gasto no centro/tempo total

de teste); distância percorrida (em quadrantes); latência para primeira saída da zona central; e a frequência de *rearing* e *grooming* (GUEDINE et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2020).

3.2.2 Teste de transição claro-escuro

O teste de transição claro-escuro se baseia no conflito do roedor entre a exploração a um ambiente novo e a entrada/permanência em uma zona aberta e iluminada. Preferencialmente, os roedores tendem a permanecer uma quantidade maior de tempo na zona escura, sendo que, aqueles que frequentam mais a zona clara podem ser classificados com baixos níveis de comportamento do tipo-ansioso (BOURIN; HASCOËT, 2003).

O aparato é constituído de duas zonas no formato de dois quadrados (30 x 30 cm). A primeira é chamada de zona clara, e é caracterizada por possuir as paredes e o assoalho na cor branca, além de uma lâmpada incandescente (halógena-amarela) em sua lateral. A segunda tem as paredes e o assoalho na cor preta, com uma lâmpada de luz vermelha em sua lateral. As duas zonas são conectadas por uma porta retangular com altura de 10 cm (FIGURA 2).



FIGURA 2 – Representação do Teste de transição claro-escuro. Cada animal foi colocado no centro da zona clara com a cabeça voltada para a porta que conectava as duas zonas. Os movimentos de cada animal foram filmados por 5 minutos.

O procedimento seguiu o que foi descrito por Dempsey et al. (2019). Cada animal foi colocado na zona clara com a cabeça voltada para a porta que conecta as duas zonas, sendo seus movimentos filmados por 5 minutos. Entre cada animal, o aparato era limpo com etanol 70°. Foram avaliados: frequência de entradas e o tempo de permanência em na zona clara; a latência para a primeira saída da zona clara; além da frequência de *rearing* e *grooming*. Ademais a frequência de *head poke* (definido como a emersão de toda a cabeça do animal na

zona clara) após a primeira entrada na câmara escura, também foi avaliada (ROJAS et al., 2016).

3.2.3 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O Labirinto em Cruz Elevado é um modelo baseado no medo característico de roedores a espaços abertos e/ou altos. Quando os roedores são expostos ao aparato, há um paradigma entre a tendência em explorar o espaço novo e a sua aversão a esse tipo de ambiente, sendo este um modelo clássico para avaliação de ansiedade (PELLOW et al., 1985). O LCE consiste em um aparato, confeccionado em madeira, com dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) perpendiculares a dois braços abertos (50 x 10 cm) e uma área central (10 x 10 cm). Os quatro braços estão elevados a 50 cm de altura do piso da sala. Além disso, cada braço aberto possui em suas laterais dois apoios de acrílico (1 cm), para evitar possíveis quedas dos animais (FIGURA 3).

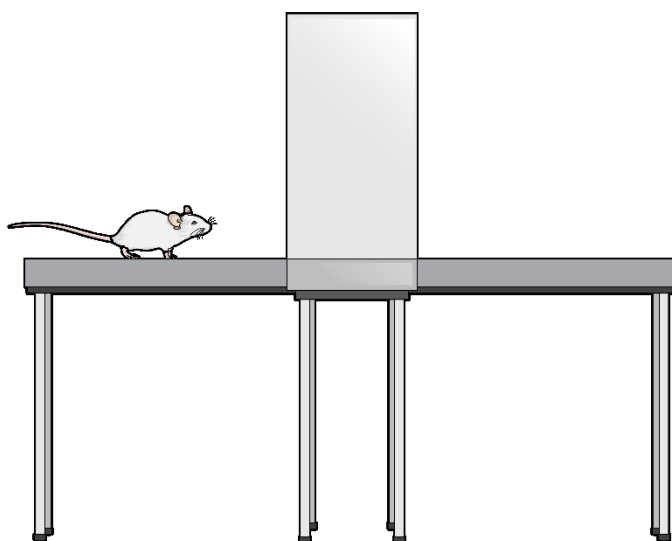


FIGURA 3 – Representação do Labirinto em Cruz Elevado. Cada animal foi colocado no centro do labirinto e seus movimentos filmados por 5 minutos.

O procedimento seguiu o descrito por Teixeira et al. (2020). Cada rato foi colocado na área central do LCE com a cabeça voltada para um dos braços fechados. O animal permaneceu isolado na sala de comportamento do LabNutrex e seus movimentos no aparato foram filmados por 5 minutos. Ao término de cada teste, o LCE foi limpo com etanol 70° para

evitar a presença de sinais olfativos. Foram avaliados o número de entradas (caracterizada quando o animal entrava com as quatro patas) em cada braço (fechado ou aberto), e o tempo de permanência neles. Além disso, foram observadas: a frequência de idas e o tempo gasto no final dos braços abertos (GUEDINE et al., 2018); a frequência de “mergulhos” (*head dipping*); falsas entradas; *rearing* e *grooming* (GUEDINE et al., 2018; RIUL; ALMEIDA, 2020).

3.2.4 Rotarod

O rotarod é um equipamento de desempenho motor/treinamento físico composto por quatro baias separadas por paredes laterais. Em cada baia existe um eixo suspenso controlado por um motor que gira a velocidades determinadas pelo experimentador. Esse teste é utilizado com o intuito de avaliar tanto o desempenho motor de um roedor, como também a aprendizagem a uma tarefa que envolve primariamente esforço físico. A aprendizagem é medida através da progressão que o animal demonstra durante as várias e subsequentes seções de treino, ao se manter equilibrado e em movimento em cima do eixo, tendendo a apresentar sempre uma latência de queda maior a cada tentativa. Por sua vez, o desempenho motor é avaliado através da latência para a queda no último dia, após concluídas todas as seções de treino (LUH; DAS; BERTOLOTTI, 2017).

O rotarod utilizado possuía 4 baias e uma velocidade que ia de 8 a 48 rotações por minuto (rpm). O protocolo utilizado neste experimento foi descrito previamente por Luh, Das e Bertolotti (2017). Inicialmente, cada animal era colocado por 1 minuto sob o eixo sem rotação (fase de habituação), sendo essa etapa repetida mais duas vezes em intervalos de 10 minutos. Após uma hora da fase de habituação, cada animal era colocado sob o eixo em uma velocidade inicial de 8 rpm, que subia de forma constante até atingir 48 rpm, com um teto de tempo para o teste de 5 minutos (48 rpm era atingido por volta de 4 minutos), sendo registrada a latência para a primeira queda do animal. Esse procedimento era caracterizado como a fase de aprendizado, sendo realizadas 3 tentativas ao dia (15 minutos de intervalo entre cada tentativa), durante 3 dias consecutivos, totalizando 9 tentativas de aprendizado. No quarto dia, também chamado de fase teste, o mesmo procedimento realizado na fase de treinos era repetido (3 tentativas de 5 minutos a cada 15 minutos), sendo computada mais uma vez a latência para a primeira queda (FIGURA 4).

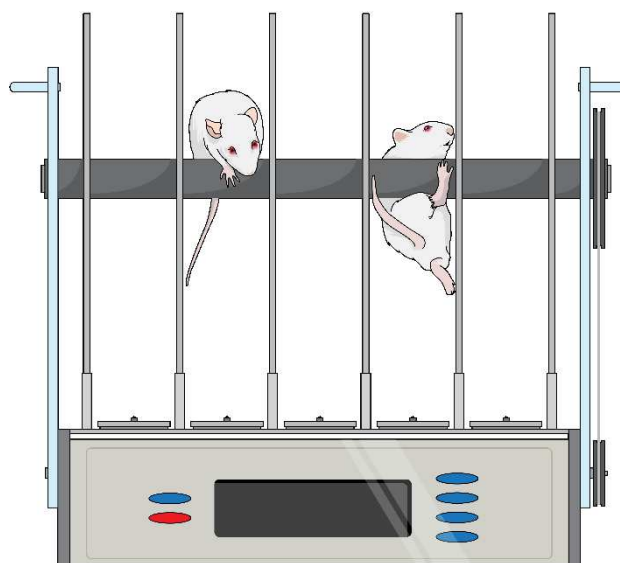


FIGURA 4 – Representação do Rotarod. A latência para a primeira queda foi registrada durante a fase de aprendizados (9 tentativas realizadas em 3 dias consecutivos), e durante a fase teste (3 tentativas realizadas no dia seguinte à finalização dos treinos). Cada tentativa tinha duração máxima de 5 minutos.

3.3 Eutanásia e análises bioquímicas

Os animais foram decapitados no dia PN50 no período da tarde (14:00 às 18:00 horas). No momento da decapitação, o sangue foi coletado a partir do tronco para análise de corticosterona. O encéfalo foi rapidamente retirado (aproximadamente 1 minuto) e colocado em uma solução gelada (4°C) de PBS. Após esse procedimento, a amígdala e as suprarrenais foram dissecadas e lavadas em PBS e solução salina, respectivamente. As suprarrenais foram pesadas em balança analítica (precisão de 0,001g) e calculado o peso relativo (ESCOBAR et al., 2019). As amígdalas foram imediatamente armazenadas em eppendorf, e levadas ao ultra freezer (-80°C). Aproximadamente metade das amígdalas retiradas foram destinadas à avaliação do perfil inflamatório, enquanto a outra metade foi utilizada para determinar o estado redox.

3.3.1 Estado redox

As amostras foram homogeneizadas em PBS gelado (50mM; pH 7,0; 4°C) e centrifugadas sob refrigeração (4°C) a 750g por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado para analisar as enzimas antioxidantes (SOD; GST; e catalase – CAT); a capacidade

antioxidante total não-enzimática (FRAP); e o índice de peroxidação lipídica (TBARS) (FREITAS et al., 2018; MELO et al., 2019). Todas as avaliações do estado redox foram corrigidas de acordo com o total de proteína nas amostras pelo método de Bradford (1976). As análises de FRAP, SOD, GST e TBARS foram realizadas de acordo com o que foi descrito no Capítulo 1.

A atividade da CAT foi avaliada através da metabolização do peróxido de hidrogênio (NELSON; KIESOW, 1972). Para realização desse ensaio, foi adicionado 5 μ L de peróxido de hidrogênio (0,3M) à uma solução contendo tampão fosfato de potássio (50mM; pH 7,0; 25°C) e 30 μ L de amostra. As leituras eram realizadas em leitor de microplacas a cada 15 segundos durante 1 minuto (à 25°C). A atividade da catalase foi expressa em $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (FREITAS et al., 2018; MELO et al., 2019).

3.3.2 Perfil inflamatório: análise de citocinas

Foram realizadas as análises de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β ; IL-6; eTNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) pela técnica de ELISA. Primeiramente, as amostras foram homogenizadas juntamente com solução de extração, centrifugadas sob refrigeração (4°C) a 2714 g por 10 minutos, e o sobrenadante recolhido, aliquoteado e estocado a -80°C. Além disso, no presente capítulo, as razões IL-6/IL-10 e TNF- α /IL-10 foram calculadas e classificadas como marcadores pró-inflamatórios (PARENT-ROBERGE et al., 2020).

3.3.3 Dosagem de corticosterona

A corticosterona foi avaliada somente no sangue dos animais PN50 pela técnica de ELISA. Primeiramente, o sangue obtido do tronco no momento da decapitação dos animais foi processado em centrífuga (3500 rpm por 10 minutos) para separação do soro e plasma. Para a dosagem de corticosterona foi utilizado o soro dos animais, de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems®, Minneapolis, EUA). As amostras foram adicionadas à placa de 96 poços contendo anticorpo específico para o analito em questão, com a inclusão também de um diluente (RD1-123), e incubadas durante 2 horas sob agitação. Posteriormente, os poços foram aspirados e lavados com uma solução de lavagem por 4 vezes. O conjugado foi então adicionado a cada placa, e nova incubação foi realizada por um período de 1 hora sob agitação, seguido de novo procedimento de lavagem. Por fim, foram

acrescentados a solução contendo o substrato (seguida de incubação a 30 minutos protegido da luz) e a solução *stop*.

3.4 Análise estatística

Para análise estatística e elaboração dos gráficos foram utilizados os *softwares* Statistica[®] (versão 10.0) e GraphPad Prism[®] (versão 7.0), respectivamente. O *software* G*Power (versão 3.1.9.2) foi usado para a análise de potência (α err prob = 0,05). A normalidade da amostra foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos a ANOVA (duas vias; fatores dieta e tratamento) e o teste de Newman-Keuls quando apropriado ($p < 0,05$). No teste rotarod, foi utilizada a ANOVA de medidas repetidas, com o fator tentativas adicionado (seis tentativas durante a fase de aprendizagem; 3 tentativas durante a fase de teste). Dados não-paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn. Os resultados foram representados como média e desvio padrão da média (DPM).

4 RESULTADOS

4.1 Testes comportamentais

A frequência de entradas na zona central do CA demonstrou diferenças significativas nos fatores: dieta ($F_{(1, 43)} = 6,13, p < 0,05$; power: 1,00); e interação dieta e tratamento ($F_{(1, 43)} = 5,16, p < 0,05$; power: 1,00). A prole das mães de dieta hiperlipídica entrou menos na zona central ($p < 0,05$) do que a prole de dieta padrão. Na interação dieta e tratamento, os grupos HP ($p < 0,01$) e LPS ($p < 0,05$) entraram menos na zona central comparados ao grupo Controle (FIGURA 5A).

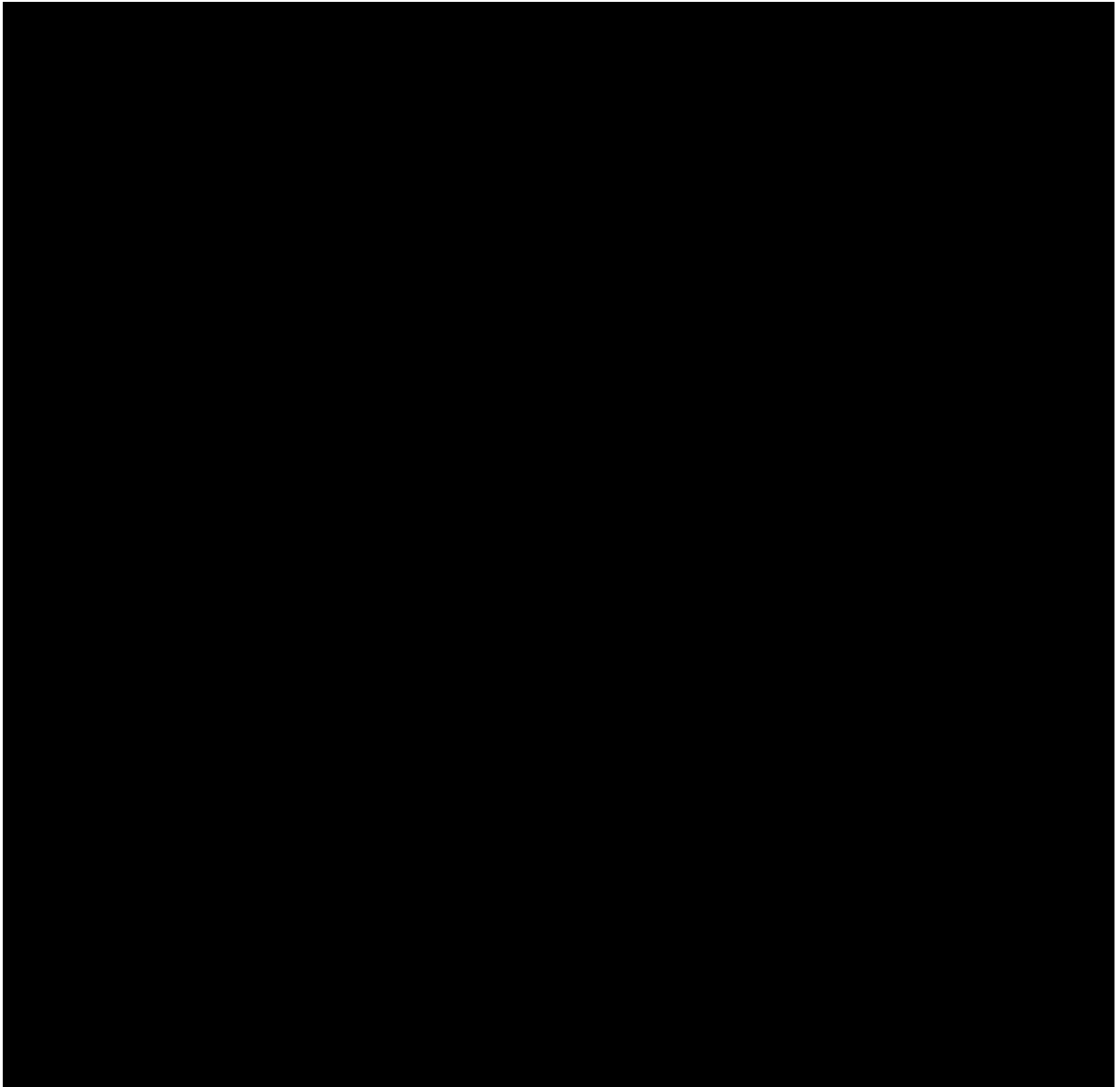


FIGURA 5 – Frequência de entradas (A) e tempo de permanência na zona central (B); além da distância percorrida (C) no teste de Campo Aberto. Legenda: Controle – prole das mães

que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através da média e DPM. $n = 11-12$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (interação dieta x tratamento); # $p < 0,05$ (fator dieta) usando a ANOVA e o teste de Newman Keuls.

Para o tempo gasto na zona central, diferenças significativas foram reportadas para os fatores dieta ($F_{(1, 43)} = 4,52$, $p < 0,05$; power: 1,00); e interação dieta e tratamento ($F_{(1, 43)} = 5,70$, $p < 0,05$; power: 1,00). A prole das mães que receberam dieta hiperlipídica permaneceu um menor tempo na zona central do CA ($p < 0,05$) comparado com a prole de dieta padrão. Além disso, o grupo HP demonstrou um menor tempo de permanência ($p < 0,05$) nessa zona comparado com o grupo Controle (FIGURA 5B).

Em relação à distância total percorrida no CA, diferença significativa foi observada na interação dos fatores dieta e tratamento ($F_{(1, 43)} = 10.60$, $p < 0.01$; power: 1.00). O grupo HP demonstrou menor locomoção na arena em comparação com os grupos LPS+HP ($p < 0,05$) e Controle ($p < 0,05$) (FIGURA 5C).

Os outros comportamentos observados durante o teste de CA estão descritos na Tabela 1. Uma diferença significativa foi encontrada em relação ao fator dieta ($F_{(1, 43)} = 12.05$, $p < 0,01$; power: 1,00) na latência para a primeira saída da zona central do CA. A prole das mães que receberam dieta hiperlipídica demorou mais tempo para sair da zona central em comparação com a prole das mães de dieta padrão. Além disso, foi encontrada também uma diferença significativa na interação entre dieta e tratamento ($F_{(1, 43)} = 2,07$, $p < 0,05$; power: 1,00). O grupo HP demonstrou menor latência para sair do centro em relação aos grupos LPS, LPS+HP e Controle.

TABELA 1 – Outros comportamentos avaliados no teste de Campo aberto

Avaliação	Grupos				Análise estatística		
	Controle	LPS	HP	LPS+HP	Dieta	Tratamento	Dieta x Tratamento
Latência (s)	4,42 ± 0,29 ^a	3,92 ± 0,85 ^a	1,72 ± 0,37 ^b	2,80 ± 0,45 ^a	$p < 0,01$	$p = 0,60$	$p < 0,05$
Rearing	24,23 ± 1,94 ^a	24,31 ± 2,55 ^a	22,73 ± 2,81 ^a	26,92 ± 2,45 ^a	$p = 0,82$	$p = 0,39$	$p = 0,40$
Grooming	1,61 ± 0,27 ^a	1,77 ± 0,34 ^a	3,00 ± 0,47 ^a	2,08 ± 0,55 ^a	$p = 0,05$	$p = 0,36$	$p = 0,20$

Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina;

LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através da média e DPM. $n = 11-12$. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos (fator dieta x tratamento) pela ANOVA e teste de Newman-Keuls.

No teste de transição claro-escuro, em relação à frequência de entradas na zona clara, foram reportadas diferenças significativas no fator tratamento ($F_{(1, 41)} = 10,64, p < 0,01$; power: 1,00); e na interação dieta e tratamento ($F_{(1, 41)} = 1,14, p < 0,05$; power: 1,00). A prole das mães que receberam o tratamento com LPS demonstrou menor frequência de entradas nessa zona ($p < 0,01$) em comparação com a prole das mães que receberam salina. Além disso, o grupo LPS demonstrou menor número de entradas na zona clara em relação aos grupos HP ($p < 0,05$) e Controle ($p < 0,05$) (FIGURA 6A).

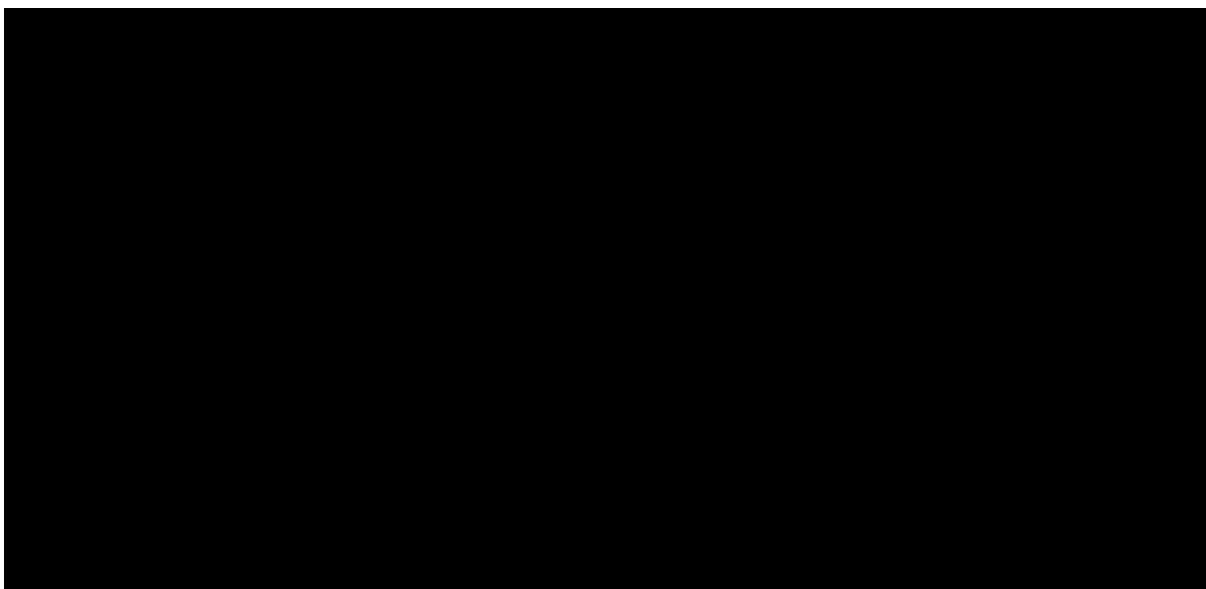


FIGURA 6 – Frequência de entradas (A) e tempo de permanência na zona clara (B) no teste de transição claro-escuro. Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através da média e DPM. $n = 10-12$; * $p < 0,05$ (interação dieta x tratamento); ‡ $p < 0,05$ (fator tratamento) usando a ANOVA e o teste de Newman Keuls.

Resultados similares foram encontradas no tempo de permanência na zona clara, com diferenças significativas sendo reportadas para os fatores tratamento ($F_{(1, 41)} = 11,61, p < 0,01$; power: 1,00); e interação dieta e tratamento ($F_{(1, 41)} = 1,56, p < 0,05$; power: 1,00). A prole das mães que receberam aplicação de LPS demonstrou menor tempo de permanência nessa zona ($p < 0,01$) em relação aos grupos que receberam salina. Ademais, o grupo LPS apresentou

menor tempo gasto na zona clara em comparação com os grupos HP ($p < 0,05$) e Controle ($p < 0,05$) (FIGURA 2B).

Não foi observada nenhuma diferença em relação à latência para saída da zona clara, frequência de *rearing* e *grooming* (independentemente se era executado na zona clara ou na escura) e número de *head poke*. Esses dados estão demonstrados na Tabela 2.

TABELA 2 – Outros comportamentos avaliados no teste de transição claro-escuro

Avaliação	Grupos				Análise estatística		
	Controle	LPS	HP	LPS+HP	Dieta	Tratamento	Dieta x Tratamento
Latência (s)	13,38 ± 4,03 ^a	27,02 ± 8,80 ^a	19,71 ± 4,00 ^a	14,99 ± 5,83 ^a	$p = 0,38$	$p = 0,51$	$p = 0,36$
Rearing (zona clara)	7,55 ± 2,49 ^a	5,33 ± 2,12 ^a	7,75 ± 1,54 ^a	4,83 ± 1,85 ^a	$p = 0,94$	$p = 0,24$	$p = 0,87$
Rearing (zona escura)	25,33 ± 2,62 ^a	26,50 ± 2,89 ^a	28,50 ± 1,70 ^a	29,50 ± 5,17 ^a	$p = 0,31$	$p = 0,72$	$p = 0,98$
Grooming (zona escura)	2,11 ± 0,56 ^a	2,00 ± 0,63 ^a	1,17 ± 0,52 ^a	1,00 ± 0,36 ^a	$p = 0,10$	$p = 0,81$	$p = 0,96$
Head poke	4,11 ± 0,67 ^a	5,00 ± 0,68 ^a	4,58 ± 0,57 ^a	3,33 ± 0,76 ^a	$p = 0,40$	$p = 0,80$	$p = 0,14$

Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através da média e DPM. $n = 11-12$. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos (fator dieta x tratamento) pela ANOVA e teste de Newman-Keuls.

No teste do LCE, nenhuma diferença significativa foi encontrada em relação às frequências de entradas nos braços abertos, bem como no tempo gasto nesses braços, tal como está demonstrado na Figura 7.

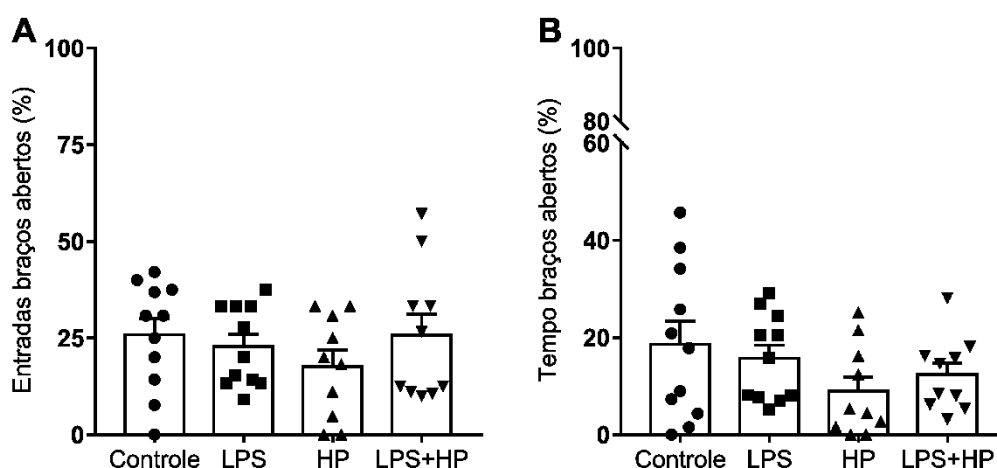


FIGURA 7 – Frequência de entradas (A) e tempo de permanência nos braços abertos (B) no teste de labirinto em cruz elevado. Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através da média e DPM. $n = 10-11$; para análise dos dados foi utilizada a ANOVA e o teste de Newman Keuls.

Os outros comportamentos avaliados no teste do LCE estão descritos na Tabela 3. Foi encontrada diferença significativa para a frequência de *head-dipping* protegidos, em relação aos fatores tratamento ($F_{(1, 38)} = 3,89, p < 0,05$; power: 1,00); e interação dieta e tratamento ($F_{(1, 38)} = 12,05, p < 0,01$; power: 1,00). Os grupos em que as mães receberam aplicação de LPS executaram um menor número de vezes o comportamento de *head-dipping* protegido em relação aos grupos que receberam salina. Além disso, os grupos LPS, HP e LPS+HP demonstraram uma menor frequência de *head-dipping* protegido comparados ao grupo Controle.

TABELA 3 – Outros comportamentos avaliados no teste de Labirinto em Cruz Elevado.

Avaliação	Grupos				Análise estatística		
	Controle	LPS	HP	LPS+HP	Dieta	Tratamento	Dieta x Tratamento
Head-dipping (protegido)	2,64 ± 0,51 ^a	0,64 ± 0,21 ^b	1,00 ± 0,26 ^b	1,40 ± 0,57 ^b	$p = 0,29$	$p < 0,05$	$p < 0,01$
Head-dipping (desprotegido)	1,54 ± 0,45 ^a	2,27 ± 0,55 ^a	1,40 ± 0,45 ^a	2,30 ± 0,27 ^a	$p = 0,89$	$p = 0,07$	$p = 0,84$
Falsa entrada	4,82 ± 0,64 ^a	3,18 ± 0,44 ^a	3,60 ± 0,52 ^a	4,80 ± 0,52 ^a	$p = 0,71$	$p = 0,68$	$p = 0,09$
Idas ao final	2,36 ±	2,54 ±	1,60 ±	2,20 ±	$p = 0,32$	$p = 0,48$	$p = 0,71$

do braço aberto	0,75 ^a	0,45 ^a	0,52 ^a	0,39 ^a			
Tempo no final do braço aberto	30,57 ± 8,53 ^a	22,90 ± 3,32 ^a	19,76 ± 5,16 ^a	13,83 ± 2,39 ^a	$p < 0,05$	$p = 0,17$	$p = 0,86$
Rearing	13,64 ± 0,84 ^b	21,82 ± 1,44 ^a	18,30 ± 0,60 ^a	21,00 ± 1,96 ^a	$p = 0,14$	$p < 0,001$	$p < 0,05$
Grooming	2,37 ± 0,58 ^a	1,91 ± 0,50 ^a	3,40 ± 0,79 ^a	3,00 ± 0,33 ^a	$p = 0,06$	$p = 0,45$	$p = 0,96$

Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através da média e DPM. $n = 11-12$. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos (fator dieta x tratamento) pela ANOVA e teste de Newman-Keuls.

O tempo gasto na parte final dos braços abertos demonstrou diferença significativa em relação ao fator dieta ($F_{(1, 29)} = 4,27, p < 0,05$; power: 1,00). Os grupos que as mães receberam dieta hiperlipídica permaneceram menor tempo nessa zona do LCE em relação aos grupos que as mães recebiam dieta padrão (TABELA 3).

A frequência de *rearing* executados no teste LCE demonstrou uma diferença significativa em função dos fatores tratamento ($F_{(1, 38)} = 18,18, p < 0,001$; power: 1,00); e interação dieta e tratamento ($F_{(1, 38)} = 4,61, p < 0,05$; power: 1,00). A prole das mães que receberam aplicação de LPS realizou mais vezes o comportamento de *rearing* em relação aos grupos salina. Ademais, os grupos LPS, HP e LPS+HP demonstraram menor frequência de *rearing* comparados ao grupo Controle (TABELA 3).

Na avaliação da capacidade motora, avaliada durante a fase teste do rotarod, nenhuma diferença significativa foi encontrada para os fatores: tentativas ($p = 0,36$), dieta ($p = 0,06$), e tratamento ($p = 0,91$). Adicionalmente, nenhuma diferença foi reportada durante essa fase para a interação dos fatores dieta e tratamento ($p = 0,65$); e tentativas, dieta e tratamento ($p = 0,30$) (FIGURA 8).

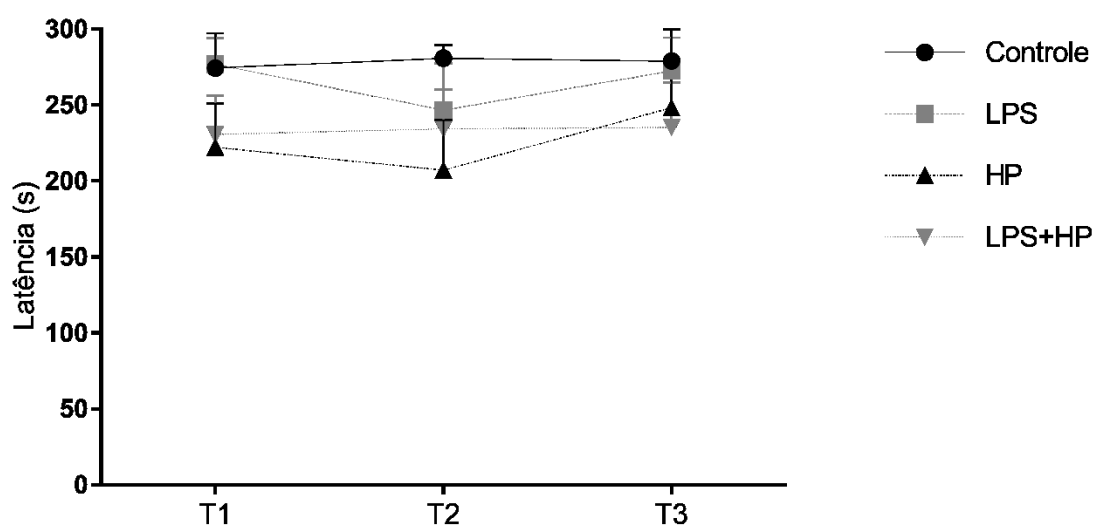


FIGURA 8 – Latência para queda nas três tentativas (T1, T2 e T3) da fase teste do rotarod. Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através da média e DPM. $n = 9-11$; para análise dos dados foi utilizada a ANOVA e o teste de Newman Keuls.

Na avaliação da fase de aprendizado do rotarod (TABELA 4), todos os grupos aumentaram progressivamente a latência para a queda do primeiro até o terceiro treino ($F_{(8, 280)} = 11,87, p < 0,001$; power: 1,00). Ademais, do terceiro até o sexto treinamento, não houve diferença significativa na latência para a queda entre os grupos.

TABELA 4 – Fase de aprendizado no teste rotarod.

Avaliação	Grupos				Análise estatística		
	Controle	LPS	HP	LPS+HP	Dieta	Tratamento	Dieta x Tratamento
Aprendizado 1	179,1 ± 18,60 ^a	139,37 ± 24,88 ^a	169,73 ± 22,99 ^a	157,45 ± 12,10 ^a	$p = 0,82$	$p = 0,20$	$p = 0,49$
Aprendizado 2	183,60 ± 29,11 ^a	171,25 ± 36,07 ^a	192,09 ± 27,99 ^a	148,91 ± 27,18 ^a	$p = 0,82$	$p = 0,36$	$p = 0,61$
Aprendizado 3	191,10 ± 33,09 ^b	215,87 ± 29,59 ^b	224,55 ± 21,67 ^b	203,36 ± 26,31 ^b	$p = 0,51$	$p = 0,73$	$p = 0,28$
Aprendizado 4	238,10 ± 26,39 ^b	204,12 ± 38,41 ^b	223,91 ± 20,59 ^b	241,09 ± 20,05 ^b	$p = 0,38$	$p = 0,45$	$p = 0,19$
Aprendizado 5	270,40 ± 23,97 ^b	237,37 ±	250,91 ±	232,00 ± 27,48 ^b	$p = 0,65$	$p = 0,32$	$p = 0,79$

Aprendizado 6	254,00 ±	24,12 ^b	25,56 ^b	223,27 ±	<i>p</i> = 0,81	<i>p</i> = 0,18	<i>p</i> = 0,78
	20,18 ^b	±	±				
		38,51 ^b	23,97 ^b	27,03 ^b			

Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados através da média e DPM. n = 11-12. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos (fator tentativas) pela ANOVA e teste de Newman-Keuls.

4.2 Estado redox

Para as análises de FRAP, SOD, GST e TBARS da amígdala, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (FIGURA 9). No entanto, na dosagem da CAT foi demonstrada diferença significativa no fator tratamento ($F_{(1, 24)} = 4,45$, $p < 0,05$; power: 1,00). Os grupos em que as mães receberam aplicação de LPS demonstraram apresentaram maior atividade dessa enzima em relação aos grupos que as mães recebiam aplicação de salina (FIGURA 9D).

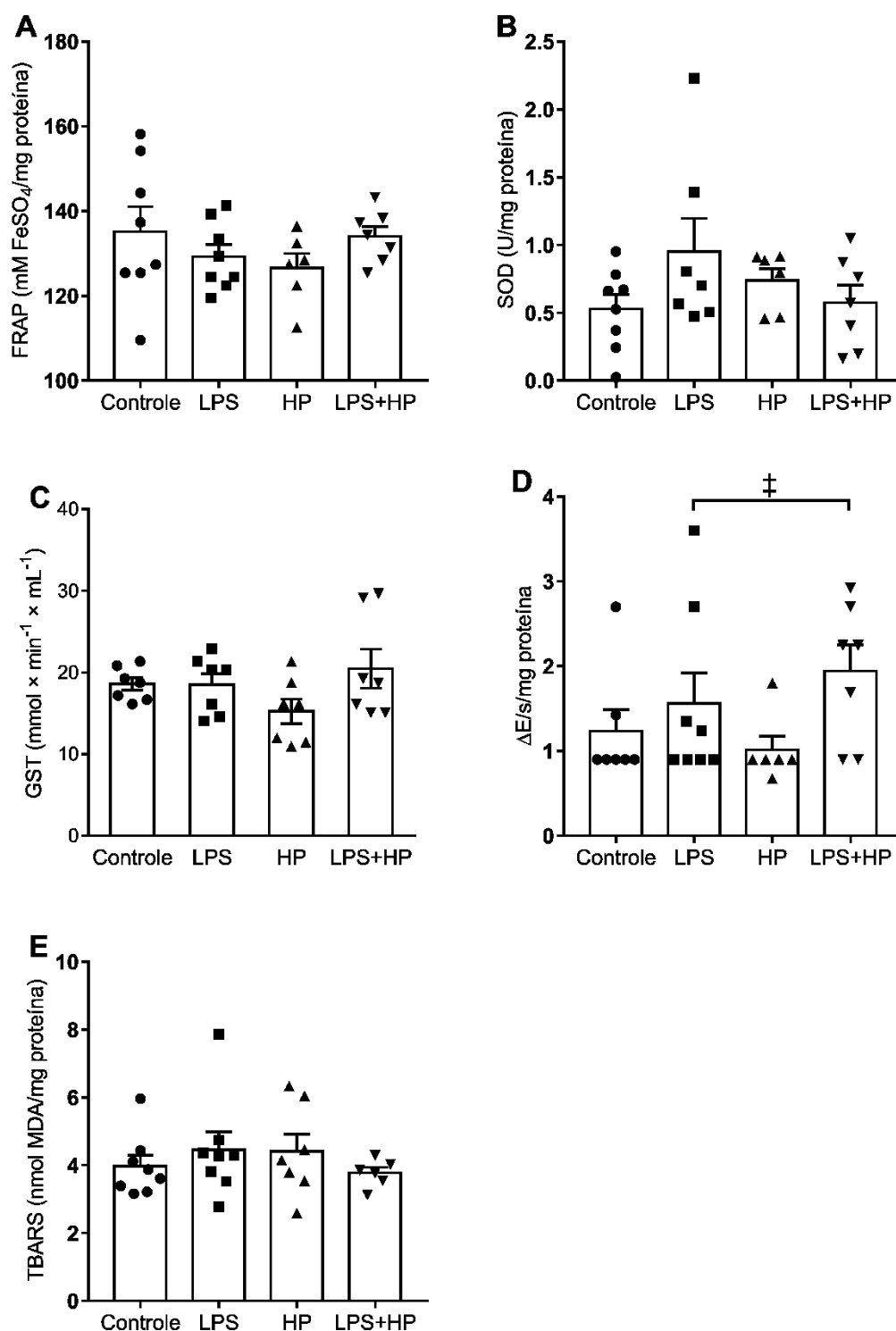


FIGURA 9 – Capacidade antioxidante FRAP (A), atividade da SOD (B), GST (C) e da CAT (D), além dos níveis de TBARS (E) na amígdala dos animais no 50º dia pós-natal (PN50). Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de

LPS. Os dados estão demonstrados através da média e DPM. $n = 6-8$; $\ddagger p < 0,05$ (fator tratamento) usando a ANOVA e o teste de Newman Keuls.

4.3 Análise de citocinas

Na avaliação de citocinas da amígdala, diferenças significativas no fator tratamento foram encontradas para os níveis de IL-6 ($F_{(1, 25)} = 7,72$, $p < 0,05$; power: 1,00) e TNF- α ($F_{(1, 25)} = 5,03$, $p < 0,05$; power: 1,00). A prole das mães que receberam a aplicação de LPS demonstrou maiores níveis na amígdala de ambas (IL-6: $p < 0,01$; TNF- α : $p < 0,05$) em relação à prole de mães que receberam salina (FIGURA 10A-10B).

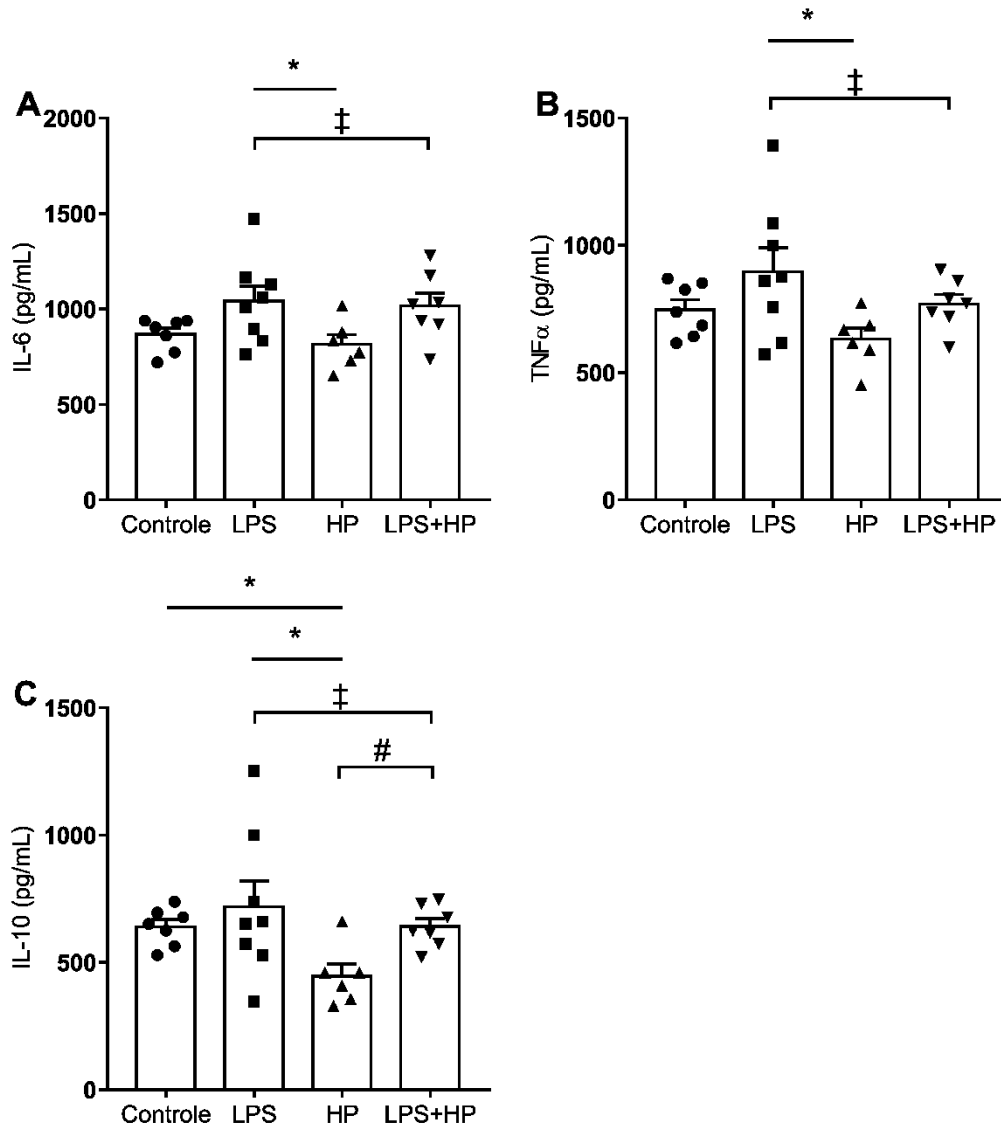


FIGURA 10 - Concentração de IL-6 (A), TNF- α (B), e IL-10 (C) na amígdala dos animais no 50º dia pós-natal (PN50). Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e

aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados como média e DPM. $n = 7-8$; $*p < 0,05$ (interação dieta x tratamento); $\ddagger p < 0,05$ (fator tratamento); $\#p < 0,05$ (fator dieta) usando ANOVA e o teste de Newman Keuls.

Os níveis de IL-10 na amígdala demonstraram diferença significativa em relação aos fatores dieta ($F_{(1, 24)} = 4,34, p < 0,05$; power: 1,00); tratamento ($F_{(1, 24)} = 4,42, p < 0,05$; power: 1,00); e na interação dieta e tratamento ($F_{(1, 24)} = 0,81, p < 0,05$; power: 0,98). Em relação ao fator dieta, a prole das mães de dieta hiperlipídica apresentou menores níveis de IL-10 na amígdala ($p < 0,05$) em comparação com a prole das mães que recebeu dieta padrão. Para o fator tratamento, a prole das mães que receberam a administração de LPS reportou maiores níveis de IL-10 ($p < 0,05$) em relação ao grupo de animais que as mães receberam salina. Além disso, na interação entre os fatores, foi observado que o grupo HP possuía menor concentração de IL-10 na amígdala comparado aos grupos LPS ($p < 0,05$) e Controle ($p < 0,05$) (FIGURA 10C).

Foi encontrada diferença significativa na razão IL-6/IL-10 da amígdala para os fatores da dieta; e na interação dieta e tratamento. A prole das mães que recebiam dieta hiperlipídica demonstrou maior razão IL-6/IL-10 em comparação à prole das mães de dieta padrão. Ademais, o grupo HP apresentou maior razão IL-6/IL-10 ($p < 0,05$) em relação ao grupo Controle (FIGURA 11A). Para a razão TNF- α /IL-10, não foi observada nenhuma diferença significativa (FIGURA 11B).

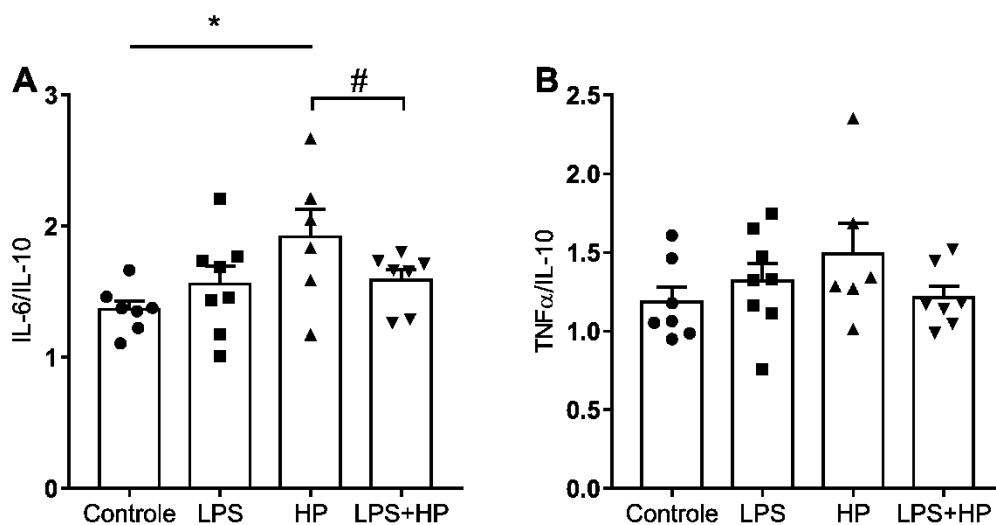


FIGURA 11 – Razões entre IL-6/IL-10 (A), e TNF- α /IL-10 (B), na amígdala dos animais no 50º dia pós-natal (PN50). Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados como média e DPM. $n = 7-8$; * $p < 0,05$ (interação dieta x tratamento); # $p < 0,05$ (fator dieta) usando ANOVA e o teste de Newman Keuls.

4.4 Peso relativo das adrenais e dosagem de corticosterona

O peso relativo das glândulas suprarrenais não demonstrou diferença significativa em nenhum dos fatores avaliados (FIGURA 12A). No entanto, para a avaliação de corticosterona, uma diferença significativa foi encontrada para o fator tratamento ($F_{(1, 27)} = 6,07$, $p < 0,05$; power: 1,00). A prole das mães que receberam aplicação de LPS demonstrou maiores níveis de corticosterona ($p < 0,05$) sanguínea em comparação com a prole das mães que receberam salina (FIGURA 12B).

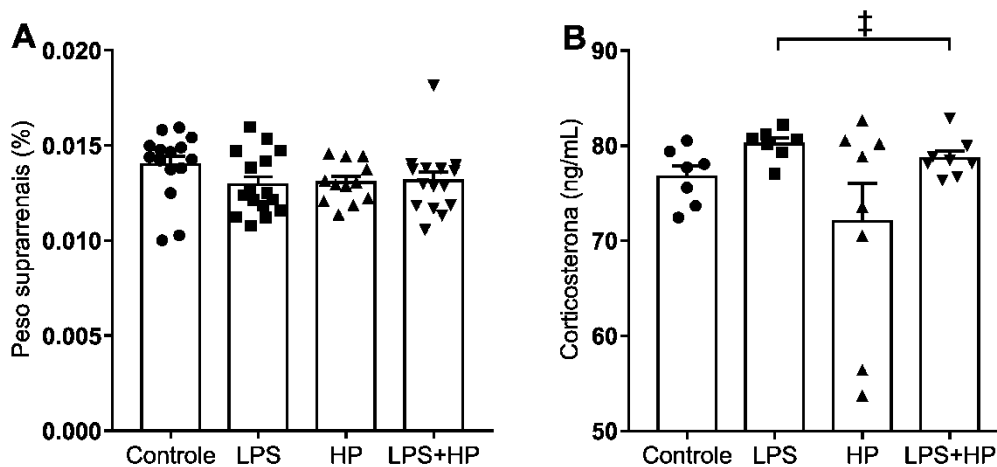


FIGURA 12 – Peso relativo das suprarrenais (A), e níveis de corticosterona sanguíneos (B) dos animais no 50º dia pós-natal (PN50). Legenda: Controle – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de salina; LPS – prole das mães que receberam dieta padrão e aplicação intraperitoneal de LPS; HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de salina; LPS+HP – prole das mães que receberam dieta hiperlipídica e aplicação intraperitoneal de LPS. Os dados estão demonstrados como média e DPM. Suprarrenais ($n = 13-15$); Corticosterona ($n = 7-8$); ‡ $p < 0,05$ (fator tratamento) usando ANOVA e o teste de Newman Keuls.

5 DISCUSSÃO

A tolerância ao LPS é um modelo que gera hiporresponsividade à resposta inflamatória, podendo promover proteção contra aplicações subseqüentes dessa endotoxina ou outros estímulos inflamatórios (SEELEY; GHOSH, 2017). No presente estudo, a associação materna entre a reexposição ao LPS e uma dieta hiperlipídica evitou comportamentos do tipo-ansiosos na prole através de um mecanismo de tolerância cruzada. Além disso, a reexposição ao LPS preveniu contra a diminuição nas concentrações de IL-10 e o aumento na razão IL-6/IL-10 proporcionadas pela dieta hiperlipídica, sugerindo um efeito neuroprotetor na amígdala.

A gestação e a lactação são períodos muito sensíveis para insultos inflamatórios na prole, que por sua vez, podem predispor a doenças mentais (NAJJAR et al., 2013; SPENCER, 2017). Entre esses insultos, a dieta materna hiperlipídica demonstrou possuir uma forte associação com a indução de inflamação na amígdala da prole, levando a efeitos ansiogênicos (GLENDINING; FISHER; JASONI, 2018; JANTHAKHIN et al., 2017; SASAKI et al., 2013; SMITH et al., 2020). No entanto, o mecanismo pelo qual a dieta materna leva a essa inflamação, é dependente da passagem a partir da mãe de mediadores inflamatórios para a prole. Estudos demonstram que a dieta hiperlipídica durante a gestação pode proporcionar essa passagem através da placenta para o feto (AYE; JANSSON; POWELL, 2015; CALABUIG-NAVARRO et al., 2017; REYNOLDS et al., 2015; SABEN et al., 2013). De forma semelhante, na lactação, essa transferência ocorre via leite materno (ARAD et al., 2017; DI BENEDETTO et al., 2019; PANAGOS et al., 2016; WHITAKER et al., 2017). Além disso, durante essas fases, a barreira hematoencefálica da prole não está totalmente desenvolvida, o que permite a chegada dos agentes pró-inflamatórios ao encéfalo.

No presente estudo, o grupo HP apresentou uma concentração mais baixa de IL-10 e uma maior razão IL-6/IL-10 na amígdala. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória e seus altos níveis no encéfalo podem desempenhar um papel na limitação da plasticidade e no comprometimento da migração neuronal, crescimento de axônios, formação de sinapses e mielinização (GRAHAM et al., 2018b; HE et al., 2005; RUDOLPH et al., 2018; TCHESALOVA; POSILLICO; TRONSON, 2018). Em contraste, a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, liberada como um processo compensatório durante a inflamação para retorno à homeostase. Sua ativação está envolvida na inibição de outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF α , IL-1 β e IL-6 (ALMEIDA et al., 2020; KWILASZ et al., 2015).

Além disso, insuficiências na sinalização de IL-10 têm sido implicadas em distúrbios neuropsiquiátricos, enquanto seu aumento está relacionado à melhora em patologias relacionadas à neuroinflamação (ALMEIDA et al., 2020; KWILASZ et al., 2015; MUNSHI; PARRILLI; ROSENKRANZ, 2019; TECHE et al., 2017). Nesse contexto, os resultados aqui apresentados indicam que o grupo HP obteve um perfil pró-inflamatório na amígdala, devido às concentrações mais baixas de IL-10 e também a uma maior razão IL-6/IL-10. Estudos anteriores reportaram que a inflamação no complexo amigdalóide pode induzir comportamentos semelhantes aos da ansiedade (SASAKI et al., 2013, 2014).

Por outro lado, a prole das mães que receberam a reexposição ao LPS (grupos LPS e LPS+HP), apresentaram um aumento nos níveis de IL-6, TNF α e IL-10 na amígdala. A demonstração do aumento das citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF α) e anti-inflamatória (IL-10) indica uma resposta compensatória para conter o excesso de mediadores inflamatórios (LEITE et al., 2016). Esta resposta compensatória já foi demonstrada na literatura em diferentes modelos de tolerância ao LPS (BISWAS; LOPEZ-COLLAZO, 2009; HOBBS et al., 2018; LEITE et al., 2016; MUSAELYAN et al., 2018; VERGADI; VAPORIDI; TSATSANIS, 2018), e pode estar envolvida na regulação positiva do miR-21 e na regulação negativa do miR-98 (JI et al., 2018; LIU et al., 2011; NAHID et al., 2013; SHEEDY, 2015; SHEEDY et al., 2010). Portanto, sugere-se que a prole das mães que receberam LPS (grupos LPS e LPS+HP) obtiveram um aumento de IL-10 através de um mecanismo compensatório, para conter uma inflamação inicial na amígdala. Além disso, os resultados do estado redox indicam um aumento na enzima CAT nesses grupos. O aumento da capacidade antioxidante na amígdala está também associado a prevenção de comportamentos tipo-ansiosos (CANEVER et al. 2018; OLUGBEMIDE et al. 2020; DOS SANTOS et al. 2017). Em conjunto, esses resultados indicam um efeito protetor da tolerância ao LPS na amígdala da prole, divergindo do que foi demonstrado para o grupo HP.

A ativação imune materna e/ou a administração de dietas hiperlipídicas maternas no início da vida podem também levar a disfunções no eixo HPA (BABRI; DOOSTI; SALARI, 2014; BAKER et al., 2017; BASTA-KAIM et al., 2011; NIU et al., 2019; ZHAO et al., 2020). Além de suas funções neuroendócrinas de resposta ao estresse, o eixo HPA responde à ativação imunológica (SOCH; SPENCER, 2020). Este processo ocorre por meio da liberação de corticosterona na corrente sanguínea, após a estimulação das glândulas suprarrenais pelo hormônio adrenocorticotrópico. A corticosterona atua inibindo a atividade do NF κ B nas células imunológicas, diminuindo a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (DONG et al.,

2018; SOCH; SPENCER, 2020). No presente estudo, foi observado aumento dos níveis de corticosterona no sangue dos grupos em que as mães receberam LPS (grupos LPS e LPS+HP). Em um estudo anterior com a utilização de um modelo de tolerância ao LPS, altos níveis de corticosterona e citocinas anti-inflamatórias foram relatadas (URBACH-ROSS; KUSNECOV, 2007). Dessa forma, os resultados aqui reportados indicam um possível mecanismo de *feedback* da liberação de corticosterona para controlar a resposta inflamatória (SOCH; SPENCER, 2020). Essa suposição reforça a possibilidade de ter ocorrido uma resposta compensatória anti-inflamatória na prole de mães que receberam a tolerância ao LPS.

Pode-se dizer que, no encéfalo, a região determinante na interpretação das ameaças ambientais é a amígdala, possivelmente relacionada a comportamentos de ansiedade e medo em roedores (CALHOON; TYE, 2015; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). No presente trabalho, o grupo HP demonstrou um comportamento tipo-ansioso no teste do CA, visto que reportaram uma menor frequência e tempo gasto na zona central, menor latência para deixar essa zona, além de baixa locomoção. Em geral, roedores evitam entrar e permanecer na área central do CA, o que pode ser classificado como uma medida da ansiedade desse animal (HARRO, 2018). A menor locomoção apresentada pelo grupo HP também pode ser entendida como maior ansiedade, devido ao baixo interesse em explorar um novo ambiente. É importante observar que nenhum dos grupos do presente estudo demonstrou *déficit* motor nas fases de aprendizagem e teste do rotarod, indicando que a menor locomoção do grupo HP estava somente relacionada a um comportamento tipo-ansioso desse grupo (HARRO, 2018; MONTIGLIO et al., 2010).

Em consonância com esses resultados do CA, a prole das mães que receberam dieta hiperlipídica (grupos HP e LPS+HP) apresentou menores frequências de *head-dipping* protegido e de tempo de permanência no final do braço aberto, ambos no teste de LCE. Esses resultados podem indicar ansiogênese e também prejuízo na busca por novidades (GOMEZ; GARCÍA-GARCÍA, 2017; WALF; FRYE, 2007). Além disso, vários outros estudos apresentaram efeitos ansiogênicos na prole de dietas maternas com alto teor de gordura (BUFFINGTON et al., 2016; SASAKI et al., 2013; WINTHER et al., 2018). Tendo em vista o perfil pró-inflamatório apresentado pelos animais do grupo HP, sugere-se que essa inflamação no complexo amigdalóide possa ter sido o fator desencadeador do comportamento tipo-ansioso nesses animais.

Um resultado não esperado foi o apresentado pelo grupo LPS, que reportou um comportamento tipo-ansioso, ao entrar e passar menos tempo na zona clara do teste de

transição claro-escuro. Esse grupo também demonstrou frequências menores de entradas na zona central do CA, e na execução de *head-dipping* protegido no LCE, ambos em comparação com o grupo Controle. Além disso, a prole de mães que receberam aplicação de LPS (grupos LPS e LPS+HP) apresentaram níveis mais elevados de corticosterona no sangue. Concentrações elevadas desse hormônio podem causar alterações na plasticidade da amígdala, devido à alta concentração de receptores de glicocorticóides no complexo amigdalóide (SASAKI et al., 2013, 2014). Ademais, a liberação de corticosterona na corrente sanguínea, por si só, pode levar à ansiogênese (KOE; ASHOKAN; MITRA, 2016; MITRA; SAPOLSKY, 2008).

Estudos mostram que a tolerância ao LPS é efetiva para prevenir alterações comportamentais em roedores (BANASIKOWSKI et al., 2015; MUSAELYAN et al., 2018). No entanto, em alguns casos, a administração repetida de LPS pode produzir inflamação e efeitos deletérios no comportamento (BASTA-KAIM et al., 2015, 2011). Em consonância com esses fatos, a aplicação de LPS já induziu maior ansiedade no teste de transição claro-escuro anteriormente (DEPINO, 2015; LUCCHINA et al., 2010). Os resultados aqui relatados indicam que o grupo LPS apresentou alguma alteração nos circuitos envolvidos na ansiedade, possivelmente por meio das elevações da inflamação na amígdala e/ou da hiperatividade do eixo HPA. Ademais, é importante discutir que a principal diferença do teste de transição claro-escuro para o teste do CA é a iluminação (ARRANT; SCHRAMM-SAPYTA; KUHN, 2013). A iluminação da arena de claro-escuro representa um contexto neurobiológico de aversão diferente, que pode gerar resultados distintos conforme os tratamentos dos animais. Esse fato pode ter sido responsável pelas diferentes respostas de ansiedade observadas nos grupos HP e LPS, principalmente em relação aos testes do CA e transição claro-escuro, respectivamente.

A principal hipótese do presente capítulo era que a reexposição ao LPS poderia promover uma tolerância cruzada à dieta hiperlipídica materna, resultando em uma prevenção na alteração dos comportamentos tipo-ansiedade na prole. Usando um protocolo semelhante ao presente estudo, Huang et al. (2015), demonstraram maiores concentrações de IL-6 e TNF- α no hipocampo da prole de mães que receberam apenas a dieta hiperlipídica. Por outro lado, nesse mesmo estudo, a prole das mães que receberam reexposição ao LPS em associação a dieta hiperlipídica apresentou níveis semelhantes de IL-6 e TNF- α em relação ao grupo controle (HUANG et al., 2015). Dessa forma, o presente trabalho é, possivelmente, o primeiro a relatar uma resposta compensatória anti-inflamatória na amígdala, obtida através da

reexposição materna ao LPS em associação com a dieta hiperlipídica, sem gerar prejuízos nos comportamentos do tipo-ansiedade na prole.

No entanto, as razões pelas quais os grupos que receberam o LPS (LPS e LPS+HP) se comportaram de maneira diferente nos testes de ansiedade, em especial no teste de transição claro-escuro, não estão bem estabelecidas. A hipótese levantada é de que apenas quando há uma associação entre a dieta hiperlipídica e a reexposição ao LPS na mãe, é que ocorre o efeito de proteção nos comportamentos do tipo-ansiedade na prole. Suportando esse argumento, Huang et al. (2015) demonstrou degeneração neuronal na prole das mães que receberam somente a reexposição ao LPS. Em contraste, essas alterações morfológicas não foram encontradas na prole das mães que receberam a combinação de dieta hiperlipídica e reexposição ao LPS. Possivelmente, as duas fontes inflamatórias associadas (dieta hiperlipídica e LPS) promoveram uma maior resposta de tolerância, levando a processos neuroadaptativos que conferiram uma maior proteção à amígdala e prevenção da alteração nos comportamentos tipo-ansiedade. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para elucidar melhor esse efeito.

Algumas limitações foram observadas para este capítulo. Em primeiro lugar, seria necessária a realização de uma análise morfológica dos encéfalos desses animais, especialmente da amígdala basolateral (CALHOON; TYE, 2015; JANTHAKHIN et al., 2017; ULLRICH et al., 2018). Essa análise ajudaria na identificação de um possível comprometimento no desenvolvimento neuronal dos animais e poderia ser realizada em diferentes fases, como no nascimento, ao desmame e durante a adolescência. Segundo, fica como sugestão para os próximos estudos a avaliação dos marcadores de ativação da micróglia na região da amígdala, bem como o uso de animais *knockout* para a expressão de IL-10, e, também, experimentos com ablação microglial. Terceiro, é importante entender melhor qual o real papel do eixo HPA no efeito promovido pela reexposição materna ao LPS, além da interação deste eixo com a amígdala (principalmente via corticosterona). Para tanto, são sugeridas as avaliações: resposta da corticosterona a diferentes estressores; dosagem de outros marcadores inflamatórios e da expressão do fator liberador de corticotropina no hipotálamo; além da expressão de receptores de glicocorticóides e mineralocorticóides na amígdala (NIU et al., 2019). Por fim, é preciso entender melhor os motivos das diferenças apresentadas pelos grupos LPS e LPS+HP nos testes de ansiedade. Para isso, estudos futuros com a utilização de dietas com menores concentrações de gorduras, bem como a utilização de ácidos graxos poli-insaturados, poderiam ser úteis para verificar se somente a interação dos dois fatores

inflamatórios (dieta hiperlipídica e LPS) é capaz de proporcionar o efeito protetor na amígdala.

Em resumo, este estudo demonstrou o efeito protetor da reexposição ao LPS promovido na amígdala da prole de mães que receberam dieta hiperlipídica. O efeito de tolerância cruzada parece ser gerado a partir de um mecanismo compensatório em resposta à uma inflamação inicial, prevenindo alterações nos comportamentos do tipo-ansiedade nesses animais. Os agonistas de TLR₄ têm sido usados para promover um efeito imunomodulador, aumentando a resistência à inflamação (HERNANDEZ et al., 2019) e na contenção de processos neurodegenerativos (VENEZIA et al., 2017). Portanto, o efeito de tolerância com ação final anti-inflamatória apresentado no presente estudo, pode ser utilizado futuramente para prevenir o desenvolvimento dos transtornos de ansiedade. Isso é particularmente importante, pois já foi demonstrado em humanos uma forte correlação entre disfunções precoces na conectividade da amígdala com comportamentos relacionados a transtornos do medo e ansiedade na infância e adolescência (GRAHAM et al., 2016, 2018a, 2019; QIN et al., 2014).

6 CONCLUSÕES

A combinação de uma dieta hiperlipídica e a reexposição ao LPS na mãe resultou na proteção da amígdala da prole, por meio de uma resposta compensatória anti-inflamatória. Esse efeito de tolerância cruzada pode ter evitado o desenvolvimento de comportamentos do tipo-ansiosos nesses animais, diferentemente do que aconteceu com as proles das mães que receberam apenas a dieta hiperlipídica ou somente a aplicação de LPS.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Priscila G. C. et al. Neuroinflammation and glial cell activation in mental disorders. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, [on-line], v. 2, p. 100034, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666354619300353>>

AMINI, Elham et al. Brain Lipopolysaccharide Preconditioning-Induced Gene Reprogramming Mediates a Tolerance State in Electroconvulsive Shock Model of Epilepsy. **Frontiers in Pharmacology**, [on-line], v. 9, n. 416, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00416>>

ARAD, Michal et al. Immune activation in lactating dams alters sucklings' brain cytokines and produces non-overlapping behavioral deficits in adult female and male offspring: A novel neurodevelopmental model of sex-specific psychopathology. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 63, p. 35–49, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159117300156>>

ARRANT, Andrew E.; SCHRAMM-SAPYTA, Nicole L.; KUHN, Cynthia M. Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v. 256, p. 119–127, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23721963>>

AYE, Irving L. M. H.; JANSSON, Thomas; POWELL, Theresa L. TNF- α stimulates System A amino acid transport in primary human trophoblast cells mediated by p38 MAPK signaling. [on-line], v. 3, n. 10, p. 1–11, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26508738/>>

BABRI, Shirin; DOOSTI, Mohammad-Hossein; SALARI, Ali-Akbar. Strain-dependent effects of prenatal maternal immune activation on anxiety- and depression-like behaviors in offspring. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 37, p. 164–176, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159113005886>>

BAKER, Kathryn D. et al. The impact of obesity and hypercaloric diet consumption on anxiety and emotional behavior across the lifespan. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [on-line], v. 83, p. 173–182, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763417304293>>

BAKUNINA, Nataliia; PARIANTE, Carmine M.; ZUNSZAIN, Patricia A. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. **Immunology**, [on-line], v. 144, n. 3, p. 365–373, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25580634/>>

BANASIKOWSKI, Tomek J. et al. Repeated exposure of male mice to low doses of lipopolysaccharide: Dose and time dependent development of behavioral sensitization and tolerance in an automated light–dark anxiety test. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v. 286, p. 241–248, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432815001485>>

BASTA-KAIM, A. et al. Prenatal administration of lipopolysaccharide induces sex-dependent changes in glutamic acid decarboxylase and parvalbumin in the adult rat brain. **Neuroscience**, [on-line], v. 287, p. 78–92, 2015. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452214010550>>

BASTA-KAIM, Agnieszka et al. Hyperactivity of the hypothalamus–pituitary–adrenal axis in lipopolysaccharide-induced neurodevelopmental model of schizophrenia in rats: Effects of antipsychotic drugs. **European Journal of Pharmacology**, [on-line], v. 650, n. 2, p. 586–595, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299910010630>>

BISWAS, Subhra K.; LOPEZ-COLLAZO, Eduardo. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. **Trends in Immunology**, [on-line], v. 30, n. 10, p. 475–487, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1471490609001549>>

BORDET, Régis et al. Increase in Endogenous Brain Superoxide Dismutase as a Potential Mechanism of Lipopolysaccharide-Induced Brain Ischemic Tolerance. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, [on-line], v. 20, n. 8, p. 1190–1196, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/00004647-200008000-00004>>

BOULLU-CIOCCA, Sandrine et al. Postnatal Diet-Induced Obesity in Rats Upregulates Systemic and Adipose Tissue Glucocorticoid Metabolism During Development and in Adulthood. **Diabetes**, [on-line], v. 54, n. 1, p. 197–203, 2005. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/54/1/197.abstract>>

BOURIN, Michel; HASCOËT, Martine. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology**, [on-line], v. 463, n. 1, p. 55–65, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299903012743>>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [on-line], v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269776905273>>

BUFFINGTON, Shelly A. et al. Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. **Cell**, [on-line], v. 165, n. 7, p. 1762–1775, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867416307309>>

CALABUIG-NAVARRO, Virtu et al. Effect of Maternal Obesity on Placental Lipid Metabolism. **Endocrinology**, [on-line], v. 158, n. 8, p. 2543–2555, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28541534>>

CANEVER, L. et al. Changes in Behavioural Parameters, Oxidative Stress and Neurotrophins in the Brain of Adult Offspring Induced to an Animal Model of Schizophrenia: The Effects of FA Deficient or FA Supplemented Diet during the Neurodevelopmental Phase. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 86, p. 52–64, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29782958/>>

CALHOON, Gwendolyn G.; TYE, Kay M. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nature Neuroscience**, [on-line], v. 18, n. 10, p. 1394–1404, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nn.4101>>

CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Diretrizes brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividade de ensino ou de pesquisa científica, Resolução Normativa nº 30 (2016)**. Brasil - Ministério da Ciência, Tecnologia,

Inovações e Comunicações, 2016.

CORDNER, Zachary A. et al. Maternal high-fat diet results in cognitive impairment and hippocampal gene expression changes in rat offspring. **Experimental Neurology**, [on-line], v. 318, n. April, p. 92–100, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.04.018>>

DEMPSEY, Elaine et al. Persistent central inflammation and region specific cellular activation accompany depression- and anxiety-like behaviours during the resolution phase of experimental colitis. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 80, p. 616–632, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159119301035>>

DEPINO, A. M. Early prenatal exposure to LPS results in anxiety- and depression-related behaviors in adulthood. **Neuroscience**, [on-line], v. 299, p. 56–65, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452215004170>>

DI BENEDETTO, Maria Grazia et al. Nutritional and immunological factors in breast milk: A role in the intergenerational transmission from maternal psychopathology to child development. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 85, p. 57-68,

2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159119301096>>

DIAS-ROCHA, Camilla P. et al. Maternal high-fat diet induces sex-specific endocannabinoid system changes in newborn rats and programs adiposity, energy expenditure and food preference in adulthood. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [on-line], v. 51, p. 56–68, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0955286317303042>>

DONG, Junsheng et al. Cortisol inhibits NF-κB and MAPK pathways in LPS activated bovine endometrial epithelial cells. **International Immunopharmacology**, [on-line], v. 56, p. 71–77, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576918300213>>

DOS SANTOS, Tiago Marcon et al. Effects of Previous Physical Exercise to Chronic Stress on Long-Term Aversive Memory and Oxidative Stress in Amygdala and Hippocampus of Rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 56, n. 1, p. 58–67, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28039090/>>

ESCOBAR, A. et al. Unripe banana flour (*Musa cavendishii*) promotes decrease in weight gain and elimination of fecal cholesterol in Wistar rats. **Nutrition and Food Science**, [on-line], v. 50, n. 1, p. 157-167, 2019. Disponível em: <<https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/NFS-12-2018-0337/full/html>>

EVANS-LACKO, S. et al. Socio-economic variations in the mental health treatment gap for people with anxiety, mood, and substance use disorders: results from the WHO World Mental Health (WMH) surveys. **Psychological Medicine**, [on-line], v. 48, n. 9, p. 1560–1571, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29173244/>>

FREITAS, Daniel A. et al. High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats. **Physiology & Behavior**, [on-line], v. 184, p. 6–11, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031938417303785?via%3Dihub>>

GLENDINING, Kelly A.; FISHER, Lorryn C.; JASONI, Christine L. Maternal high fat diet alters offspring epigenetic regulators, amygdala glutamatergic profile and anxiety. **Psychoneuroendocrinology**, [on-line], v. 96, p. 132–141, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306453018302099>>

GOMEZ, Francisca; GARCÍA-GARCÍA, Luis. Anxiogenic-like effects of fluoxetine render adult male rats vulnerable to the effects of a novel stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [on-line], v. 153, p. 32–44, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305716302933>>

GRAF, Amanda E. et al. Maternal high fat diet exposure is associated with increased hepcidin levels, decreased myelination, and neurobehavioral changes in male offspring. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 58, p. 369–378, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2016.08.005>>

GRAHAM, Alice M. et al. Implications of newborn amygdala connectivity for fear and cognitive development at 6-months-of-age. **Developmental Cognitive Neuroscience**, [on-line], v. 18, p. 12–25, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dcn.2015.09.006>>

GRAHAM, Alice M. et al. Maternal Systemic Interleukin-6 During Pregnancy Is Associated With Newborn Amygdala Phenotypes and Subsequent Behavior at 2 Years of Age. **Biological Psychiatry**, [on-line], v. 83, n. 2, p. 109–119, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.05.027>>

GRAHAM, Alice M. et al. Maternal Cortisol Concentrations During Pregnancy and Sex-Specific Associations With Neonatal Amygdala Connectivity and Emerging Internalizing Behaviors. **Biological Psychiatry**, [on-line], v. 85, n. 2, p. 172–181, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.06.023>>

GUEDINE, Camyla Rocha de Carvalho et al. Cafeteria diet during lactation and/or post-lactation altered lipid profile/lipid peroxidation and increased anxiety-like behavior in male rat offspring. **Nutritional Neuroscience**, [on-line], v. 23, n. 7, p. 1–11, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30289019/>>

HARRO, Jaanus. Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v. 352, p. 81–93, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432817311634>>

HASEBE, Kyoko et al. Modulation of high fat diet-induced microbiome changes, but not behaviour, by minocycline. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 82, p. 309–318, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159118312418>>

HE, Fei et al. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. **Nature Neuroscience**, [on-line], v. 8, n. 5, p. 616–625, 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15852015>>

HE, Kang et al. Lipopolysaccharide-induced cross-tolerance against renal ischemia–reperfusion injury is mediated by hypoxia-inducible factor-2 α -regulated nitric oxide production. **Kidney International**, [on-line], v. 85, n. 2, p. 276–288, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0085253815561929>>

HERNANDEZ, Antonio et al. Immunobiology and application of toll-like receptor 4 agonists

- to augment host resistance to infection. **Pharmacological Research**, [on-line], v. 150, p. 104502, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661819320067>>
- HOBBS, Stuart et al. LPS-stimulated NF-κB p65 dynamic response marks the initiation of TNF expression and transition to IL-10 expression in RAW 264.7 macrophages. **Physiological Reports**, [on-line], v. 6, n. 21, p. e13914–e13914, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30426723>>
- HUANG, C. F. et al. Effect of prenatal exposure to LPS combined with pre- and post-natal high-fat diet on hippocampus in rat offspring. **Neuroscience**, [on-line], v. 286, n. December, p. 364–370, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452214010343>>
- JANTHAKHIN, Authors Yoottana et al. Maternal high-fat diet leads to hippocampal and amygdala dendritic remodeling in adult male offspring. **Psychoneuroendocrinology**, [on-line], v. 83, p. 49-57, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.05.003>>
- Jl, Yang-Fei et al. MicroRNA-132 attenuates LPS-induced inflammatory injury by targeting TRAF6 in neuronal cell line HT-22. **Journal of Cellular Biochemistry**, [on-line], v. 119, n. 7, p. 5528–5537, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jcb.26720>>
- KANG, Silvia S. et al. Dietary intervention rescues maternal obesity induced behavior deficits and neuroinflammation in offspring. **Journal of Neuroinflammation**, [on-line], v. 11, n. 1, p. 156, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12974-014-0156-9>>
- KENTNER, Amanda C. et al. Maternal immune activation: reporting guidelines to improve the rigor, reproducibility, and transparency of the model. **Neuropsychopharmacology**, [on-line], v. 44, n. 2, p. 245–258, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41386-018-0185-7>>
- KOE, A. S.; ASHOKAN, A.; MITRA, R. Short environmental enrichment in adulthood reverses anxiety and basolateral amygdala hypertrophy induced by maternal separation. **Translational Psychiatry**, [on-line], v. 6, n. 2, p. e729, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/tp2015217>>
- KUMAR, Sudhir; ADHIKARI, Atin. Dose-dependent immunomodulating effects of endotoxin in allergic airway inflammation. **Innate immunity**, [on-line], v. 23, n. 3, p. 249–257, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28142300/>>
- KWILASZ, A. J. et al. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. **Neuropharmacology**, [on-line], v. 96, p. 55–69, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390814003955>>
- LEITE, Hércules Ribeiro et al. Vesicular acetylcholine transporter knock down-mice are more susceptible to inflammation, c-Fos expression and sickness behavior induced by lipopolysaccharide. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 57, p. 282–292, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159116301155>>
- LEMES, Simone Ferreira et al. Maternal Consumption of High-fat Diet in Mice Alters Hypothalamic Notch Pathway, NPY Cell Population and Food Intake in Offspring. **Neuroscience**, [on-line], v. 371, p. 1–15, 2018. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452217308461>>

LI, Weichao et al. Lipopolysaccharide-induced preconditioning protects against traumatic spinal cord injury by upregulating Nrf2 expression in rats. **Life Sciences**, [on-line], v. 162, p. 14–20, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320516304702>>

LI, Yan et al. Maternal and early postnatal immune activation produce dissociable effects on neurotransmission in mPFC–amygdala circuits. **Journal of Neuroscience**, [on-line], v. 38, n. 13, p. 3358–3372, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29491010/>>

LIANG, Ya-Jing et al. Contribution of microglial reaction to increased nociceptive responses in high-fat-diet (HFD)-induced obesity in male mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 80, p. 777–792, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159118307633>>

LIU, Yang et al. MicroRNA-98 negatively regulates IL-10 production and endotoxin tolerance in macrophages after LPS stimulation. **FEBS Letters**, [on-line], v. 585, n. 12, p. 1963–1968, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.029>>

LUCCHINA, Luciana et al. Evaluating the interaction between early postnatal inflammation and maternal care in the programming of adult anxiety and depression-related behaviors. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v. 213, n. 1, p. 56–65, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432810003062>>

LUH, Laura M.; DAS, Indrajit; BERTOLOTTI, Anne. qMotor, a set of rules for sensitive, robust and quantitative measurement of motor performance in mice. **Nature Protocols**, [on-line], v. 12, n. 7, p. 1451–1457, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nprot.2017.062>>

OLUGBEMIDE, Abimbola S. et al. Naringenin Improves Depressive- and Anxiety-like Behaviors in Mice Exposed to Repeated Hypoxic Stress through Inhibition of Oxidative-Inflammatory Mediators and NF- κ B/BDNF Expressions. **Brain Research Bulletin**, in press, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0361923020307127>>

MELO, Camila S. et al. A single session of high-intensity interval exercise increases antioxidant defenses in the hippocampus of Wistar rats. **Physiology and Behavior**, [on-line], v. 211, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31493415/>>

MITRA, Rupshi; SAPOLSKY, Robert M. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [on-line], v. 105, n. 14, p. 5573–5578, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18391224>>

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, [on-line], v. 48, n. 4, p. 254–260, 1955. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13252152/>>

MONTIGLIO, Pierre-Olivier et al. Individual variation in temporal activity patterns in open-field tests. **Animal Behaviour**, [on-line], v. 80, n. 5, p. 905–912, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347210003295>>

MUNSHI, Soumyabrata; PARRILLI, Victoria; ROSENKRANZ, J. Amiel. Peripheral anti-inflammatory cytokine Interleukin-10 treatment mitigates interleukin-1 β - induced anxiety and sickness behaviors in adult male rats. **Behavioural Brain Research**, [on-line], v. 372, p. 112024, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432819301767>>

MUSAELYAN, Ksenia et al. Repeated lipopolysaccharide exposure modifies immune and sickness behaviour response in an animal model of chronic inflammation. **Journal of Psychopharmacology**, [on-line], v. 32, n. 2, p. 236–247, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0269881117746902>>

NAHID, Md A. et al. Regulation of TLR2-Mediated Tolerance and Cross-Tolerance through IRAK4 Modulation by miR-132 and miR-212. **The Journal of Immunology**, [on-line], v. 190, n. 3, p. 1250–1263, 2013. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/190/3/1250.abstract>>

NAJJAR, Souhel et al. Neuroinflammation and psychiatric illness. **Journal of Neuroinflammation**, [on-line], v. 10, n. 1, p. 816, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-43>>

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**, [on-line], v. 49, n. 2, p. 474–478, 1972. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5082943/>>

NIU, Xiaoting et al. Maternal high fat diet programs hypothalamic-pituitary-adrenal function in adult rat offspring. **Psychoneuroendocrinology**, [on-line], v. 102, n. September 2018, p. 128–138, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.12.003>>

O'LOUGHLIN, Elaine et al. Acute in utero exposure to lipopolysaccharide induces inflammation in the pre- and postnatal brain and alters the glial cytoarchitecture in the developing amygdala. **Journal of Neuroinflammation**, [on-line], v. 14, n. 1, p. 1–12, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29096641/>>

PANAGOS, P. G. et al. Breastmilk from obese mothers has pro-inflammatory properties and decreased neuroprotective factors. **Journal of Perinatology**, [on-line], v. 36, n. 4, p. 284–290, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/jp.2015.199>>

PARENT-ROBERGE, Hugo et al. Effects of combined exercise training on the inflammatory profile of older cancer patients treated with systemic therapy. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, [on-line], v. 2, p. 100016, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S266635461930016X>>

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, [on-line], v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2864480/>>

QIN, Shaozheng et al. Amygdala subregional structure and intrinsic functional connectivity predicts individual differences in anxiety during early childhood. **Biological Psychiatry**, [on-line], v. 75, n. 11, p. 892–900, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.10.006>>

REYNOLDS, Clare M. et al. Maternal high fat and/or salt consumption induces sex-specific

inflammatory and nutrient transport in the rat placenta. **Physiological Reports**, [on-line], v. 3, n. 5, p. e12399, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25991721>>

RIUL, Tania Regina; ALMEIDA, Sebastião Sousa. Feed restriction since lactation has reduced anxiety in adult Wistar rats. **Revista de Nutrição**, [on-line], v. 33, p. e190143, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-9865202033e190143>>

ROJAS, Ashebo et al. Inhibition of the prostaglandin E2 receptor EP2 prevents status epilepticus-induced deficits in the novel object recognition task in rats. **Neuropharmacology**, [on-line], v. 110, n. Part A, p. 419–430, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.07.028>>

RUDOLPH, Marc D. et al. Maternal IL-6 during pregnancy can be estimated from newborn brain connectivity and predicts future working memory in offspring. **Nature Neuroscience**, [on-line], v. 21, n. 5, p. 765–772, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41593-018-0128-y>>

RUSCIO, Ayelet Meron et al. Cross-sectional Comparison of the Epidemiology of DSM-5 Generalized Anxiety Disorder Across the Globe. **JAMA Psychiatry**, [on-line], v. 74, n. 5, p. 465–475, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28297020>>

SABEN, Jessica et al. Early growth response protein-1 mediates lipotoxicity-associated placental inflammation: role in maternal obesity. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, [on-line], v. 305, n. 1, p. E1–E14, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23632636>>

SASAKI, Aya et al. Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. **Neuroscience**, [on-line], v. 240, p. 1–12, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452213001851?via%3Dihub>>

SASAKI, Aya et al. Maternal high fat diet alters anxiety behavior and glucocorticoid signaling in adolescent offspring. **Neuroscience**, [on-line], v. 272, n. 11, p. 92–101, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.04.012>>

SEELEY, John J.; GHOSH, Sankar. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. **Journal of Leukocyte Biology**, [on-line], v. 101, n. 1, p. 107–119, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0316-118RR>>

SHEEDY, Frederick J. et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. **Nature Immunology**, [on-line], v. 11, n. 2, p. 141–147, 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ni.1828>>

SHEEDY, Frederick J. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. **Frontiers in Immunology**, [on-line], v. 6, p. 19, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310327/>>

SMITH, Brittany L. et al. Adolescent microglia play a role in executive function in male mice exposed to perinatal high fat diet. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 84, p. 80–89, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159119306312>>

SOCH, Alita; SPENCER, Sarah J. Consequences of early life overfeeding for microglia –

Perspectives from rodent models. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 88, p. 256-261, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159120300520>>

SPENCER, S. J.; FIELD, E.; PITTMAN, Q. J. Neonatal programming by neuroimmune challenge: effects on responses and tolerance to septic doses of lipopolysaccharide in adult male and female rats. **Journal of Neuroendocrinology**, [on-line], v. 22, n. 4, p. 272–281, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20136690/>>

SPENCER, Sarah J. Perinatal programming by inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 63, p. 1–7, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159117300491?via%3Dihub>>

STRALEY, Megan E. et al. Distinct alterations in motor & reward seeking behavior are dependent on the gestational age of exposure to LPS-induced maternal immune activation. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 63, p. 21–34, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159116301519>>

TCHESALOVA, Daria; POSILLICO, Caitlin Kelly; TRONSON, Natalie Celia. Neuroimmune Activation Drives Multiple Brain States. **Frontiers in Systems Neuroscience**, [on-line], v. 12, n. 39, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnsys.2018.00039>>

TECHE, Stefania P. et al. Resilience to traumatic events related to urban violence and increased IL10 serum levels. **Psychiatry Research**, [on-line], v. 250, p. 136–140, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165178116308502>>

TEIXEIRA, Amanda ESCOBAR et al. Cafeteria diet administered from lactation to adulthood promotes a change in risperidone sensitivity on anxiety, locomotion, memory, and social interaction of Wistar rats. **Physiology & Behavior**, [on-line], v. 220, n. 1, p. 112874, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938420301918>>

TELLEZ-MERLO, Guillermina et al. Prenatal immune challenge induces behavioral deficits, neuronal remodeling, and increases brain nitric oxide and zinc levels in the male rat offspring. **Neuroscience**, [on-line], v. 406, p. 594–605, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.02.018>>

TOVOTE, Philip; FADOK, Jonathan Paul; LÜTHI, Andreas. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, [on-line], v. 16, n. 6, p. 317–331, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrn3945>>

TURNER, Ryan C. et al. Single low-dose lipopolysaccharide preconditioning: neuroprotective against axonal injury and modulates glial cells. **Neuroimmunology and Neuroinflammation**, [on-line], v. 4, p. 6–15, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28164149>>

ULLRICH, M. et al. OCD-like behavior is caused by dysfunction of thalamo-amygdala circuits and upregulated TrkB/ERK-MAPK signaling as a result of SPRED2 deficiency. **Molecular Psychiatry**, [on-line], v. 23, n. 2, p. 444–458, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/mp.2016.232>>

URBACH-ROSS, Daniella; KUSNECOV, Alexander W. Effects of acute and repeated

exposure to lipopolysaccharide on cytokine and corticosterone production during remyelination. **Brain, Behavior, and Immunity**, [on-line], v. 21, n. 7, p. 962–974, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088915910700044X>>

VENEZIA, Serena et al. Toll-like receptor 4 stimulation with monophosphoryl lipid A ameliorates motor deficits and nigral neurodegeneration triggered by extraneuronal α -synucleinopathy. **Molecular Neurodegeneration**, [on-line], v. 12, n. 1, p. 52, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13024-017-0195-7>>

VERGADI, Eleni; VAPORIDI, Katerina; TSATSANIS, Christos. Regulation of Endotoxin Tolerance and Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome by Non-coding RNAs. **Frontiers in Immunology**, [on-line], v. 9, p. 2705, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30515175>>

WALF, Alicia A.; FRYE, Cheryl A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, [on-line], v. 2, n. 2, p. 322–328, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>>

WANG, Zhe et al. Lipopolysaccharide preconditioning increased the level of regulatory B cells in the spleen after acute ischaemia/reperfusion in mice. **Brain Research**, [on-line], v. 1701, p. 46–57, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006899318302932>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

WHITAKER, Kara M. et al. Associations of Maternal Weight Status Before, During, and After Pregnancy with Inflammatory Markers in Breast Milk. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, [on-line], v. 25, n. 12, p. 2092–2099, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28985033>>



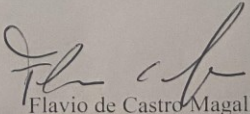
WIJENAYAKE, Sanoji et al. Maternal high-fat diet induces sex-specific changes to glucocorticoid and inflammatory signaling in response to corticosterone and lipopolysaccharide challenge in adult rat offspring. **Journal of Neuroinflammation**, [on-line], v. 17, n. 1, p. 116, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32293490>>

WINTHER, Gudrun et al. Maternal High-fat Diet Programs Offspring Emotional Behavior in Adulthood. **Neuroscience**, [on-line], v. 388, p. 87–101, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452218304895>>

ZHAO, Xin et al. Therapeutic efficacy of environmental enrichment on behavioral, endocrine, and synaptic alterations in an animal model of maternal immune activation. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, [on-line], v. 3, p. 100043, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666354620300089>>

ZINKHAN, E. K. et al. Intrauterine growth restriction combined with a maternal high-fat diet increased adiposity and serum corticosterone levels in adult rat offspring. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, [on-line], v. 9, n. 3, p. 315–328, 2018. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/article/intrauterine-growth-restriction-combined-with-a-maternal-highfat-diet-increased-adiposity-and-serum-corticosterone-levels-in-adult-rat-offspring/C6E99541C6677993878CCFAD56005733>>

ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
CERTIFICADO		
Diamantina, 03 de agosto de 2017.		
<p>Certificamos que a proposta intitulada " Efeito protetor do lipopolissacarídeo na prole adolescente de mães expostas durante a gestação e a lactação à dieta hiperlipídica ", registrada com o nº 024/2017 sob a responsabilidade de Arthur Rocha Gomes - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFVJM) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, em reunião de 02/08/2017.</p>		
Finalidade	(X) Ensino () Pesquisa Científica	
Vigência da Autorização	30/09/2017 a 30/09/2019	
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> (Wistar).	
Nº de animais	168	
Peso/Idade	80 dias/300g = 24 animais 0 dias/5g = 144 animais	
Sexo	24 fêmeas 144 machos	
Origem	Biotério de pesquisa da Nutrição Experimental	
<p><i>O prazo de validade desse Certificado é equivalente a vigência do Projeto prorrogável por mais 1 ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA/UFVJM durante a vigência do projeto.</i></p>		
<p><i>Com o recebimento deste parecer, o responsável compromete-se a entregar o relatório final da proposta até 60 dias após o término. Em caso de planos de aula, a cada seis meses estes deverão ser revalidados.</i></p>		
<p><i>Ressaltamos que, conforme a Resolução Normativa I, de 9 de Julho de 2010, qualquer alteração no protocolo previamente aprovado, na equipe técnica, bem como acidentes envolvendo os animais, competem ao responsável a comunicação a CEUA/UFVJM.</i></p>		
 Flavio de Castro Magalhães Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - UFVJM		
Campus JK Comissão de Ética no Uso de Animais - UFVJM Prédio da Reitoria-PRPPG- Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000nAlto da Jacuba - Diamantina/MG - CEP 39100-000 Telefone: +55 (38) 3532-1200		CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais <small>UFVJM</small>