

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

**Efeito da inoculação de lipopolissacarídeo em ratos recém-nascidos sobre o
comportamento exploratório na adolescência.**

Javier Leonardo Rico Rodríguez

*Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo,
como parte das exigências para obtenção do título de Doutor
em Ciências, área de Psicobiologia.*

Ribeirão Preto - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Rico, Javier Leonardo Rodríguez

Efeito da inoculação de lipopolissacarídeo em ratos recém-nascidos sobre o comportamento exploratório na adolescência. Ribeirão Preto, 2010.

80 p. ; 29 il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Morato, Silvio.

1. Lipopolissacarídeo. 2. Infecção precoce. 3. Comportamento exploratório. 4. Ansiedade. 5. Impulsividade.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

Efeito da inoculação de lipopolissacarídeo em ratos recém-nascidos sobre o comportamento exploratório na adolescência.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de Psicobiologia.

Javier Leonardo Rico Rodríguez

Orientador: Prof. Silvio Morato

Ribeirão Preto - SP

2011

Aos meus pais, meus grandes mestres.

Ao Leonardo e à Priscila, a fonte de inspiração.

Agradecimentos

Ao meu orientador Silvio Morato, pela confiança e apoio depositado no meu trabalho, pela contribuição na minha formação profissional e pessoal, por sua amizade ao longo de todos esses anos, meus sinceros agradecimentos.

Aos membros da banca de qualificação, Dra. Janaína Zanoveli, Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, Prof. Dr. Francisco Juarez Ramalho Pinto, pelas importantes sugestões para o enriquecimento desse trabalho.

À banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura da dissertação.

Ao Prof. Dr. Francisco Juarez Ramalho Pinto, pelas importantes discussões e ideias no decorrer do desenvolvimento desse estudo, por sua amizade.

À Denise Brufato Ferraz, pela sua contribuição técnica na elaboração desse trabalho, e por sua amizade.

À Renata Beatriz Vicentini, pela grande ajuda, paciência e amizade durante todos esses anos.

A todos os que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho, aos funcionários do programa pela ajuda. À Inês, Denise, Sônia...

Aos amigos de laboratório, Thiago, Carol, Julián e Paulinho.

Aos meus grandes amigos Julián, Aninha e Milena e a todos os amigos colombianos.

À minha família na Colômbia.

À Priscila, minha esposa, pelo apoio, força e todo seu amor cada dia.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Conteúdo

Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução Geral	3
1.1. Infecção como evento de estresse precoce	3
1.2. Inoculação de lipopolissacarídeo (LPS) como modelo de infecção em recém-nascidos	4
1.3. Efeitos da infecção precoce sobre o desenvolvimento	5
2. Experimento 1 – Comportamento exploratório de ratos adolescentes expostos a uma inoculação moderada de LPS no início de vida	8
2.1. Introdução	8
2.1.1. <i>Objetivo</i>	8
2.2. Materiais e métodos	9
2.2.1. <i>Sujeitos</i>	9
2.2.2. <i>Equipamento</i>	9
EQUIPAMENTOS E TESTES COMPORTAMENTAIS	9
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	10
CAMPO ABERTO	10
TESTE DE EXPLORAÇÃO DE OBJETO NOVO	11
TÁBUA DE BURACOS	11
GRADIENTE DE AVERSÃO ELEVADO	12
NADO FORÇADO	12
2.2.3. <i>Procedimento</i>	13
MANIPULAÇÕES NO INICIO DE VIDA	13
ADMINISTRAÇÃO DE LPS EM NEONATOS	13
2.2.4. <i>Análise de dados</i>	14
2.3. Resultados	15
2.2.1. <i>Ganho de peso</i>	15
2.2.2. <i>Labirinto em cruz elevado</i>	15
2.2.3. <i>Campo aberto</i>	16
2.2.4. <i>Teste da exploração de objeto novo</i>	18
2.2.5. <i>Tábua de buracos</i>	20
2.2.6. <i>Gradiente de aversão elevado</i>	21
2.2.7. <i>Nado forçado</i>	21
2.4. Discussão	23
3. Experimento 2 – Comportamento exploratório de ratos adolescentes expostos a uma inoculação prolongada de LPS no início de vida	29
3.1. Introdução	29

3.1.1. <i>Objetivo</i>	29
3.2. Materiais e métodos	30
3.2.1. <i>Sujeitos</i>	30
3.2.2. <i>Equipamento</i>	30
3.2.3. <i>Procedimento</i>	30
MANIPULAÇÕES NO INICIO DE VIDA	30
ADMINISTRAÇÃO DE LPS EM NEONATOS	30
TESTES COMPORTAMENTAIS	31
COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS 1 E 2	31
3.2.4. <i>Análise de dados</i>	31
3.3. Resultados	32
3.3.1. <i>Ganho de peso</i>	32
3.3.2. <i>Labirinto em cruz elevado</i>	32
3.3.3. <i>Campo aberto</i>	34
3.3.4. <i>Teste da exploração de objeto novo</i>	35
3.3.5. <i>Tábua de buracos</i>	37
3.3.6. <i>Gradiente de aversão elevado</i>	38
3.3.7. <i>Nado forçado</i>	38
3.4. Comparação dos resultados dos Experimentos 1 e 2	39
3.4.1. <i>Comportamentos relacionados a ansiedade e locomoção</i>	39
3.4.2. <i>Resposta a estímulos novos</i>	41
3.4.3. <i>Exploração direcionada</i>	42
3.4.4. <i>Comportamento relacionado a impulsividade</i>	42
3.4.5. <i>Estilos de enfrentamento do estresse</i>	43
3.4.6. <i>Frequência de levantadas</i>	45
3.5. Discussão	47
3.5.1. <i>Efeito das manipulações no início da vida sobre o comportamento exploratório de ratos adolescentes</i>	51
4. Discussão Geral	54
5. Referências bibliográficas	58
6. Anexo	64

Resumo

A administração do componente bacteriano lipopolissacarídeo (LPS) durante o início de vida é um modelo animal comumente utilizado de infecção precoce. Os efeitos desse tratamento sobre o comportamento exploratório têm sido geralmente observados em ratos adultos. Contudo, sabe-se pouco sobre esses efeitos em etapas importantes do desenvolvimento como a adolescência. O presente trabalho analisou o efeito da inoculação repetida de LPS em ratos recém-nascidos, sobre o comportamento exploratório. No primeiro experimento, filhotes machos de ratos Wistar foram distribuídos em três grupos (N = 12) e receberam injeções intraperitoneais de solução veículo (PBS) ou de LPS (*E. coli*; 0,05 mg/kg), ou foram mantidos sem tratamento, nos dias 3 e 5 de vida. Na adolescência, entre os dias 40 e 46 de vida, os animais foram expostos aos seguintes testes comportamentais: labirinto em cruz elevado, campo aberto, reconhecimento de objeto novo, tábua de buracos, gradiente de aversão elevado e nado forçado. Os resultados mostraram que ratos adolescentes expostos a esse paradigma de inoculação exibiram um perfil de comportamento impulsivo caracterizado pelo aumento de locomoção, exploração de áreas abertas e baixa neofobia, quando comparados com os animais dos grupos controle. Esses animais exibiram também um estilo ativo de lidar com o estresse na primeira sessão do nado forçado. Semelhante ao procedimento utilizado no primeiro experimento, um segundo experimento foi realizado para determinar se uma inoculação diária mais prolongada de LPS (dias 2 a 7 de vida) poderia alterar o comportamento exploratório na adolescência. Os resultados mostraram que uma inoculação intensa alterou o estilo de enfrentamento do estresse em ratos adolescentes. Durante a primeira sessão do nado forçado, os ratos tratados com LPS escalaram durante menos tempo e permaneceram mais tempo na postura imóvel, quando comparados com animais dos grupos controle. No conjunto, os resultados dos dois experimentos mostraram que manipulações repetidas no início de vida podem aumentar a atividade exploratória e que a inoculação precoce de LPS resulta em aumento do número de levantadas. Discute-se o papel das citocinas no início de vida sobre o desenvolvimento de componentes relacionados à resposta de estresse, bem como a importância da experiência precoce com organismos infecciosos na elaboração de respostas adaptativas à novidade na adolescência.

Abstract

The administration of the bacterial component lipopolysaccharide (LPS) during early life is a commonly used animal model of early infection. The effects of this treatment on exploratory behavior have generally been observed in adult rats. However, little is known about these effects on important stages of development such as adolescence. The present study analyzed the effect of repeated inoculation of LPS in newborn rats on the exploratory behavior. In the first experiment, male Wistar rat pups were divided into three groups (N = 12) and received intraperitoneal injections of either vehicle solution (PBS) or LPS (*E. coli*; 0.05 mg/kg) or were left undisturbed at 3 and 5 days of age. In adolescence, between 40 and 46 days of age, the animals were exposed to the following behavioral tests: elevated plus-maze, open-field, novel-object exploration task, hole-board, elevated aversion gradient and the forced swim test. The results showed that adolescent rats exposed to this paradigm of early inoculation exhibited a profile of impulsive behavior characterized by increased locomotion, high exploration of open areas and low neophobia when compared with control group animals. These animals also exhibited an active style of coping with stress in the first session of the forced swim test. Similar to the procedure used in the first experiment, a second experiment was conducted to determine whether prolonged daily inoculation of LPS (2 to 7 days of age) could alter the exploratory behavior during adolescence. The results showed that prolonged inoculation altered the stress coping style in adolescent rats. During the first session of the forced swim, rats treated with LPS spent less time climbing and spent more time in immobile posture, as compared with the control group animals. As a whole, the results of both experiments showed that repeated manipulations in early life may increase exploratory activity and early LPS inoculation leads to increased number of rearings. The role of cytokines in early life on the development of components related to stress response is discussed together with the importance of early experiences with infectious organisms in the development of adaptive responses to novelty during adolescence.

Efeito da inoculação de lipopolissacarídeo em ratos recém-nascidos sobre o comportamento exploratório na adolescência.

1. Introdução Geral

1.1. Infecção como evento de estresse precoce

Eventos adversos no início de vida têm efeitos permanentes sobre o comportamento. Em humanos, por exemplo, existe uma forte relação entre o desenvolvimento de psicopatologias na fase adulta e as experiências de estresse precoce (Levine et al., 2005; Shea et al., 2005; Teicher et al., 2006). A literatura mostra que a perda dos pais durante a infância aumenta significativamente a probabilidade de desenvolver depressão maior (Kendler et al., 2002) e psicose (Morgan et al., 2007), além de induzir mudanças duradouras na função neuroendócrina (Tyrka et al., 2008). Experiências precoces de abuso e negligência parental são também consideradas como fatores de risco do comportamento suicida na adolescência e na vida adulta (Brodsky e Stanley, 2008). De fato, em um estudo *post-mortem*, foi constatada a relação entre o abuso infantil e a regulação de receptores de glicocorticóides no cérebro de adultos vítimas de suicídio (McGowan et al., 2009).

A utilização de modelos animais tem fornecido informações relevantes sobre os possíveis mecanismos pelos quais eventos adversos precoces alteram de forma duradoura a resposta emocional. Fatores ambientais presentes durante o início da vida de roedores, como o manuseio (Beane et al., 2002; Gomes et al., 2006) e desnutrição (Lesage et al., 2006; Levay et al., 2010), alteram a função de estruturas relacionadas à resposta ao estresse. No entanto, nas pesquisas pré-clínicas, o evento estressante melhor caracterizado tem sido a separação materna (Lehmann e Feldon, 2000; Imanaka et al., 2006; Millstein e Holmes, 2007). Está estabelecido que a separação de filhotes de roedores de suas mães leva, na vida adulta, a comportamentos relacionados a ansiedade e redução da exploração de ambientes novos (Caldji et al., 2000; Daniels et al., 2004), bem como a mudanças na função dos circuitos neurais que modulam a resposta ao estresse (Meaney et al., 1996; Plotsky et al., 2005; Lippmann et al., 2007). Provavelmente, como resultado da utilidade do paradigma de separação materna, outros eventos estressantes que, do ponto de vista etológico, podem ocorrer com maior frequência no início de vida, têm recebido menos atenção. Um bom exemplo desse tipo de evento consiste na

infecção bacteriana precoce. Embora, de forma intuitiva, a infecção não pareça ser um evento estressante, ela pode gerar todas as seqüelas fisiológicas de uma resposta ao estresse (Shanks et al., 1995; 2000; Beishuizen e Thijs, 2003), as quais são potencialmente capazes de alterar o comportamento da mesma forma que eventos estressantes de tipo emocional (Granger et al., 1996; Granger et al., 2001; Karrow, 2006). Em humanos, por exemplo, tem-se demonstrado que a infecção durante a gravidez por vírus, bactérias ou parasitas, associa-se ao aumento da incidência de esquizofrenia (para uma revisão, ver Boksa, 2010).

As alterações fisiológicas e comportamentais observadas em ratos adultos submetidos a estresse precoce por separação materna são semelhantes àquelas observadas em animais expostos à inoculação de LPS na primeira semana de vida. Especificamente, esses dois tipos de estresse precoce podem resultar no aumento dos comportamentos relacionados à ansiedade (Breivik et al., 2002; Daniels et al., 2004; Walker et al., 2004)

1.2. Inoculação de lipopolissacarídeo (LPS) como modelo de infecção em recém-nascidos

A infecção no recém-nascido, assim como no adulto, resulta na rápida mobilização de recursos tanto imunológicos quanto neuroendócrinos. A mobilização destes sistemas leva, por sua vez, à subsequente liberação de uma variedade de moléculas regulatórias e efetoras que desempenham um papel fundamental na eliminação das bactérias invasoras e na limitação dos danos causados por elas (Alexander e Rietschel, 2001). Enquanto essa resposta é fundamental para resolver a ameaça imediata imposta ao organismo, muitas das moléculas liberadas na tentativa de combater a infecção podem influenciar os processos normais de desenvolvimento (Moritz et al., 2005; Seckl e Meaney, 2006). Ao estudar as consequências da infecção precoce, é difícil separar os efeitos do agente infeccioso dos efeitos da resposta imunológica àquele agente propriamente dita (Granger et al., 2001). Com o intuito de resolver tal dificuldade, um estímulo padrão não-replicável é utilizado como uma aproximação de uma infecção sistêmica viral ou bacteriana (Tilders et al., 1994). A endotoxina lipopolissacarídeo (LPS), o maior componente da parede celular das bactérias Gram-negativas, é um dos estímulos padrão comumente utilizado como modelo de infecção (para uma revisão, ver Karrow, 2006).

Os efeitos do LPS são regulados através da sua interação com receptores do tipo Toll-4. Esse tipo de receptores desempenha um papel fundamental no reconhecimento preliminar dos patógenos em mamíferos e são expressos em células do sistema imune, tais como macrófagos, células dendríticas, além de algumas células não-imunes, dentre as quais incluem-se

fibroblastos e células epiteliais (Wang et al., 2006). Assim que o LPS se liga ao receptor Toll-4, inicia-se um processo de sinalização intracelular que leva à expressão de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β , interleucina-6 e fator de necrose tumoral alfa (Wang et al., 2006). Esse tipo de citocinas pró-inflamatórias são conhecidas por serem potentes ativadores do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (Besedovsky et al., 1991; Goshen e Yirmiya, 2009).

Considerando que o LPS é um forte indutor da imunidade inata, e que a sua administração imita a maioria das alterações fisiológicas induzidas durante uma infecção bacteriana Gram-negativa real (Alexander e Rietschel, 2001), a administração dessa endotoxina, em recém-nascidos, tem sido um modelo importante para investigar as consequências a longo prazo de uma infecção precoce. A endotoxina LPS é conhecida por estimular tanto o sistema imunológico quanto o sistema endócrino.

A administração de LPS em ratos adultos induz um conjunto característico de sintomas fisiológicos e comportamentais que incluem febre (Gaykema et al., 1998), atividade reduzida (Engeland et al., 2003; Franklin et al., 2003), anorexia e adipsia (Hart, 1988; Cross-Mellor et al., 2000) e ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal que resulta na liberação de corticosterona (Engeland et al., 2006). De forma similar, a administração de LPS no início de vida também induz esses sintomas observados em adultos, incluindo a diminuição da atividade locomotora e a ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (Skanks e Meaney, 1994; Dent et al., 1999; Walker et al., 2004).

A administração de LPS em ratas gestantes é um modelo bem estabelecido de infecção sistêmica perinatal. A prole de ratas gestantes tratadas com LPS exibe, ao atingir a fase adulta, aumento de locomoção induzida por anfetamina (Fortier et al., 2004), aumento de ansiedade (Hava et al., 2006; Wang et al., 2009), diminuição da interação social (Hava et al., 2006), prejuízos significativos tanto na inibição pré-pulso (Fortier et al., 2004; Romero et al., 2007), como na memória de reconhecimento de objetos (Coyle et al., 2009) e na aprendizagem espacial (Lanté et al., 2008). Considerando que a primeira semana após o nascimento do rato é equiparável ao último trimestre da gestação humana (Lupien et al., 2009), outros estudos têm observado os efeitos da administração de LPS em recém-nascidos. Animais adultos que foram expostos a LPS na primeira semana de vida exibem alterações na resposta neuroendócrina (Shanks et al., 1995), neuroimunológica (Ellis et al., 2006), sensibilidade a drogas dopaminérgicas (Tenk et al., 2007), bem como alterações cognitivas (Harré et al., 2008; Kohman et al., 2008) e aumento de comportamentos relacionados com ansiedade (Breivik et al., 2002; Spencer et al., 2005; Walker et al., 2009).

1.3. Efeitos da infecção precoce sobre o desenvolvimento

Em humanos, as infecções bacterianas constituem a principal causa de infecção em recém-nascidos e constituem um fator importante do nascimento prematuro (Osrin et al., 2004; Skogstrand et al., 2008). A capacidade dos recém-nascidos para montar uma resposta imunológica contra a região polissacarídica da bactéria é particularmente comprometida, resultando em uma significativa mortalidade infantil (Osrin et al., 2004). Além dessas consequências imediatas, as infecções bacterianas no início de vida podem alterar o curso normal do desenvolvimento neural, que por sua vez resulta em alterações duradouras no comportamento. As infecções produzidas pela bactéria *Escherichia coli*, em especial nos prematuros, estão associadas a atrasos significativos no desenvolvimento neurológico, que ocorrem independentemente do local da infecção (Stoll et al., 2004). No mesmo sentido, existem diversos estudos que mostram a relação entre infecção perinatal e paralisia cerebral (para uma revisão ver, Huleihel et al., 2004; Girard et al., 2009). Outra consequência comum da infecção perinatal consiste na resposta aumentada do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal a situações de estresse na vida adulta (Granger et al., 1996; Skanks e Meaney, 1994; Skanks et al., 1995; 2000), evento que, por sua vez, pode alterar a resposta emocional exibida pelos animais quando expostos à novidade (Breivik et al., 2002; Walker et al., 2004, 2009).

As alterações a longo prazo da infecção precoce parecem estar associadas à modulação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal pela ação das citocinas e dos glicocorticóides (Silverman et al., 2005; Karrow et al., 2006). As citocinas pró-inflamatórias são liberadas nos primeiros estágios de uma resposta imune por uma variedade de células que incluem macrófagos, micróglia e neurônios (Silverman et al., 2005). Além do papel essencial no recrutamento e proliferação de linfócitos T e B na periferia, as citocinas também modulam a sobrevivência e diferenciação de neurônios (Marx et al., 2001), e também o crescimento e organização dos dendritos (Gilmore et al., 2004). Dado o seu papel crucial no desenvolvimento do cérebro, não é de estranhar que os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, geradas pelo sistema imunológico materno ou fetal durante a infecção perinatal, tenham sido associados com o desenvolvimento anormal do cérebro do feto e com alterações no desenvolvimento neurológico (Cai et al., 2000; Pang et al., 2003; Yuan et al., 2005; Meyer et al., 2006).

Além de contribuir para a progressão da resposta imune contra a infecção, as citocinas liberadas como parte da resposta imune inata podem ativar o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal, resultando na liberação de glicocorticóides (para revisões, ver Haddad et al., 2002 e Goshen e Yirmiya, 2009). Por sua vez, os glicocorticóides liberados

modulam as células imunológicas para suprimir a síntese e liberação adicional de citocinas, protegendo assim o hospedeiro das consequências prejudiciais de uma elevada resposta imunológica, como dano tecidual, auto-imunidade e choque séptico (Silverman et al., 2005). No entanto, o aumento de glicocorticóides produzido pela exposição precoce à endotoxina está também associado à diminuição da densidade dos receptores de glicocorticóides no hipotálamo, hipocampo e córtex frontal em adultos (Granger et al., 1996). Essa sub-regulação na concentração de receptores resulta na diminuição da retroalimentação negativa de glicocorticóides e, conseqüentemente, em elevações mais pronunciadas e duradouras de corticosterona após exposição ao estresse na vida adulta (Shanks et al., 1995).

A adolescência é um período de consideráveis transformações em que se observa aumento da incidência de distúrbios psiquiátricos, tais como esquizofrenia, abuso de substâncias e transtornos de ansiedade (Paus et al., 2008). Durante esse período de alta plasticidade, a maturação e rearranjo das principais vias de neurotransmissores ainda estão acontecendo (Spear, 2000). Em roedores, a adolescência compreende o período entre os dias que antecedem o início da puberdade (por volta dos 40 dias em ratos e camundongos) e poucos dias depois (Spear e Brake, 1983). Ratos adolescentes exibem um repertório comportamental que inclui altos níveis de exploração, busca de novidade, impulsividade e exposição ao risco (Laviola et al. 2003). Por outra parte, a adolescência é também um período em que os efeitos a longo prazo do estresse precoce tornam-se evidentes. Por exemplo, o estresse pré-natal tem como resultado a diminuição de comportamentos relacionados com ansiedade em ratos adolescentes testados no labirinto em cruz elevado (Estanislau e Morato, 2006). Além disso, ratos adolescentes submetidos à separação materna durante os primeiros dias de vida, exibem um perfil de comportamento impulsivo e hiperatividade no campo aberto e na caixa claro-escuro (Colorado et al., 2006), bem como uma diminuição dos comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado (Koehnle e Rinaman, 2010).

De forma geral, diversos estudos têm descrito alterações fisiológicas e comportamentais a longo prazo, devidas à exposição a uma infecção no início de vida em ratos. Embora a maioria desses estudos tenha avaliado os efeitos da infecção precoce quando os animais atingem a fase adulta, pouco se conhece sobre esses efeitos na adolescência. Dessa forma, em obediência ao objetivo do presente trabalho, estudou-se o efeito da inoculação de LPS em ratos recém-nascidos sobre o comportamento exploratório na adolescência.

2. Experimento 1 – Comportamento exploratório de ratos adolescentes expostos a uma inoculação moderada de LPS no início de vida.

2.1. Introdução

Os efeitos a longo prazo de infecções precoces tem sido investigados através da administração de LPS em recém-nascidos. A principal vantagem da administração de LPS, ao invés da bactéria viva, consiste na capacidade de controlar a dosagem e a confiabilidade do efeito (Rosenberger et al., 2000). Embora vários modelos tenham sido utilizados para simular uma infecção bacteriana (Granger et al., 1996; Bilbo et al., 2005; 2008; Spencer et al., 2005; Jenkins et al., 2009), a administração de LPS nos dias 3 e 5 de vida parece ser o paradigma mais utilizado de infecção em recém-nascidos (Shanks et al., 1995, 2000; Breivik et al., 2002; Hodgson e Knott, 2002; Walker et al., 2004, 2006, 2008, 2009; Tenk et al., 2007; Kohman et al., 2008). O modelo de duas inoculações de LPS na primeira semana de vida tem a propriedade de estimular o sistema imunológico, produzindo um aumento de corticosterona (Shanks et al., 1995; Walker et al., 2004) e resultando em uma variedade de alterações imunológicas, endócrinas e comportamentais na fase adulta. Por exemplo, animais que foram tratados nos dias 3 e 5 de vida com LPS exibem, quando adultos, um aumento significativo do hormônio adrenocorticotrófico e de corticosterona em resposta ao estresse agudo (Shanks et al., 1995), inflamação reduzida da pata posterior durante artrite adjuvante e redução da proliferação de linfócitos (Shanks et al., 2000), bem como níveis circulantes elevados de citocinas pró-inflamatórias (Breivik et al., 2002) e susceptibilidade à colonização de tumor (Hodgson e Knott, 2002). Ratos adultos que foram tratados com LPS nesse paradigma de administração exibem também aumento de comportamentos relacionados à ansiedade (Breivik et al., 2002; Walker et al., 2004, 2009).

2.1.1. Objetivo

Considerando que outros paradigmas de administração de LPS, como uma única injeção no dia 14 de vida (Spencer et al., 2005), não parecem alterar os comportamentos relacionados à ansiedade na vida adulta, neste primeiro experimento, estudou-se o efeito da administração de LPS no dia 3 e 5 de vida sobre o comportamento exploratório de ratos adolescentes.

2.2. Materiais e métodos

2.2.1. Sujeitos

Foram utilizadas quatro ninhadas de ratos Wistar compostas por uma ama-de-leite e nove filhotes machos de um dia de idade, provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto. As amas e as ninhadas foram alojadas em caixas de polipropileno (40 x 34 x 17 cm) com água e comida à vontade, em um biotério mantido em ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7 h da manhã), cuja condição de luminosidade era de 30lux medidos no piso logo abaixo da lâmpada, fornecidos por um bulbo incandescente de 60 W. A temperatura foi mantida entre 24 e 27° C. Os filhotes foram desmamados no dia 21 e alojados em grupos de 4-5 animais por caixa até que atingiram 40 dias de idade, quando foram avaliados os efeitos a longo prazo da estimulação imunológica precoce. Os experimentos relatados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil (Protocolo 09.1.1587.53.6).

2.2.2. Equipamento

EQUIPAMENTOS E TESTES COMPORTAMENTAIS. Todos os testes comportamentais foram realizados entre os dias 40 e 46 de vida, período correspondente à adolescência média (Spear e Brake, 1983). O protocolo de avaliação comportamental utilizado foi semelhante ao descrito por Spencer et al (2005) para avaliar o efeito de um insulto imunológico precoce sobre comportamentos relacionados ao medo e à ansiedade em ratos adultos. Além disso, no presente estudo, os ratos adolescentes foram expostos a outros testes para avaliar comportamentos relacionados à exploração direcionada e à impulsividade. Deste modo, todos os animais foram expostos a seis testes comportamentais na mesma sequência: labirinto em cruz elevado, campo aberto, teste de exploração de objeto novo, tábua de buracos (hole-board), gradiente de aversão elevado (ver Apêndice) e nado forçado. Cada animal foi testado uma única vez em cada aparato, em sessões de 5 minutos sob 30lux de intensidade luminosa, exceto no teste de reconhecimento de objeto novo e de nado forçado que requeriam duas sessões e no teste do gradiente de aversão elevado, cuja duração foi de 3 min. Após cada animal ser testado, os aparatos eram limpos com uma solução de etanol de 5 % e secos com um papel-toalha.

Os comportamentos exibidos pelos animais foram gravados por uma câmera de vídeo e mantidos para análise posterior. Durante a análise, exceto para o teste de nado forçado, a imagem dos pisos dos aparatos era dividida em quadrados traçados sobre um acetato

transparente colocado sobre a tela do monitor. Isso permitiu o registro do número de locais onde o animal entrou, assim como o local de ocorrência dos comportamentos anotados. Uma entrada era registrada quando os ratos colocavam ambas as patas posteriores em uma determinada área. Os deslocamentos e comportamentos exibidos pelos animais em cada teste foram registrados e analisados de forma preliminar com o uso de um software especialmente concebido em nosso laboratório para esse propósito. O software pode ser livremente descarregado na página <http://scotty.ffclrp.usp.br/X-plo-rat.html>.

LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO. Um labirinto em cruz elevado, descrito alhures em maior detalhe (Estanislau e Morato, 2005), foi utilizado para avaliar comportamentos relacionados a ansiedade e locomoção. Sucintamente, o aparato é constituído por dois braços abertos (50 x 10 cm) cruzados perpendicularmente a dois braços fechados opostos de mesma dimensão. Esses últimos eram fechados por paredes de madeira de 40 cm de altura, salvo pela parte central onde os braços se cruzavam. O conjunto todo era elevado 50 cm acima do piso. Para evitar a queda dos animais, bordas de acrílico (0,5 cm de altura) rodeavam o perímetro do braços abertos. Os animais foram colocados na área central do labirinto com o focinho voltado para um dos braços fechados e foi-lhes permitida a exploração do aparato por 5 minutos. Durante esse período, foram registradas as seguintes medidas relacionadas a ansiedade: frequência de entradas, tempo gasto e distância percorrida nos braços abertos, número de entradas e tempo gasto nas extremidades desses braços, bem como a frequência e duração de esticar-se nos braços fechados (quando o animal estica seu corpo usando as patas dianteiras e retorna à posição inicial sem movimentar as patas posteriores), um comportamento relacionado a avaliação de risco (Wall e Messier, 2001). Os parâmetros analisados relacionados ao comportamento motor incluíram a distância percorrida e número de entradas no braços fechados, bem como a frequência e tempo gasto no comportamento de levantar-se (levantamento parcial ou total dos animais sobre as patas posteriores).

CAMPO ABERTO. Um campo aberto, descrito alhures em maior detalhe (Lamprea et al., 2008), foi utilizado para avaliar comportamentos relacionados a ansiedade, locomoção e tigmotaxia. Brevemente, o aparato consistia de uma plataforma quadrada (1,2 x 1,2 m) de fórmica marrom escura opaca cercada por paredes de madeira escura de 40 cm de altura. Para o registro dos comportamentos, a imagem do aparelho foi dividida em 36 quadrados, dos quais 20 correspondiam à periferia (área com paredes), e 16 dos quadrados constituíam a área central (sem paredes). Cada animal foi colocados na área central do campo aberto e deixado para explorar o aparelho livremente por 5 min. Durante esse período, registrou-se o tempo gasto na

área central, uma medida relacionada a ansiedade. As medidas registradas relacionadas à locomoção incluíram a distância percorrida e a frequência e o tempo gasto nos comportamentos de levantar-se nas patas traseiras na periferia da arena. Registrou-se também o tempo gasto nos cantos e nas áreas próximas às paredes do aparato, duas medidas relacionadas a tigmotaxia.

TESTE DA EXPLORAÇÃO DE OBJETO NOVO. Os animais foram expostos ao teste de exploração de objeto novo para analisar a resposta à novidade (Ennaceur e Delacour, 1988; Pawlak e Schwarting, 2002), utilizando o mesmo campo aberto descrito anteriormente. Cada rato foi submetido a uma sessão de habituação de 5 minutos para que pudesse explorar o aparato sem objetos. Após 24 horas desse período de habituação, os animais foram expostos a uma sessão de aquisição, e 24 horas depois a uma sessão de teste. Na sessão de aquisição, dois objetos idênticos (recipientes redondos de aço de 11 cm de diâmetro e 6 cm de altura) foram colocados no centro da arena, afastados 30 cm um do outro. Na sessão de teste, o objeto do lado direito foi substituído por um objeto novo (um recipiente cúbico de plástico branco, de 12cm x 8 cm x 8 cm). O tempo de cada sessão foi de 5 minutos e durante esse intervalo registrou-se o tempo que os animais gastavam explorando os objetos e o número de levantamentos. A exploração do objeto foi definida como dirigir o focinho para o objeto a uma distância inferior a 2 cm e/ou tocá-lo com o focinho ou a pata (Pawlak e Schwarting, 2002; Spencer et al., 2005). Um índice de memória de reconhecimento (Schröder et al., 2003), também denominado taxa de investigação (Clark et al., 2000; Gaskin et al., 2010) foi calculado para cada animal, a fim de determinar se houve (1) preferência pelo objeto do lado esquerdo ou direito durante a sessão de aquisição, (2) preferência pelo objeto novo na sessão de teste e (3) mudanças nos índices de reconhecimento de uma sessão para outra. Esta medida foi expressa pela taxa de $TD / (TE + TD)$, onde TD = tempo gasto explorando o objeto do lado direito e TE = tempo gasto explorando o objeto do lado esquerdo.

TÁBUA DE BURACOS. Uma tábua de buracos (Insight, Brasil) foi utilizada para avaliar o comportamento exploratório direcionado e a locomoção (File e Wardill, 1975). O aparato constou de uma caixa de acrílico (42 x 42 x 30 cm) com 5 buracos circulares no piso (4 cm de diâmetro). Para registrar a exploração da área central do aparelho, foi utilizada uma versão modificada do teste de quatro buracos, que além dos quatro buracos nos cantos incluiu um quinto buraco adicional no centro do chão. Sensores infravermelhos controlados por um software permitiam o registro da frequência e o tempo gasto nos mergulhos de cabeça dos animais em cada buraco. Os ratos foram colocados no aparelho e deixados para explorar livremente por 5 min. Durante esse tempo, registrou-se o número de imersões de cabeça em

cada um dos buracos. A atividade exploratória geral foi considerada como a frequência de mergulhos de cabeça nos buracos dos cantos enquanto a exploração do buraco central foi considerada uma medida relacionada à exposição ao risco. O número de levantamentos foi registrado como uma medida relacionada à locomoção.

GRADIENTE DE AVERSÃO ELEVADO. Os detalhes de validação deste teste encontram-se no apêndice em Anexos. Os animais foram expostos a este teste de exploração gradativamente aversiva, para se obter índices de comportamentos relacionados à ansiedade e à impulsividade. O aparato consistia em uma pista de fórmica de 210 cm de comprimento e 20 cm de largura, elevada a 40 cm do piso. A pista era dividida em três áreas de 70 cm de comprimento. O primeiro terço da pista consistia de um compartimento fechado de 70 cm de comprimento, semelhante a um túnel, com piso e duas paredes de fórmica preta (25 cm de altura), com uma porta de guilhotina na extremidade inicial e cobertura de acrílico vermelho transparente. Uma abertura comunicava o túnel com os próximos 70 cm da pista, que consistiam de um compartimento semelhante ao braço fechado de um labirinto em cruz elevado: piso de fórmica preta fechado por duas paredes laterais também de fórmica preta (60 cm de altura). A última parte da pista era semelhante ao braço aberto de um labirinto em cruz elevado e consistia de uma plataforma com piso de fórmica branca cercada por três bordas de acrílico branco (1 cm de altura). Uma lâmpada incandescente de 60 W iluminava a sala de testes e permitia uma intensidade de 2 lux no túnel, 20 lux no braço fechado e 35 lux no braço aberto. Os animais foram introduzidos na extremidade do túnel pela porta de guilhotina que, fechada, confinava o animal no aparato e deixava-se que explorasse a pista livremente por 3 minutos. As medidas registradas relacionadas a índices de impulsividade foram o número de entradas, o tempo gasto e a latência de entrada no braço aberto. As medidas relacionadas a ansiedade e locomoção foram o número de entradas e o tempo gasto no braço fechado e a distância percorrida no túnel. A frequência de levantamentos e o tempo gasto na área de transição túnel-braço fechado foram consideradas medidas de avaliação de risco.

NADO FORÇADO. O teste de nado forçado foi utilizado para se obter medidas comportamentais relacionadas ao enfrentamento do estresse (Porsolt et al., 1977; Cryan e Slattery, 2007) e depressão (Porsolt et al., 1977). As sessões foram realizadas em um balde plástico cilíndrico de 45 cm de diâmetro e cheio de água morna (28°C) até um nível de 40 cm de altura. O teste foi realizado em duas sessões com um intervalo de 24 horas entre cada sessão. Na primeira sessão, de treino, os animais foram cuidadosamente colocado no interior do balde com água e deixados lá por 10 minutos. Na segunda sessão de teste, os ratos foram colocados de novo no interior do

balde com água por 5 minutos. Durante cada sessão registrou-se o tempo que os animais gastaram realizando os seguintes comportamentos: (1) escalar, definido como o contato ativo das patas anteriores com o balde; (2) nadar, definido como a tentativa ativa de manter a cabeça fora da água através do movimento das extremidades; (3) imobilidade, registrada quando não foram observados movimentos além daqueles necessários para que o animal mantivesse a cabeça fora da superfície da água (Cryan et al., 2005). Registrou-se também o tempo gasto mergulhando, um comportamento exibido pelos ratos no início da primeira sessão, definido como nadar completamente submerso abaixo do nível da água. Para fins de comparação entre as duas sessões, os comportamentos foram analisados como a porcentagem de tempo da sessão. Após o término do teste, cada rato era retirado da água e enxugado com um pano seco antes de retornar à sua gaiola e a água do balde era trocada antes de se testar o próximo sujeito.

2.2.3. Procedimento

MANIPULAÇÕES NO INÍCIO DE VIDA. No terceiro dia após o nascimento, três filhotes de cada ninhada foram pesados e distribuídos aleatoriamente a um de três grupos (N = 12): (i) animais tratados com LPS nos dias 3 e 5, (ii) animais tratados com a solução veículo nos dias 3 e 5, e (iii) animais sem nenhum tratamento que foram pesados junto com os demais filhotes. Após a injeção do dia 3, todos os filhotes foram identificados com um marcador. Cada filhote foi marcado em uma das patas ou no abdome e as marcas foram refrescadas nos dias 4, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 17 de vida. A partir do dia 18, as marcas foram realizadas com caneta sobre a cauda. Com a finalidade de observar o efeito do tratamento sobre o ganho de peso dos animais, medidas do peso corporal foram feitas antes (dias 11 e 16), durante (dia 21) e depois do desmame (dia 26).

ADMINISTRAÇÃO DE LPS EM NEONATOS. Nos dias 3 e 5 de vida, a mãe foi separada dos filhotes por 10 minutos. Os filhotes foram pesados e, usando-se uma seringa Hamilton com uma agulha hipodérmica de calibre 30, foram tratados com uma injeção intraperitoneal de LPS ou com um volume equivalente de solução tampão fosfato (PBS). A dose de LPS, derivado de *E. coli* (sorotipo O127:B8; L-3129, Sigma, St. Louis, MO, USA), foi de 50 µg/kg dissolvido em PBS estéril em um volume de 100 µl. Estudos prévios mostraram que a dose e o esquema de administração de LPS descrito induz mudanças comportamentais de longo prazo em ratos adultos (Shanks et al., 1995; Breivik et al., 2002; Walker et al., 2004). As injeções de LPS foram administradas entre 9:00 e 12:00 h.

Uma forma de estudar a interação ama-filhote consiste em comparar ninhadas controle com ninhadas experimentais manipulando-se algumas variáveis. No presente estudo, como cada ninhada utilizada estava composta por animais controle e experimentais (filhotes não-injetados ou tratados com PBS e LPS), foi difícil a observação dessa interação. O cuidado materno pode ser afetado pela presença de febre ou comportamento de doença em filhotes, o que pode ser produzidos pela administração de LPS. Embora não tenham sido realizadas observações do comportamento das amas após a administração de LPS nos seus filhotes, Spencer et al (2006) não encontraram diferenças significativas no comportamento das amas no cuidado de filhotes que foram tratados com salina ou com LPS.

2.2.4. Análise de dados

Os dados de ganho de peso após o tratamento foram analisados com uma análise de variância (ANOVA) de dois fatores com medidas repetidas, tendo o tratamento como um fator (três níveis: não tratados x tratados com PBS x tratados com LPS) e os dias nos quais se registrou o peso como o fator de medida repetida (quatro níveis: dias 11 x 16 x 21 x 26). Os dados de ganho de peso no dia 5 de vida, bem como os dados do labirinto em cruz elevado, campo aberto, tábua de buracos, gradiente de aversão elevado e o tempo gasto mergulhando na primeira sessão do nado forçado foram analisados com uma análise de ANOVA de um fator. Como não se observou aderência ao teste de normalidade, os dados do teste de exploração do objeto novo foram analisados com os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. As outras medidas do teste de nado forçado foram analisadas com uma ANOVA de dois fatores com medidas repetidas, tendo tratamento como um fator (três níveis: sem tratamento x tratados com PBS x tratados com LPS) e a sessão como o fator de medidas repetidas (dois níveis: sessão 1 x sessão 2). Sempre que apropriado, foram realizadas comparações *post-hoc* utilizando-se o teste de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas de médias de grupos. Foram calculados coeficientes de correlação de Pearson para alguns dos comportamentos registrados nos aparatos. Em todos os casos, valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos, enquanto valores iguais ou inferiores 0,10 foram considerados tendências. Os resultados foram expressos como média \pm EPM).

2.3. Resultados

2.3.1. Ganho de peso

A Figura 1 mostra os registros de ganho de peso dos animais antes da segunda administração de LPS e depois do tratamento. No quinto dia de vida, os animais que haviam sido tratados com LPS ganharam menos peso do que os animais dos grupos controle.

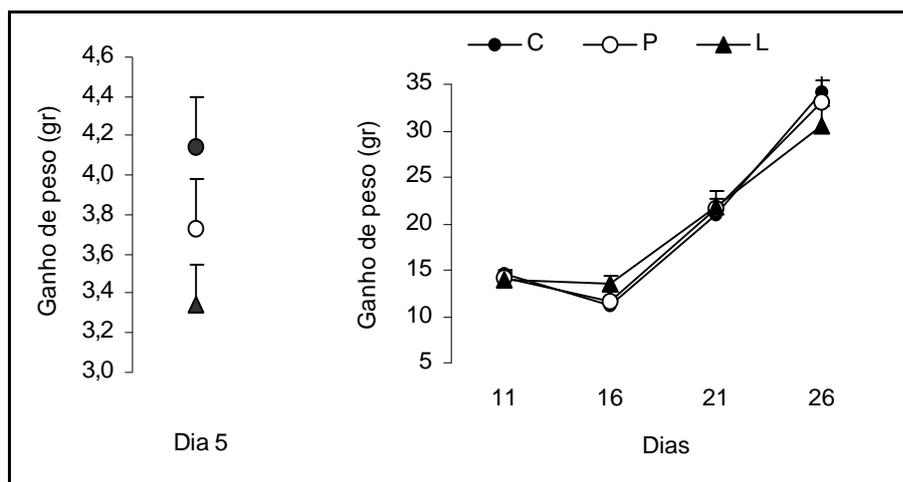


Figura 1. Ganho de peso dos animais tratados com LPS no quinto dia de vida e depois do tratamento.

Os símbolos representam a média dos grupos e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com a solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo.

A ANOVA mostrou uma tendência de diferenças entre as médias dos pesos dos grupos nesse dia ($F_{[2, 33]} = 2,817$, $p = 0,074$). No dia 11 de vida, todos os animais haviam atingido um peso aproximado de 30 gramas e não se observaram diferenças de ganho de peso devido ao tratamento antes (dia 16), durante (dia 21) e depois do desmame (dia 26). A ANOVA de dois fatores não mostrou diferenças no fator tratamento ($F_{[2, 33]} = 0,117$, $p = 0,89$) nem interações entre tratamento e as repetições ($F_{[6, 143]} = 0,718$, $p = 0,636$).

2.3.1. Labirinto em cruz elevado

A Figura 2 ilustra as principais medidas relacionadas à ansiedade, observadas nos braços abertos do aparato. O tratamento precoce com LPS alterou as medidas de ansiedade em ratos adolescentes: a ANOVA mostrou diferenças significativas devido ao tratamento no número de entradas ($F_{[2, 33]} = 5,085$, $p = 0,012$), tempo gasto ($F_{[2, 33]} = 4,556$, $p < 0,018$) e distância percorrida ($F_{[2, 33]} = 4,150$, $p = 0,025$) nessas áreas abertas do aparato. As comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com LPS, entraram mais frequentemente, permaneceram mais tempo e percorreram uma distância maior nos braços abertos, quando comparados com os animais tratados com solução veículo e com os animais do grupo sem tratamento. Embora não se tenha observado diferenças significativas na exploração das extremidades dos braços abertos, os animais tratados com LPS exploraram mais essas áreas comparados com os grupos controles (ver Tabela 1 para valores de F e de p). Finalmente,

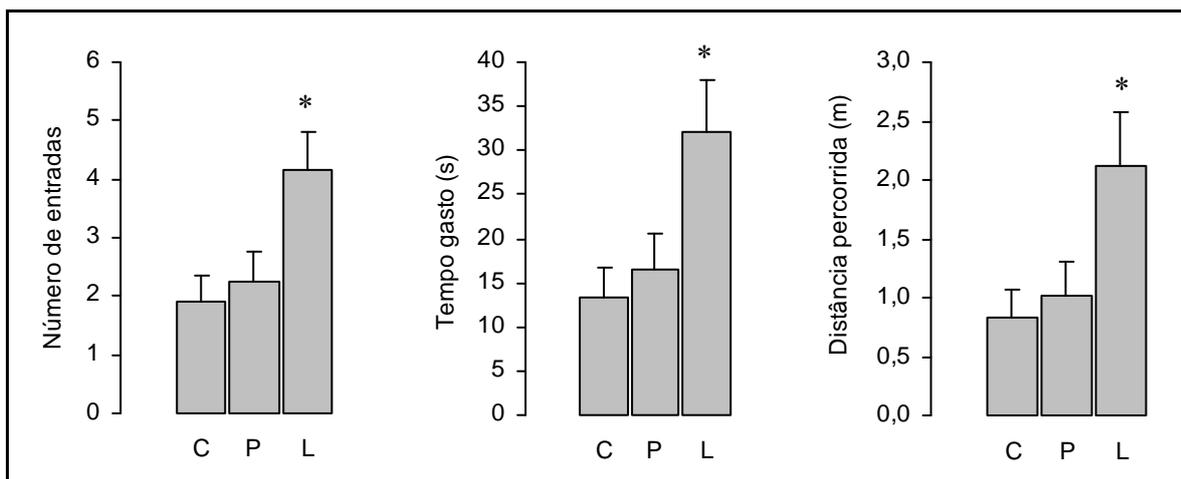


Figura 2. Exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado de ratos adolescentes tratados com LPS nos dias 3 e 5 de vida.

As barras representam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com a solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo. *, Diferente dos grupos C e P (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

quando comparados com os animais sem tratamento, os ratos que receberam injeções na primeira semana de vida, reduziram o tempo gasto esticando-se, mas as diferenças não foram significativas (ver Tabela 1 para valores de F e de p).

A Figura 3 mostra os comportamentos relacionados à locomoção observados nos braços fechados do aparato. A exposição precoce ao LPS alterou o comportamento motor em ratos adolescentes. A ANOVA mostrou diferenças significativas devido ao tratamento no número de entradas ($F_{[2, 33]} = 4,794$, $p = 0,015$), distância percorrida ($F_{[2, 33]} = 6,70$, $p = 0,004$), frequência de levantamentos ($F_{[2, 33]} = 5,240$, $p = 0,011$), bem como o no tempo gasto levantando-se (ver Tabela 1 para valores de F e de p), nessas áreas protegidas do aparato. As comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com LPS, entraram mais vezes, percorreram uma distância maior e realizaram levantamentos mais frequentemente e por mais tempo quando comparados com os animais do grupo controle.

2.3.2. Campo aberto

A Figura 4 ilustra as principais medidas relacionadas à ansiedade e à locomoção no campo aberto. De forma similar ao observado no labirinto em cruz elevado, a estimulação imunológica precoce com LPS alterou as medidas de ansiedade e locomoção na arena. A ANOVA mostrou diferenças significativas devido ao tratamento no tempo gasto na área central ($F_{[2, 33]} = 3,848$, $p = 0,031$) e na distância percorrida ($F_{[2, 33]} = 3,589$, $p = 0,039$) e número de levantamentos na periferia do aparato ($F_{[2, 33]} = 3,965$, $p = 0,029$). As comparações *post-hoc*

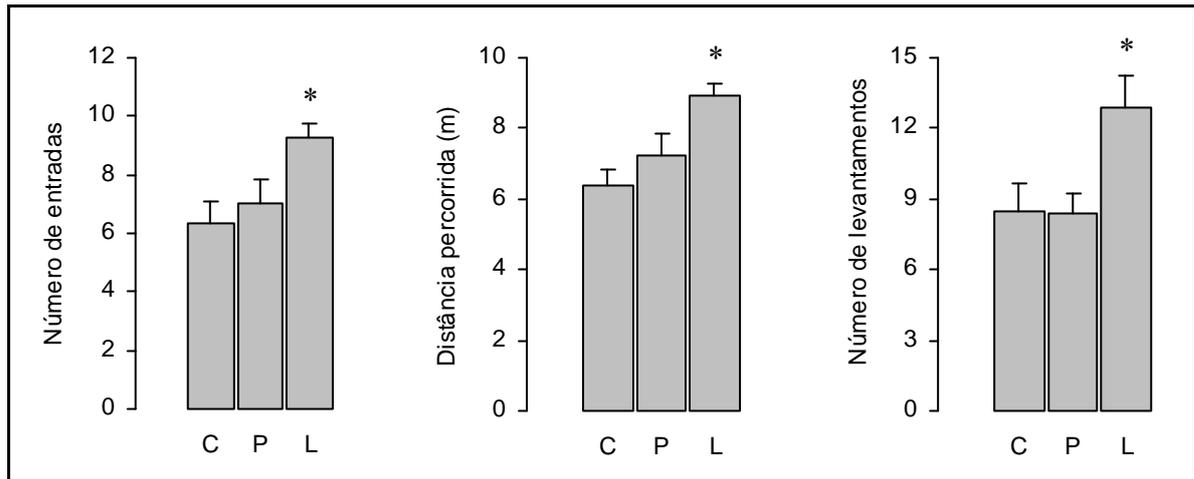


Figura 3. Exploração dos braços fechados do labirinto em cruz elevado de ratos adolescentes tratados com LPS nos dias 3 e 5 de vida.

As barras representam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com a solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo. *,Diferente dos grupos C e P (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

indicaram que os animais tratados com LPS permaneceram mais tempo no centro, percorreram uma distância maior e realizaram mais levantamentos na periferia, quando comparados com os animais tratados com a solução veículo e com aqueles sem tratamento. Não se observaram diferenças significativas na duração dos levantamentos, tempo gasto nas áreas próximas as paredes nem no tempo gasto nos cantos da periferia (ver Tabela 1 para valores de F e p). Considerando que um aumento geral da locomoção poderia influenciar as medidas relacionadas à ansiedade, uma análise de covariância foi aplicada para avaliar a independência da exploração

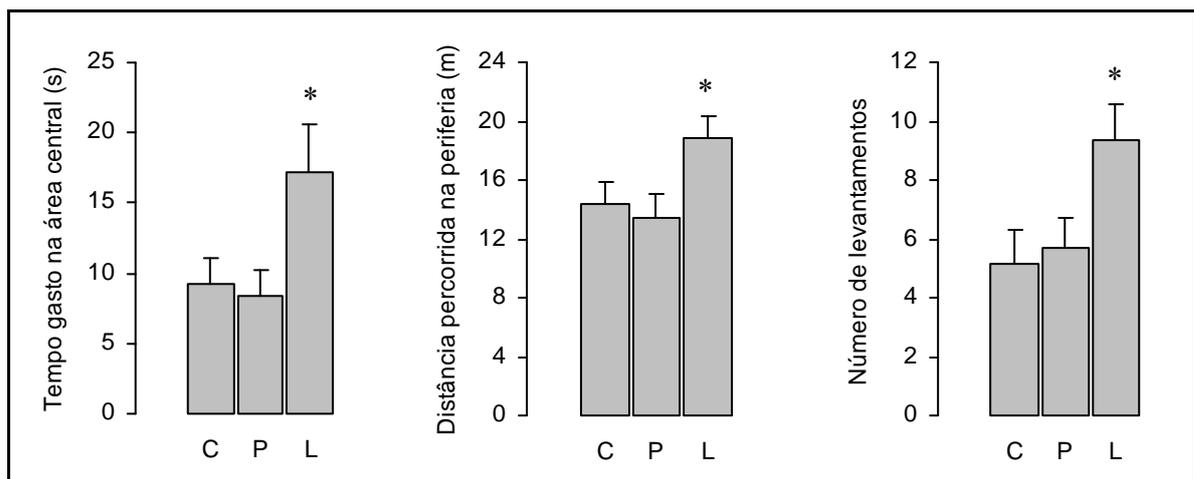


Figura 4. Comportamento exploratório no campo aberto de ratos adolescentes tratados com LPS nos dias 3 e 5 de vida.

As barras representam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com a solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo. *,Diferente dos grupos C e P (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

das áreas abertas da atividade locomotora no labirinto em cruz elevado e no campo aberto. Os resultados mostraram que o efeito ansiolítico do tratamento precoce com LPS, representado pelo aumento do tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz e pelo aumento de tempo gasto no centro da arena, não se manteve em relação ao aumento do número de entradas nos braços fechados do labirinto ($F_{[2, 32]} = 1,831$, n.s) nem ao aumento da distância percorrida na periferia do campo aberto ($F_{[2, 32]} = 1,584$, n.s).

Tabela 1. Comportamento exploratório de ratos adolescentes no labirinto em cruz elevado, campo aberto e gradiente de aversão elevado.

C, animais sem tratamento; P, animais tratados com a solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo. *, Diferente dos grupos C e P (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

Parâmetros	Tratamento			ANOVA	
	C	P	L	$F_{[2,33]}$	p
<i>Labirinto em cruz elevado</i>					
Entradas nas extremidades abertas	0,75 ± 0,30	1,17 ± 0,42	2,08 ± 0,58	2,279	0,118
Tempo nas extremidades abertas (s)	3,38 ± 1,28	5,80 ± 2,43	9,43 ± 3,10	1,579	0,221
Frequência de esticar-se	7,83 ± 1,36	5,92 ± 0,85	8,50 ± 1,18	1,360	0,271
Tempo gasto esticando-se (s)	17,5 ± 3,44	11,1 ± 1,98	13,5 ± 1,61	1,755	0,189
Tempo gasto levantando-se (s)	8,75 ± 1,46	6,91 ± 0,96	13,0 ± 1,33*	6,111	0,006
<i>Campo aberto</i>					
Tempo nas áreas próximas às paredes (s)	73,8 ± 13,7	57,0 ± 6,92	79,8 ± 5,67	1,572	0,223
Tempo nos cantos (s)	216,8 ± 15,0	234,6 ± 7,91	203,0 ± 6,83	2,259	0,120
Tempo levantando-se (s)	4,61 ± 1,52	4,38 ± 0,99	7,85 ± 1,49	2,067	0,143
<i>Gradiente elevado de aversão</i>					
Entradas no braço fechado	2,50 ± 0,38	2,58 ± 0,43	2,83 ± 0,41	0,182	0,835
Tempo no braço fechado (s)	28,72 ± 3,75	26,3 ± 4,68	30,2 ± 6,09	0,156	0,856
Distância total percorrida (m)	8,79 ± 0,73	8,87 ± 0,65	10,2 ± 0,63	1,462	0,246
Levantamentos no túnel e braço fechado	4,75 ± 0,94	5,08 ± 0,78	8,33 ± 1,03*	4,594	0,017
Tempo área de transição túnel-fechado (s)	36,72 ± 5,54	34,6 ± 5,19	26,4 ± 4,48	1,135	0,334

2.3.3. Teste de exploração de objeto novo

A Tabela 2 resume as medidas do comportamento exploratório de ratos adolescentes no teste de exploração de objeto novo. A administração precoce de LPS alterou a exploração dos estímulos novos introduzidos no campo aberto. Na sessão de aquisição, o teste Kruskal-Wallis mostrou diferenças significativas no tempo gasto pelos animais explorando os dois objetos, bem como no tempo gasto explorando separadamente o objeto direito e o objeto esquerdo (ver Tabela 2 para valores de H e p). As comparações *post-hoc* mostraram que os ratos tratados com LPS gastaram mais tempo que os ratos controle explorando os dois objetos e cada um deles em separado. Na sessão de teste, onde um objeto agora familiar (lado esquerdo) e outro completamente novo (lado direito) foram apresentados, o teste Kruskal-Wallis mostrou diferenças no tempo gasto explorando o objeto familiar, mas não o objeto novo (ver Tabela 2 para valores de H e p). As comparações *post-hoc* mostraram que, quando comparados com os

Tabela 2. Comportamento exploratório de ratos adolescentes no teste de reconhecimento de objeto.

C, animais sem tratamento; P, animais tratados com a solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo. *,Diferente dos grupos C e P (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

Parâmetros	Tratamento			Kruskal-Wallis	
	C	P	L	$H_{[2]}$	p
<i>Sessão de aquisição</i>					
Tempo explorando os dois objetos (s)	3,75 ± 1,70	5,61 ± 2,28	14,9 ± 3,67*	8,902	0,012
Tempo explorando o objeto esquerdo (s)	2,03 ± 1,04	2,81 ± 1,35	8,00 ± 2,09*	7,398	0,025
Tempo explorando o objeto direito (s)	1,71 ± 0,73	2,78 ± 1,11	6,91 ± 1,85*	7,487	0,024
Frequência de levantamentos	3,75 ± 1,14	4,33 ± 1,13	9,33 ± 1,29*	9,723	0,008
<i>Sessão de teste</i>					
Tempo explorando os dois objetos (s)	6,99 ± 1,99	5,78 ± 1,80	16,5 ± 3,91	5,701	0,058
Tempo explorando o objeto esquerdo (s)	2,83 ± 1,10	1,65 ± 0,53	6,39 ± 1,78*	6,544	0,038
Tempo explorando o objeto direito (s)	4,15 ± 1,25	4,12 ± 1,31	10,2 ± 3,08	4,275	0,118
Frequência de levantamentos	4,25 ± 0,97	3,92 ± 0,93	7,67 ± 0,80*	8,582	0,014

controles, os animais tratados com LPS gastaram mais tempo explorando o objeto familiar (ver Tabela 2 para valores de H e p). A administração precoce de LPS alterou também o comportamento de levantar-se. O teste Kruskal-Wallis mostrou diferenças no número de levantadas durante a sessão de aquisição e a sessão de teste e as comparações *post-hoc* mostraram que os animais tratados com LPS levantaram-se mais do que os animais dos grupos controle (ver Tabela 2 para valores de H e p).

A Figura 5 ilustra os índices de reconhecimento para cada grupo de animais na sessão de aquisição e de teste. O tratamento precoce com LPS não alterou a preferência por nenhum dos dois objetos durante a sessão de aquisição, nem a preferência pelo objeto novo durante a sessão de teste. O teste Kruskal-Wallis não mostrou diferenças significativas devido ao tratamento nos índices de reconhecimento calculados na sessão de aquisição ($H_{[2]} = 3,338$, $p = 0,184$) nem na sessão de teste ($H_{[2]} = 0,264$, $p = 0,876$). Não se observaram mudanças nos índices de reconhecimento de uma sessão para outra em cada um dos grupos. O teste de Mann-Whitney não mostrou diferenças significativas entre os índices de reconhecimento da sessão de aquisição e os índices da sessão de teste, no grupo de animais tratados com LPS ($U = 85,500$, $p = 0,452$), nem no grupo controle veículo ($U = 80,500$, $p = 0,634$) e controle sem tratamento ($U = 94,000$, $p = 0,191$).

2.3.4. Tábua de buracos

A Figura 6 mostra as medidas de atividade exploratória e locomoção na tábua de buracos. O tratamento precoce com LPS alterou a atividade exploratória geral e a exposição ao risco. A ANOVA mostrou diferenças devido ao tratamento na exploração dos quatro buracos

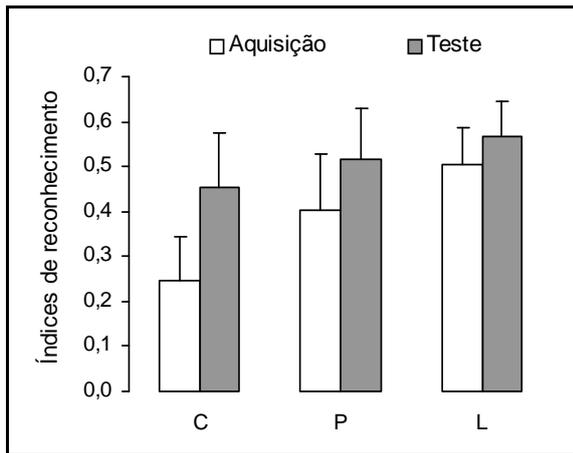


Figura 5. Índices de reconhecimento no teste de reconhecimento de objeto novo de ratos adolescentes tratados com LPS nos dias 3 e 5 de vida.

As barras brancas representam as médias da sessão de aquisição e as barras cinzas as médias da sessão de teste. As linhas verticais indicam o E.P.M.

dos cantos do aparato ($F_{[2, 33]} = 13,954, p = 0,001$) e do buraco central ($F_{[2, 33]} = 5,649, p = 0,008$). As comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com LPS aumentaram significativamente o número de mergulhos de cabeça nos quatro buracos e no buraco central do aparato, comparados com os animais dos grupos controle. A ANOVA mostrou também diferenças no número de levantamentos ($F_{[2, 33]} = 6.063, p = 0,01$) e as comparações *post-hoc* mostraram que os ratos tratados com LPS exibiram mais levantamentos do que os animais dos grupos controle.

2.3.5. Gradiente de aversão elevado

A Figura 7 ilustra as medidas de exploração do braço aberto do gradiente de aversão elevado, relacionadas aos índices de comportamento impulsivo. A estimulação imunológica

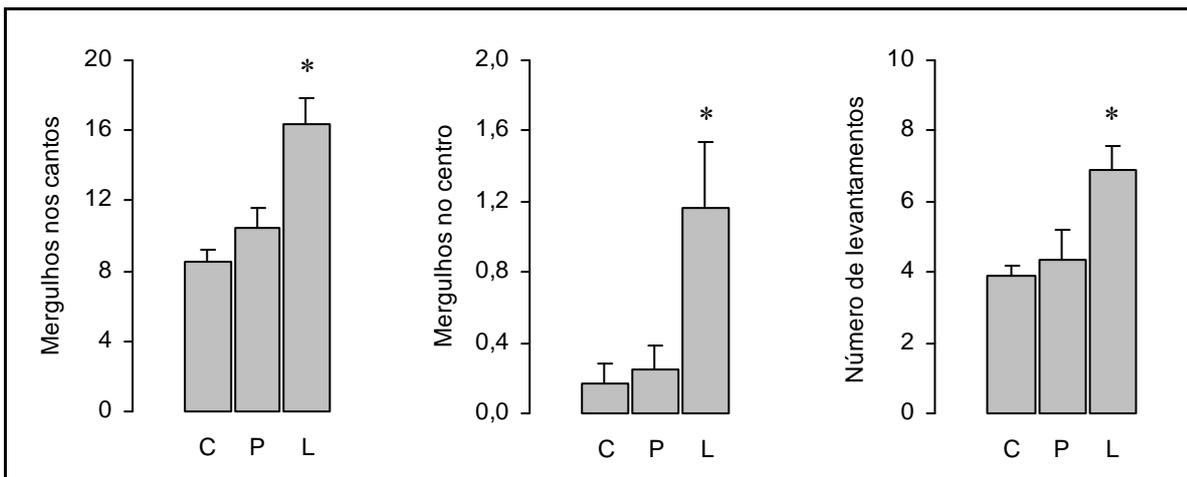


Figura 6. Comportamento exploratório na tábua de buracos de ratos adolescentes tratados com LPS nos dias 3 e 5 de vida.

As barras representam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com a solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo. *,Diferente dos grupos C e P (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

precoce com LPS alterou as medidas relacionadas com impulsividade em ratos adolescentes. A ANOVA mostrou diferenças significativas no número de entradas ($F_{[2, 33]} = 4,219, p = 0,023$), tempo gasto ($F_{[2, 33]} = 6,441, p = 0,004$) e latência de entrada ($F_{[2, 33]} = 4,263, p = 0,023$) no braço aberto ao final da pista do aparato. As comparações *post-hoc* mostraram que, quando comparados com os animais dos grupos controle, os ratos tratados com LPS aumentaram significativamente o número de entradas e o tempo gasto no braço aberto e diminuíram o tempo gasto para realizar a primeira entrada nessa área. A ANOVA mostrou também diferenças significativas no número de levantadas nas áreas protegidas do aparato e as comparações *post-hoc* mostraram que os animais tratados com LPS aumentaram a frequência de levantadas quando comparados com os animais dos grupos controle (ver Tabela 1 para valores de F e p). Não se observaram diferenças no número de entradas e tempo gasto no braço fechado, distância total percorrida, nem no tempo gasto na área de transição túnel-braço fechado (ver Tabela 1 para valores de F e p).

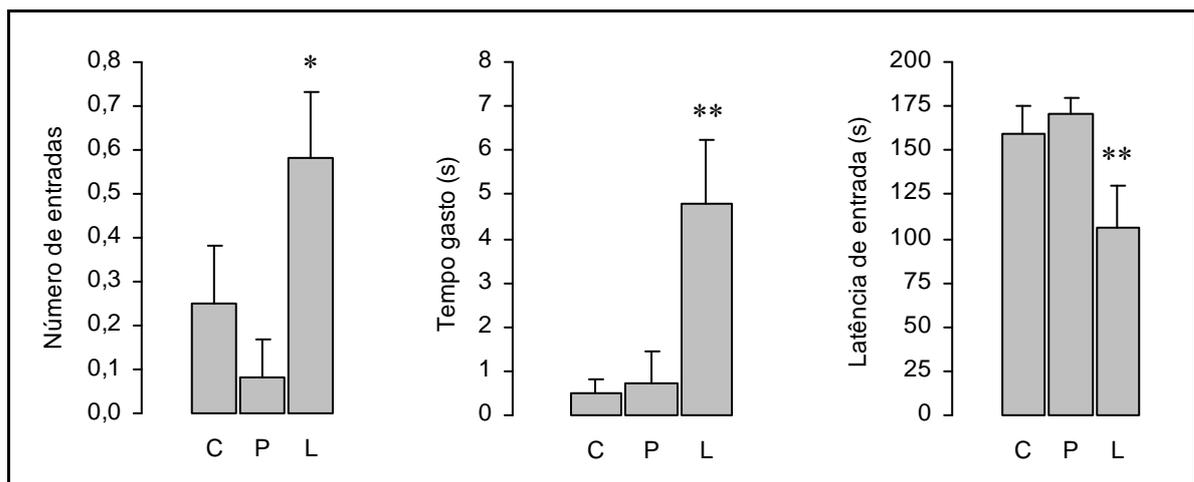


Figura 7. Exploração do braço aberto do Gradiente de Aversão Elevado de ratos adolescentes tratados com LPS nos dias 3 e 5 de vida.

As barras representam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com a solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo *. Diferente do grupo P; **, Diferente dos grupos C e P (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

2.3.6. Nado forçado

A Figura 8 ilustra os comportamentos observados nas duas sessões do teste do nado forçado. A ANOVA de dois fatores com medidas repetidas mostrou diferenças significativas no fator sessão, tanto na porcentagem de tempo que os animais gastaram escalando ($F_{[1, 33]} = 10,403, p = 0,002$), quanto na porcentagem de tempo que permaneceram imóveis ($F_{[1, 33]} = 14,007, p < 0,001$). As comparações *post-hoc* mostraram que, comparados com a primeira sessão, os animais de todos os grupos escalaram durante mais tempo na segunda sessão e

permaneceram menos tempo imóveis. Não se observaram diferenças significativas devidas ao tratamento com LPS nas medidas relacionadas ao enfrentamento do estresse. A ANOVA não mostrou diferenças na porcentagem de tempo gasto nadando ($F_{[2, 33]} = 0,216, p = 0,806$), escalando ($F_{[2, 33]} = 0,291, p = 0,748$) nem permanecendo na postura imóvel ($F_{[2, 33]} = 0,449, p = 0,641$). Não foram observadas interações significativas entre os dois fatores nos três comportamentos anteriores. O tratamento precoce com LPS alterou o comportamento de mergulhar em ratos adolescentes expostos à primeira sessão do nado forçado. A ANOVA de um fator mostrou diferenças significativas no tempo que os animais gastaram mergulhando ($F_{[2, 33]} = 6,913, p = 0,003$) e as comparações *post-hoc* mostraram que os animais tratados com LPS permaneceram durante mais tempo nadando completamente submerso abaixo do nível da água quando comparados com os animais dos grupos controle.

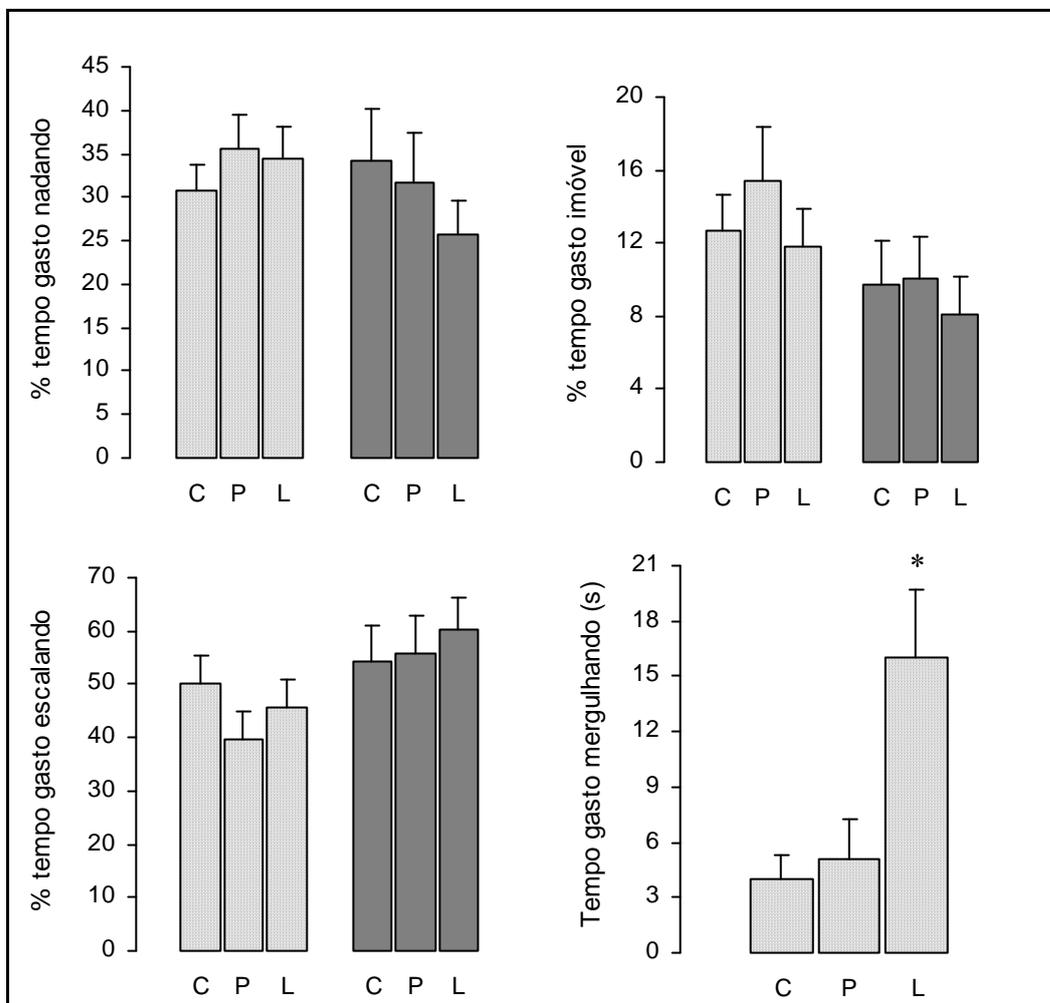


Figura 8. Comportamentos no teste de nado forçado de ratos adolescentes tratados com LPS nos dias 3 e 5 de vida.

As barras claras representam as médias da primeira sessão e as barras cinzas as médias da segunda sessão. As linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com a solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo *, Diferente dos grupos controle C e P (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

Algumas das medidas comportamentais, registradas no grupo de animais tratados com LPS, correlacionaram-se de forma significativa e positiva com medidas comportamentais registradas em outros testes. Os coeficientes de correlação de Pearson mostraram que o aumento de imobilidade, nas duas sessões do nado forçado, estava relacionado ao aumento do número de cruzamentos e do tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, bem como ao aumento do tempo gasto explorando o objeto novo no teste de exploração de objeto (ver Tabela 3 para valores de r e p). Os coeficientes de correlação de Pearson mostraram também que o aumento do tempo nadando abaixo do nível da água estava relacionado ao aumento do tempo gasto na área central do campo aberto, bem como ao aumento de mergulhos de cabeça nos buracos da periferia da tábua de buracos (ver Tabela 3 para valores de r e p).

Tabela 3. Coeficientes de correlação de Pearson entre medidas comportamentais observadas no grupo de ratos adolescentes tratados com LPS. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$

<i>Medidas obtidas em outros testes</i>	<i>Nado Forçado</i>		
	% de tempo gasto imóvel		Tempo gasto mergulhando
	Sessão 1	Sessão 2	Sessão 1
Tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (s)	0,64*	0,73**	
Cruzamentos nos braços abertos do labirinto em cruz elevado	0,64*	0,70**	
Tempo na área central do campo aberto (s)			0,81**
Tempo explorando o objeto novo na sessão de teste (s)	0,71**	0,71**	
Mergulhos nos cantos da periferia da tábua de buracos			0,58*

2.4. Discussão

A administração de LPS no terceiro dia de vida não alterou significativamente o ganho de peso dos animais no quinto dia de vida nem semanas depois do tratamento. Consistente com esses dados, Walker et al., (2009) também não observaram diferenças significativas no ganho de peso dos filhotes devidas ao tratamento com LPS.

Os resultados obtidos na bateria de testes comportamentais mostraram que os ratos tratados com LPS exibiram aumento da atividade exploratória. Nos testes de ansiedade, os ratos adolescentes do grupo tratado com LPS mostraram incrementos nas medidas correlacionadas com diminuição da ansiedade. Por exemplo, exibiram aumento da frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, juntamente com aumento do tempo gasto na área central do campo aberto. Não obstante à ausência de diferenças significativas, é interessante notar que, quando comparados com os animais que não receberam

injeções (não tratados), os que receberam qualquer injeção (seja PBS ou LPS), reduziram o tempo gasto se esticando. Esticar-se é um comportamento relacionado a avaliação de risco e pode ser observado nos braços fechados do labirinto em cruz elevado (Wall e Messier, 2001). É possível que a exposição a duas punções na primeira semana de vida seja um evento estressante que pode resultar em mudanças sutis no comportamento. Suchecki e Tufik (1997) observaram diferenças comportamentais entre filhotes expostos a injeções e filhotes não tratados. No entanto, é difícil determinar se as mudanças sutis no comportamento estão associadas a efeitos imunológicos.

Os resultados observados no labirinto em cruz elevado não concordam com os dados descritos por Walker et al (2004). Esses autores não observaram diferenças nas medidas relacionadas com ansiedade em ratos adolescentes que haviam sido tratados também nos dias 3 e 5 de vida com a endotoxina. Levando-se em consideração que no estudo de Walker foram utilizados ratos Fisher 344, uma linhagem caracterizada por uma alta resposta hipotalâmica (Misiewicz et al., 1996a; 1996b), é possível supor que as diferenças observadas estejam associadas a um efeito da linhagem. Por outra parte, os dados deste estudo concordam com os resultados de Fan et al (2008), mostrando que a administração intracerebral de LPS em filhotes, resulta posteriormente, em diminuição das medidas relacionadas a ansiedade em ratos jovens testados no labirinto em cruz elevado. Esses dados sugerem que o efeito da administração de LPS sobre o comportamento pode ocorrer em estágios iniciais do desenvolvimento de ratos.

Os resultados obtidos nos testes de ansiedade sugerem também que a exposição ao LPS na primeira semana de vida incrementa a atividade locomotora de ratos na adolescência. Comparados com os animais dos grupos controle, os ratos tratados com LPS percorreram maiores distâncias nos braços fechados do labirinto em cruz elevado e na periferia do campo aberto. Os dados apresentados também coincidem com os resultados de Fan et al (2008). Nesse trabalho, os autores observaram que filhotes expostos ao LPS mostravam, nos dias 13 a 17 de vida, hiperatividade no campo aberto quando comparados com os animais do grupo controle. No campo aberto, não foram observadas diferenças devidas ao tratamento no tempo gasto nos cantos nem nas áreas próximas às paredes da periferia. Sugere-se que a diminuição da ansiedade e a hiperatividade na arena são independentes da tigmotaxia, um comportamento específico da espécie caracterizado pela tendência de permanecer próximo de superfícies verticais (Lamprea et al., 2008).

A interpretação das medidas de ansiedade, nos dois modelos anteriores, considera também as medidas relacionadas à locomoção. Por exemplo, se após um determinado tratamento, os animais expostos ao labirinto em cruz elevado aumentam a exploração dos

braços abertos sem exibir alterações nas medidas de locomoção, é possível afirmar que esse tratamento teve um efeito ansiolítico (Estanislau e Morato, 2006). Os dados deste experimento mostraram que os ratos tratados com LPS e expostos aos testes de ansiedade exibiram aumento de locomoção e da exploração das áreas menos protegidas dos aparatos. A análise de covariância mostrou que o aumento geral da locomoção no labirinto em cruz elevado, poderia explicar em parte, o aumento da exploração dos braços abertos nesse teste. Assim, poder-se-ia sugerir que o tratamento precoce com LPS resulta, mais que um efeito ansiolítico, em um padrão de comportamento caracterizado por hiperatividade e baixa avaliação de risco, quando os animais atingem a adolescência.

Os dados obtidos no teste de reconhecimento de objeto novo sugerem que o tratamento precoce com LPS pode resultar em diminuição da neofobia e aumento da locomoção. Os ratos tratados com LPS aumentaram a exploração de novos estímulos e levantaram-se mais frequentemente na sessão de aquisição, quando comparados com os animais dos grupos controle. Um padrão comportamental semelhante foi observado na segunda sessão, quando os ratos foram confrontados com um objeto familiar e um objeto novo. Nesta segunda sessão, os animais tratados com LPS também aumentaram a frequência de levantamentos e gastaram mais tempo explorando o objeto familiar. Esses resultados foram consistentes com o perfil comportamental que os mesmos animais exibiram em resposta à novidade nos testes de ansiedade: elevada exploração das áreas não protegidas e hiperatividade.

Embora os ratos tratados com LPS tivessem gastado mais tempo explorando os dois objetos, não se observaram diferenças significativas devido ao tratamento nos índices de reconhecimento calculados. Não houve uma preferência pelo objeto do lado direito ou do lado esquerdo durante a sessão de aquisição nem durante a sessão de teste. Esses resultados sugerem que não houve um viés de preferência pelo objeto direito ou esquerdo na sessão de aquisição, e que não houve um comprometimento da memória. Esses dados concordam com os resultados de Jenkins et al (2009), mostrando que a exposição precoce ao LPS não produz deterioração da memória na adolescência. Contudo, não se observaram diferenças nos índices de reconhecimento nos grupos de animais controle quando estes foram comparados entre as sessões de aquisição e de teste. Dessa forma, as possíveis conclusões do efeito de insultos imunológicos precoces sobre a memória são restringidas. A tarefa de reconhecimento de objeto requer que os animais discriminem qual o estímulo ao qual foram previamente expostos. Após uma sessão de 5 minutos de aquisição, a recuperação dessa informação foi avaliada 24 horas depois. É possível que o intervalo entre as duas sessões fosse extenso o suficiente para comprometer a recuperação dessa informação.

O comportamento exploratório no teste da tábua de buracos consiste principalmente em mergulhar a cabeça dentro dos buracos localizados no piso do aparato, um comportamento relacionado à exploração direcionada (File e Wardill, 1975). Os animais tratados com LPS aumentaram a exploração dirigida aos buracos dos cantos e exibiram mais aproximações ao centro do aparato. Esses resultados do presente experimento são os primeiros na literatura mostrando o efeito da administração precoce de LPS sobre o comportamento de ratos adolescentes na tábua de buracos. Ainda sem critérios de comparação com outros estudos, os animais tratados com LPS mantiveram o perfil comportamental de alta atividade exploratória, exibido nos testes anteriores ao da tábua de buracos.

O gradiente de aversão elevado permite obter índices de impulsividade a partir da exploração forçada de um ambiente novo (ver validação nos anexos). Comparados com os animais dos grupos controle, os animais tratados com LPS exibiram aumentos significativos nas medidas relacionadas com a impulsividade. Esses animais demoraram menos para entrar pela primeira vez no braço aberto e nele exploraram mais. Além disso, esses animais levantaram-se mais frequentemente, uma medida que nesse aparato parece estar relacionada à diminuição da avaliação de risco. Os resultados obtidos neste teste sugerem que uma infecção precoce pode ser um fator importante para o desenvolvimento do comportamento impulsivo na adolescência. De outro lado, considerando que, no gradiente de aversão elevado, os animais tratados com LPS exibiram um padrão de comportamento semelhante ao observado nos outros testes (aumento de busca de novidade e de exposição ao risco), os resultados sugerem também a utilidade do teste para se obter índices de impulsividade em sessões experimentais de curta duração.

Um resultado bastante interessante obtido no teste de nado forçado foi a diferença entre os grupos na medida do tempo gasto mergulhando. Comparados com os animais dos grupos controle, os animais tratados com LPS gastaram mais tempo nadando embaixo da água. Além disso, correlações positivas foram obtidas entre o comportamento de mergulhar e a exploração da área central do campo aberto e dos buracos da periferia da tábua de buracos. No teste do nado forçado observaram-se os comportamentos de escalar e permanecer imóvel que, respectivamente, representam um estilo ativo ou passivo de lidar com a situação estressante. Um comportamento ativo como escalar, pode levar ao escape da situação aversiva, enquanto um comportamento passivo como a postura imóvel, permite preservar energia que pode ser utilizada quando e se aparecer uma chance de escapar (Cryan et al., 2005). Embora o comportamento de mergulhar não se altere após tratamento farmacológico (Cryan et al., 2005), nem se correlacione com o tempo de imobilidade (Tõnissaar et al., 2008), as correlações

observadas neste estudo sugerem que esse comportamento representa, possivelmente, um estilo ativo de enfrentar a situação de estresse. A exploração do fundo do balde, realizada através de mergulhos, poderia levar os animais a encontrar uma saída abaixo do nível da água. Como não existe tal possibilidade de fuga, esse comportamento se extingue rapidamente e não se observa nos minutos finais da sessão de treino nem durante a sessão de teste, 24 horas depois.

Embora não se observaram diferenças devido ao tratamento sobre o tempo de imobilidade, ao analisar as correlações entre as medidas obtidas nos outros testes e o tempo gasto na postura imóvel, determinou-se um padrão de comportamento nos animais do grupo tratado com LPS. Os ratos tratados com LPS que exibiram aumento da exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado, bem como aumento da exploração do objeto novo no teste de reconhecimento de objeto, foram por sua vez os animais que passaram mais tempo imóveis nas duas sessões do nado forçado. Os resultados sugerem que os animais tratados com LPS, que assumem maior risco e procuram mais novidade, exibem inicialmente estratégias ativas de escape. Porém, quando expostos durante um tempo prolongado, ou re-expostos à situação de estresse, adotam um estilo passivo para lidar com a situação.

A administração de LPS nos dias 3 e 5 de vida alterou o comportamento de levantar-se em ratos adolescentes. Comparados com os animais dos grupos controle, os ratos tratados com LPS exibiram um aumento da frequência de levantamentos nos testes de ansiedade, nas duas sessões do teste de reconhecimento de objeto novo, na tábua de buracos e no gradiente de aversão elevado. O comportamento de levantar-se está relacionado à atividade exploratória, e juntamente com o comportamento locomotor, pode servir como uma medida para diferenciar um perfil de alta ou baixa resposta a ambientes novos em ratos (Pawlak e Schwarting, 2002; Thiel et al., 1999). Os resultados sugerem que a estimulação imunológica precoce pode explicar em parte as diferenças individuais no comportamento exploratório, e que essas diferenças podem ser observadas no aumento da frequência de levantadas.

De forma geral, os animais tratados com LPS exibiram um perfil comportamental caracterizado por aumento de locomoção e impulsividade na adolescência. Esses resultados são diferentes dos dados relatados em animais adultos. Os ratos adultos tratados precocemente com LPS exibem aumento nas medidas relacionadas com ansiedade (Breivik et al, 2002; Walker et al., 2004) e diminuição da atividade locomotora (Jenkins et al., 2009). Uma possível explicação para essas diferenças comportamentais nas diferentes etapas do desenvolvimento poderia ser a interação entre a ontogenia do sistema dopaminérgico e a estimulação imunológica no início de vida. De um lado, sabe-se que os receptores de dopamina no cérebro são expressados em excesso antes da puberdade e a sua densidade diminui na fase adulta (Teicher et al., 1995;

Andersen et al., 2000). Também se demonstrou que a ativação dos receptores de dopamina D1 têm um papel importante no comportamento de busca de novidade (Bardo et al., 1996), e que um aumento relacionado à idade nesses receptores poderia explicar a elevada procura por novidade na puberdade (Teicher et al., 1995; Gelbard et al., 1989). De outro lado, sabe-se que a administração precoce de LPS produz a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Fan et al., 2005; Pang et al., 2003). Além do seu principal papel na proliferação de linfócitos na periferia, as citocinas também modulam a diferenciação neuronal (Marx et al., 2001) e o crescimento dendrítico (Gilmore et al., 2004). Além disso, mostrou-se que a ativação imunológica precoce por agentes virais ou bacterianos afeta a função dopaminérgica em ratos adultos (Fortier et al., 2004; Zuckerman et al., 2003) e em ratos jovens (Fan et al., 2008). Assim, é possível sugerir que a exposição ao LPS no início de vida poderia alterar o desenvolvimento normal do sistema dopaminérgico, e essa alteração poderia estar associada com o aumento da atividade exploratória na adolescência, comparado com a fase adulta.

No conjunto, os achados do primeiro experimento sugerem que a inoculação de LPS nos dias 3 e 5 de vida pode produzir alterações a longo prazo no comportamento exploratório. Essas alterações são evidentes no aumento da atividade exploratória e nas estratégias de enfrentamento do estresse. Os resultados sugerem que a inoculação precoce de LPS pode ser um fator importante associado ao comportamento impulsivo. Contudo, os efeitos comportamentais desse tipo de estresse precoce parecem evidenciar-se especificamente na adolescência.

3. Experimento 2 - Comportamento exploratório de ratos adolescentes expostos a uma inoculação intensa de LPS no início de vida

3.1. Introdução

A primeira semana de vida é um período crucial do desenvolvimento. Neurotransmissores como GABA e catecolaminas (Herlenius e Lagercrantz, 2001), bem como componentes do sistema de resposta ao estresse (Levine, 2005) são funcionalmente imaturos no momento do nascimento e continuam a desenvolver-se a partir desse período. Essas mudanças do sistema nervoso podem ser potencialmente influenciadas pela inoculação de LPS, o que resulta em alterações duradouras no comportamento. O efeito a longo prazo da infecção parece depender do momento e do número de exposições ao agente infeccioso durante a primeira semana de vida. Além das consequências já mencionadas da exposição ao LPS nos dias 3 e 5 de vida, em outros estudos tem-se avaliado os efeitos da infecção precoce em paradigmas diferentes de administração. Por exemplo, ratos adultos que foram tratados com endotoxina nos dias 4 e 5 de vida exibem alterações comportamentais e cognitivas (Kohman et al., 2008). No mesmo sentido, um único episódio de infecção pode resultar também em mudanças duradouras no comportamento, igual a quando os animais são tratados no quarto (Bilbo et al., 2005; 2008; 2010), ou quinto dia de vida (Harré et al., 2008). Contudo, poucos estudos têm investigado os efeitos a longo prazo da inoculação prolongada e precoce de LPS e, até onde se conhece na literatura, nenhum estudo avaliou os efeitos de uma inoculação repetida de LPS no início de vida sobre o comportamento de ratos adolescentes.

3.1.1. Objetivo

Considerando que a administração do LPS nos dias 3 e 5 de vida resulta em aumento da atividade exploratória e de comportamentos relacionados a impulsividade em ratos adolescentes (Rico et al., 2010), no presente experimento testou-se a hipótese de que uma inoculação intensa durante a primeira semana de vida (do dia 2 ao dia 7 após o nascimento) poderia, ainda mais, resultar em aumento da atividade exploratória em ratos adolescentes.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Sujeitos

Foram utilizadas quatro ninhadas de ratos Wistar compostas por uma ama-de-leite e nove filhotes machos de um dia de idade, provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. As condições de manutenção foram semelhantes às descritas no Experimento 1.

3.2.2. Equipamento

Foram utilizados os mesmos aparatos descritos no Experimento 1 para execução dos seis testes: labirinto em cruz elevado, campo aberto, exploração de objeto novo, tábua de buracos, gradiente de aversão elevado e nado forçado.

3.2.3. Procedimento

MANIPULAÇÕES NO INICIO DE VIDA. No segundo dia após o nascimento, três filhotes de cada ninhada foram pesados e atribuídos aleatoriamente a um de três grupos (N = 12): (i) animais tratados com LPS nos dias 2, 3, 4, 5, 6 e 7 de vida, (ii) animais tratados com a solução veículo nos dias 2 a 7 de vida, e (iii) animais que não receberam nenhum tratamento e que foram pesados juntamente com os demais filhotes entre os dias 2 a 7 de vida. Todos os filhotes foram identificados individualmente com um marcador. Cada filhote foi marcado em uma das suas patas ou no abdômen e as marcas foram refrescadas nos dias 3, 5, 7, 8, 9, 10, 12 e 16 de vida. A partir do dia 18, as marcas foram realizadas com caneta sobre a cauda. Com a finalidade de observar o efeito do tratamento sobre o ganho de peso dos animais, registros de peso foram obtidos antes (dias 11 e 16), durante (dia 21) e depois do desmame (dia 26).

ADMINISTRAÇÃO DE LPS EM NEONATOS. Nos dias 2, 3, 4, 5, 6 e 7, a ama foi separada dos filhotes por 10 minutos. Os filhotes foram pesados e, usando-se uma seringa Hamilton com uma agulha hipodérmica de calibre 30, tratados com uma injeção intraperitoneal de LPS ou com um volume equivalente de solução tampão fosfato (PBS). A dose de LPS (derivado de *E. coli* serotipo O127:B8; L-3129, Sigma, St. Louis, MO, USA) foi de 50 µg/kg dissolvido em PBS estéril em um volume de 100 µl. As injeções de LPS foram administradas entre 9:00 e 12:00 h.

TESTES COMPORTAMENTAIS. Os procedimentos dos seis testes comportamentais (labirinto em cruz elevado, campo aberto, exploração de objeto novo, tábua de buracos, gradiente de aversão elevado e nado forçado) foram idênticos aos descritos no Experimento 1.

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS 1 E 2. Uma vez observado o efeito da administração repetida de LPS no início de vida sobre a resposta emocional de ratos adolescentes, foram realizadas comparações entre os resultados do presente experimento e os obtidos no Experimento 1. Considerando que (1) cada grupo de animais utilizado neste trabalho foi submetido a um tipo de manipulação precoce diferente e que (2) uma manipulação prolongada dos filhotes no início de vida pode alterar a resposta emocional a longo prazo de forma semelhante a uma infecção precoce, a comparação entre os resultados dos dois experimentos teve como objetivo analisar o efeito de variações nesse tipo de manipulação sobre a resposta emocional à novidade na adolescência. Para esse fim, os principais comportamentos relacionados a ansiedade, locomoção, resposta a novos estímulos, exploração direcionada, impulsividade e estilos de enfrentamento do estresse foram comparados entre os seis grupos de animais utilizados nos dois experimentos. A nomenclatura usada consistiu em uma letra acompanhada de um número. A letra indicava o tipo de manipulação precoce à qual os filhotes foram expostos: C, animais separados da sua ama durante 10 min para o procedimento de pesagem e marcação; P, animais separados da sua ama durante 10 min para o procedimento de pesagem e tratados com injeções intraperitoniais de solução veículo PBS; e L, animais separados da sua ama durante 10 min para o procedimento de pesagem e marcação e a inoculação de LPS. Os números 2 ou 6 indicavam o número de vezes que os filhotes foram expostos a esse tipo de manipulação: respectivamente, animais tratados nos dias 3 e 5 de vida e nos dias 2 a 7 de vida.

3.2.4. Análise de dados

Os dados de ganho de peso foram analisados através de uma ANOVA de dois fatores com medidas repetidas, tendo tratamento como um fator (C x P x L) e os dias durante os que se registrou o peso como o fator de medida repetida (2 x 6). Exceto para o teste de nado forçado e do reconhecimento de objeto, os dados obtidos na bateria de testes comportamentais foram analisados através de uma ANOVA de um fator. Como não se observou aderência ao teste de normalidade, os dados do teste de exploração de objeto novo e do nado forçado foram analisados com testes não paramétricos de análise de postos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. Os dados do efeito das manipulações no início de vida foram analisado com

uma ANOVA de um fator e, quando não se observava aderência ao teste de normalidade, os dados eram analisados com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Sempre que apropriado, foram realizadas comparações *post-hoc* utilizando-se o teste de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas de médias de grupos. Foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson para alguns dos comportamentos registrados em cada um dos aparatos. Em todos os casos, valores de *p* iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM).

3.3. Resultados

3.3.1. Ganho de peso

A Figura 9 mostra os registros de ganho de peso dos animais durante a administração repetida de LPS e depois do tratamento. Embora a ANOVA não mostrasse diferenças significativas no fator tratamento ($F_{[2, 33]} = 2423$, $p = 0,103$) nem interação entre tratamento e dias ($F_{[8, 179]} = 0,383$, $p = 0,928$), os filhotes tratados com LPS exibiram flutuações do peso corporal durante o tratamento, enquanto os animais que não receberam injeções ganharam peso constantemente. Após o tratamento crônico, não se observaram diferenças de ganho de peso antes, durante nem depois do desmame.

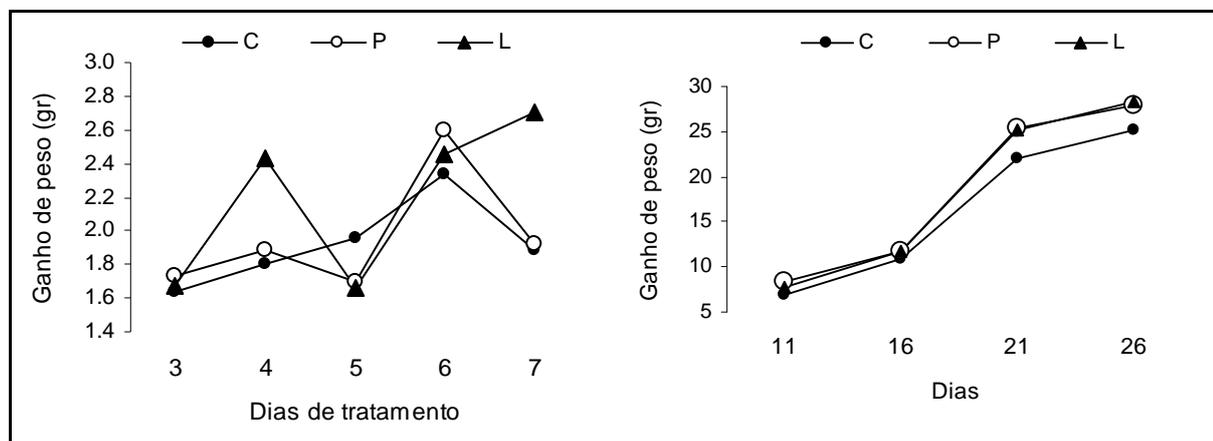


Figura 9. Ganho de peso dos animais tratados com LPS nos dia 3 a 7 de vida e depois do tratamento. Os símbolos representam a média dos grupos. C animais sem tratamento; P, animais tratados com a solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo

3.3.2. Labirinto em cruz elevado

A Figura 10 mostra as principais medidas relacionadas à ansiedade, observadas nos braços abertos do aparato. O tratamento crônico com LPS alterou as medidas de ansiedade em ratos adolescentes. A ANOVA mostrou diferenças significativas devidas ao tratamento no

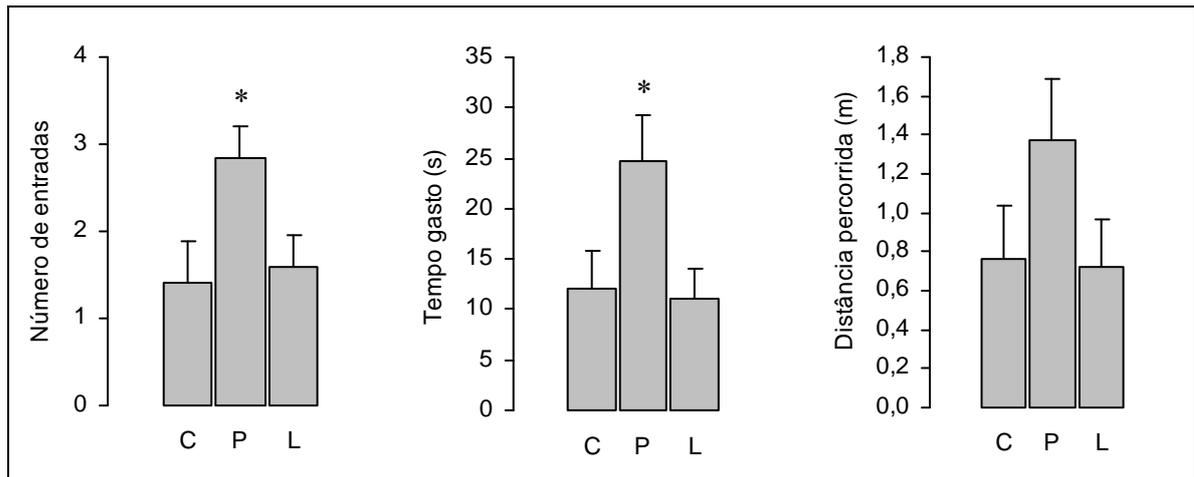


Figura 10. Exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado de ratos adolescentes tratados com LPS nos dias 2 a 7 de vida.

As barras representam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com a solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo. *,Diferente dos grupos C e P (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

número de entradas ($F_{[2, 33]} = 3,625$, $p = 0,038$) e no tempo gasto ($F_{[2, 33]} = 4,103$, $p = 0,026$) nessas áreas abertas do aparato. As comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com LPS reduziram o número de entrada e o tempo gasto nos braços abertos, quando comparados com os animais tratados com solução veículo, mas não com os animais do grupo sem tratamento. As comparações *post-hoc* mostraram também que os animais que receberam seis injeções de solução veículo realizaram mais entradas e permaneceram mais tempo nos braços abertos, quando comparados com os animais que não receberam injeções. Embora não se observassem diferenças significativas na exploração das extremidades dos braços abertos, os animais que receberam seis injeções de solução veículo, entraram mais frequentemente e permaneceram mais tempo nessas áreas quando comparados com os animais tratados com LPS e os animais sem tratamento (ver Tabela 4 para valores de F e de p). Não se observaram diferenças significativas na distância percorrida nos braços abertos ($F_{[2, 33]} = 1,722$, $p = 0,194$) nem no comportamento de esticar-se (ver Tabela 4 para valores de F e de p).

A Figura 11 mostra os comportamentos relacionados à locomoção observados nos braços fechados do aparato. O tratamento crônico com LPS alterou o comportamento de levantar-se em ratos adolescentes. A ANOVA mostrou diferenças significativas no número levantamentos ($F_{[2, 33]} = 3,565$, $p = 0,040$) e no tempo gasto levantando-se (ver Tabela 4 para valores de F e de p). As comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com LPS realizaram levantamentos mais frequentemente e por mais tempo quando comparados com os controles. Não se observaram diferenças significativas no número de entradas ($F_{[2, 33]} = 0,594$, $p = 0,558$) nem na distância percorrida nos braços fechados ($F_{[2, 33]} = 0,672$, $p = 0,517$).

Tabela 4. Comportamento exploratório de ratos tratados com LPS nos dias 2 a 7 de vida e testados na adolescência no labirinto em cruz elevado, campo aberto e gradiente de aversão elevado.

C, animais sem tratamento; P, animais tratados com a solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo. *,Diferente dos controles C e P; °, Diferente do grupo C (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

Parâmetros	Tratamento			ANOVA	
	C	P	L	F[2,33]	p
<i>Labirinto em cruz elevado</i>					
Entradas nas extremidades abertas	0,75 ± 0,30	1,25 ± 0,45	0,58 ± 0,29	0,965	0,392
Tempo nas extremidades abertas (s)	3,26 ± 1,32	7,35 ± 2,65	2,53 ± 1,40	1,889	0,167
Frequência de esticar-se	8,50 ± 1,20	9,50 ± 1,23	10,5 ± 1,23	0,672	0,517
Tempo gasto esticando-se (s)	12,49 ± 1,84	12,7 ± 2,02	18,4 ± 3,38	1,769	0,186
Tempo gasto levantando-se (s)	8,95 ± 1,16	9,13 ± 1,21	14,1 ± 1,41*	5,478	0,009
<i>Campo aberto</i>					
Tempo nas áreas próximas às paredes (s)	68,68 ± 7,64	83,4 ± 4,39	100,3 ± 7,62 °	5,553	0,008
Tempo nos cantos (s)	219,0 ± 8,94	198,7 ± 5,05	184,0 ± 8,78 °	5,080	0,012
Tempo levantando-se (s)	8,55 ± 1,92	9,08 ± 1,24	15,2 ± 2,47 *	3,610	0,038
<i>Gradiente elevado de aversão</i>					
Entradas no braço aberto	0,08 ± 0,08	0,25 ± 0,13	0,25 ± 0,13	0,677	0,515
Tempo gasto no braço aberto (s)	0,28 ± 0,28	0,51 ± 0,29	0,46 ± 0,28	0,177	0,839
Latência de entrada no braço aberto (s)	165,5 ± 14,5	140,6 ± 20,7	137,8 ± 22,0	0,616	0,546
Entradas no braço fechado	2,25 ± 0,33	2,42 ± 0,31	1,92 ± 0,29	0,674	0,517
Tempo no braço fechado (s)	20,00 ± 3,57	29,6 ± 6,26	19,6 ± 4,41	1,364	0,270
Distância total percorrida (m)	8,66 ± 0,72	9,29 ± 0,41	9,37 ± 0,53	0,473	0,627
Levantamentos no túnel e braço fechado	8,08 ± 1,11	5,92 ± 0,98	6,25 ± 0,95	1,321	0,281
Tempo área de transição túnel-fechado (s)	26,39 ± 3,65	41,8 ± 4,2 °	34,6 ± 3,64	4,084	0,026

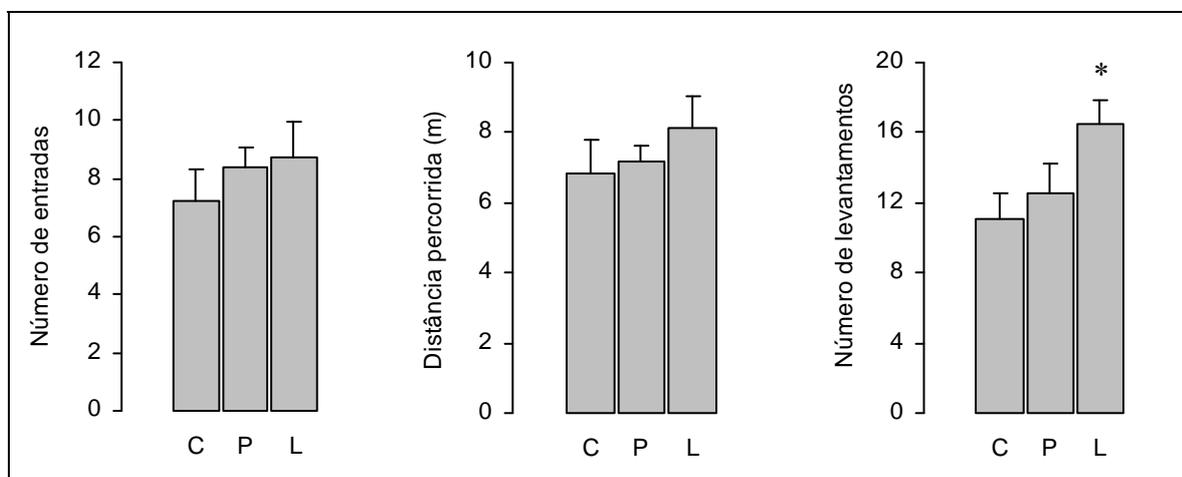


Figura 11. Exploração dos braços fechados do labirinto em cruz elevado de ratos adolescentes tratados com LPS nos dias 2 a 7 de vida.

As barras representam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com a solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo. *,Diferente dos grupos C e P (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

3.3.3. Campo aberto

A Figura 12 ilustra as principais medidas relacionadas à ansiedade e à locomoção no campo aberto. A infecção prolongada alterou o comportamento de levantar-se na periferia da

arena. A ANOVA mostrou diferenças significativas devido ao tratamento no número de levantadas ($F_{[2, 33]} = 3,456$, $p = 0,043$) e no tempo gasto levantando-se (ver Tabela 4 para valores de F e de p). As comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com LPS levantaram-se mais frequentemente e permaneceram levantados por mais tempo, quando comparados com os controles. A ANOVA também mostrou diferenças significativas no tempo gasto na área central ($F_{[2, 33]} = 3,372$, $p = 0,047$) e as comparações *post-hoc* indicaram que os animais que receberam seis injeções de solução veículo permaneceram mais tempo no centro, quando comparados com os animais do grupo sem tratamento. Não se observaram diferenças significativas na distância percorrida na periferia do aparato ($F_{[2, 33]} = 0,778$, $p = 0,467$). O tratamento crônico com LPS alterou o comportamento relacionado à tigmotaxia em ratos adolescentes. A ANOVA mostrou diferenças significativas no tempo gasto nas áreas próximas as paredes e nos cantos da periferia da arena (ver Tabela 4 para valores de F e p). As comparações *post-hoc* indicaram que, quando comparados com os animais do grupo sem tratamento, os animais tratados com LPS permaneceram mais tempo nas áreas de uma parede e menos tempo nos cantos da periferia.

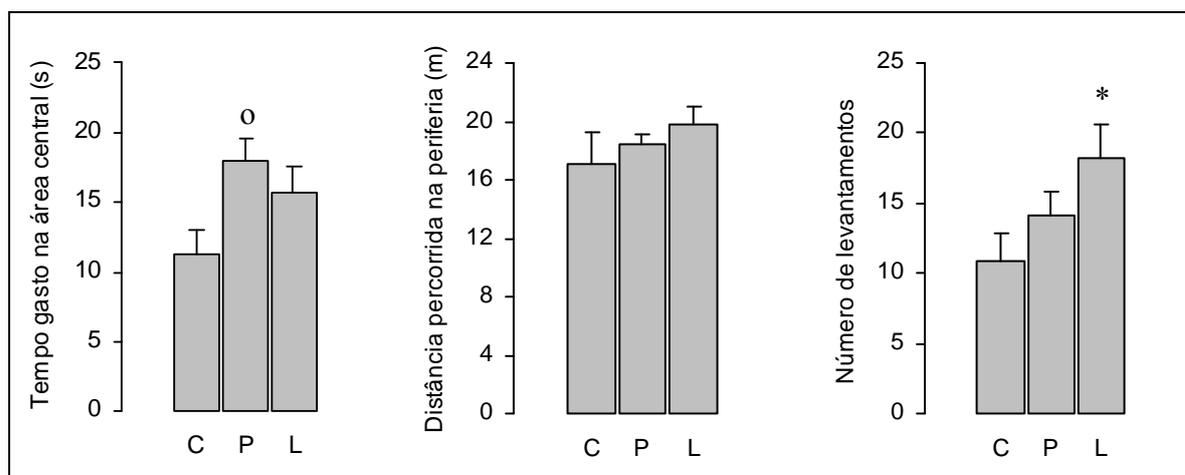


Figura 12. Comportamento exploratório no campo aberto de ratos adolescentes tratados com LPS nos dias 2 a 7 de vida.

As barras representam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com a solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo. ^o, Diferente do grupo C; ^{*}, Diferente dos grupos C e P (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

3.3.4. Teste da exploração de objeto novo

A Tabela 5 resume o comportamento exploratório de ratos adolescentes no teste de exploração de objeto novo. A administração prolongada de LPS não alterou a exploração dos estímulos novos introduzidos no campo aberto. Na sessão de aquisição e de teste, o teste Kruskal-Wallis não mostrou diferenças significativas no tempo gasto pelos animais explorando

os dois objetos nem no tempo gasto explorando separadamente o objeto direito e o objeto esquerdo (ver Tabela 5 para valores de H e p). A infecção repetida alterou o comportamento de levantar-se. O teste Kruskal-Wallis mostrou diferenças no número de levantamentos durante as duas sessões. As comparações *post-hoc* mostraram que os animais tratados com LPS realizaram mais levantamentos do que os controles (ver Tabela 5 para valores de H e p).

Tabela 5. Comportamento exploratório de ratos adolescentes no teste de reconhecimento de objeto novo.

C, animais sem tratamento; P, animais tratados com a solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo. *, Diferente dos grupos C e P (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

Parâmetros	Tratamento			Kruskal-Wallis	
	C	P	L	H _[2]	p
<i>Sessão de aquisição</i>					
Tempo explorando os dois objetos (s)	11,8 ± 2,45	13,9 ± 2,94	14,9 ± 2,55	1,178	0,555
Tempo explorando o objeto esquerdo (s)	6,07 ± 1,38	5,67 ± 0,94	6,66 ± 1,36	0,073	0,964
Tempo explorando o objeto direito (s)	5,71 ± 1,53	8,24 ± 2,24	8,22 ± 1,68	1,644	0,440
Frequência de levantamentos	11,2 ± 2,34	9,08 ± 1,56	16,5 ± 1,97*	6,575	0,037
<i>Sessão de teste</i>					
Tempo explorando os dois objetos (s)	15,9 ± 3,61	20,1 ± 2,85	18,5 ± 3,16	0,618	0,712
Tempo explorando o objeto esquerdo (s)	4,47 ± 1,34	3,12 ± 0,72	4,06 ± 0,81	0,844	0,656
Tempo explorando o objeto direito (s)	11,4 ± 2,78	17,0 ± 2,52	14,4 ± 2,55	2,003	0,367
Frequência de levantamentos	9,58 ± 1,68	10,9 ± 1,28	17,0 ± 2,64*	6,012	0,050

A Figura 13 ilustra os índices de reconhecimento para cada grupo de animais na sessão de aquisição e de teste. O tratamento crônico com LPS não alterou a preferência por nenhum dos dois objetos durante a sessão de aquisição, mas alterou a preferência pelo objeto novo durante a sessão de teste. O teste Kruskal-Wallis não mostrou diferenças significativas nos índices de reconhecimento na sessão de aquisição ($H_{[2]} = 0,546$, $p = 0,761$). No entanto, mostrou diferenças significativas nos índices de reconhecimento da sessão de teste ($H_{[2]} = 8,013$, $p = 0,018$). As comparações *post-hoc* mostraram que, quando comparados com o grupo de animais que não receberam tratamento, os animais tratados com LPS e os que receberam seis injeções de solução veículo, exploraram durante mais tempo o objeto novo em relação ao tempo total de exploração dos objetos. Além disso, observaram-se diferenças nos índices de reconhecimento entre as duas sessões nos grupos de animais que receberam tratamento. O teste de Mann-Whitney mostrou diferenças significativas entre os índices de reconhecimento da sessão de aquisição e os índices da sessão de teste, no grupo de animais tratados com LPS ($U = 124,000$, $p = 0,003$) e no grupo de animais que receberam solução veículo ($U = 127,000$, $p = 0,002$). Não se observaram diferenças entre sessões no grupo de animais que não receberam injeções repetidas ($U = 83,500$, $p = 0,522$).

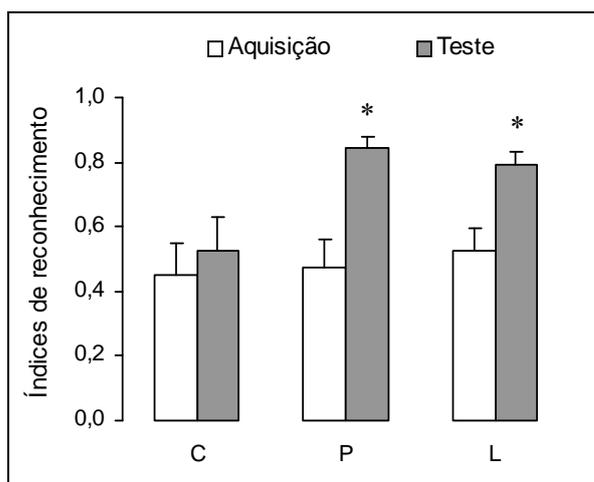


Figura 13. Índices de reconhecimento no teste de reconhecimento de objeto novo de ratos adolescentes tratados com LPS nos dias 2 a 7 de vida.

As barras brancas representam as médias da sessão de aquisição e as barras cinzas as médias da sessão de teste. As linhas verticais indicam o E.P.M. *, Diferente do grupo sem tratamento na sessão de teste, e diferente entre as sessões de aquisição e de teste.

3.3.5. Tábua de buracos

A Figura 14 mostra as medidas de atividade exploratória e locomoção na tábua de buracos. O tratamento crônico com LPS alterou o comportamento de levantar-se em ratos adolescentes. A ANOVA mostrou diferenças no número de levantamentos ($F_{[2, 33]} = 3,583, p = 0,039$) e as comparações *post-hoc* mostraram que os ratos tratados com LPS levantaram-se mais frequentemente do que os controles. Não se observaram diferenças devido ao tratamento na atividade exploratória geral e a exposição ao risco. A ANOVA não mostrou diferenças na exploração dos quatro furos dos cantos do aparato ($F_{[2, 33]} = 0,710, p = 0,499$) nem na exploração do furo central ($F_{[2, 33]} = 0,00, p = 1,00$).

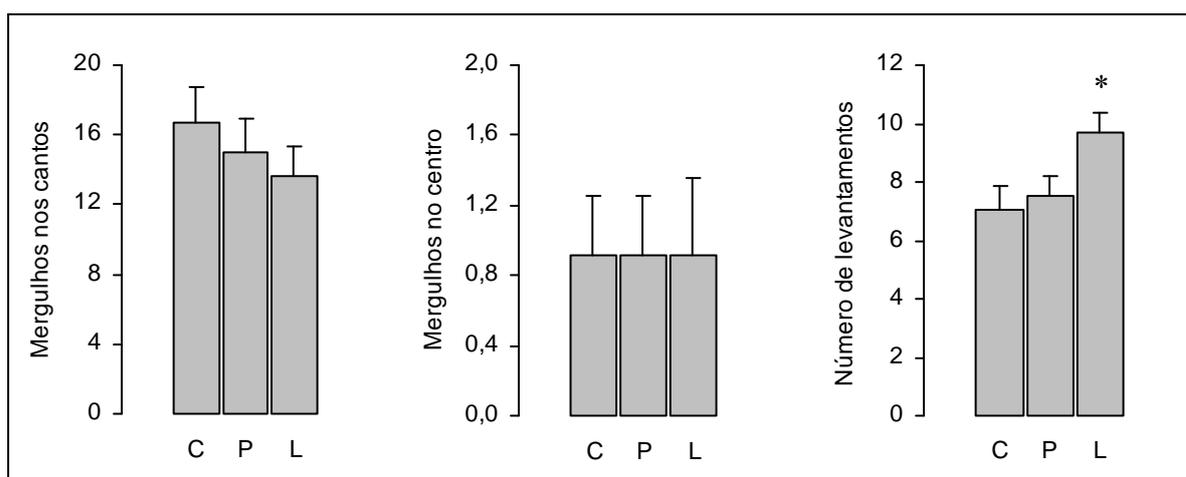


Figura 14. Comportamento exploratório na tábua de buracos de ratos adolescentes tratados com LPS nos dias 2 a 7 de vida.

As barras representam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. *, Diferente dos controles C e P (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

3.3.6. Gradiente de aversão elevado

A administração repetida de LPS não alterou as medidas relacionadas com impulsividade, ansiedade, locomoção e avaliação de risco em ratos adolescentes. A ANOVA não mostrou diferenças significativas no número de entradas, tempo gasto nem latência de entrada no braço aberto. Também não foram observadas diferenças na distância total percorrida, número de entradas, tempo gasto no braço fechado nem na frequência de levantamentos (ver Tabela 4 para valores de F e p). A ANOVA mostrou diferenças no tempo gasto na área de transição túnel-braço fechado e as comparações *post-hoc* mostraram que os animais que receberam seis injeções de solução veículo permaneceram mais tempo nessa área do que os animais do grupo sem tratamento (ver Tabela 4 para valores de F e p).

3.3.7. Nado forçado

A Figura 15 ilustra os comportamentos observados nas duas sessões do teste do nado forçado. A administração repetida de LPS alterou as medidas relacionadas ao enfrentamento do estresse e depressão durante a sessão treino. O teste Kruskal-Wallis mostrou diferenças significativas na porcentagem de tempo em que os animais permaneceram escalando ($H_{[2]} = 6,707$ $p = 0,035$) e no tempo em que permaneceram na postura imóvel ($H_{[2]} = 10,937$ $p = 0,004$). As comparações *post-hoc* mostraram que, comparados com os controles, os animais tratados com LPS escalaram por menos tempo e permaneceram mais tempo imóveis. Também durante a primeira sessão, a ANOVA de um fator mostrou diferenças significativas no tempo gasto mergulhando ($F_{[2, 33]} = 3,892$, $P = 0,030$) e as comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com LPS permaneceram nadando completamente submergidos por menos tempo, quando comparados com os controles. O coeficiente de Pearson mostrou uma correlação positiva entre o tempo de imobilidade nessa sessão e o tempo gasto no braço aberto do gradiente de aversão elevado ($r = 0,76$, $p = 0,01$). Não se observaram diferenças significativas no comportamento de nadar ($H_{[2]} = 0,785$ $p = 0,675$). Durante a segunda sessão, 24 horas depois, não foram observadas diferenças significativas nos comportamentos estudados. O teste Kruskal-Wallis não mostrou diferenças significativas no comportamento de escalar ($H_{[2]} = 0,186$, $p = 0,911$), nadar ($H_{[2]} = 0,258$, $p = 0,879$) nem de imobilidade ($H_{[2]} = 1,443$, $p = 0,486$). Finalmente, foram observadas diferenças significativas entre as duas sessões do nado forçado nos comportamentos de escalar e de imobilidade. O teste de Mann-Whitney mostrou que, comparado com seu desempenho na primeira sessão, na segunda sessão os animais tratados com LPS aumentaram o tempo gasto escalando ($U = 119,000$, $p = 0,007$) e reduziram o tempo gasto na postura imóvel ($U = 30,000$, $p = 0,017$).

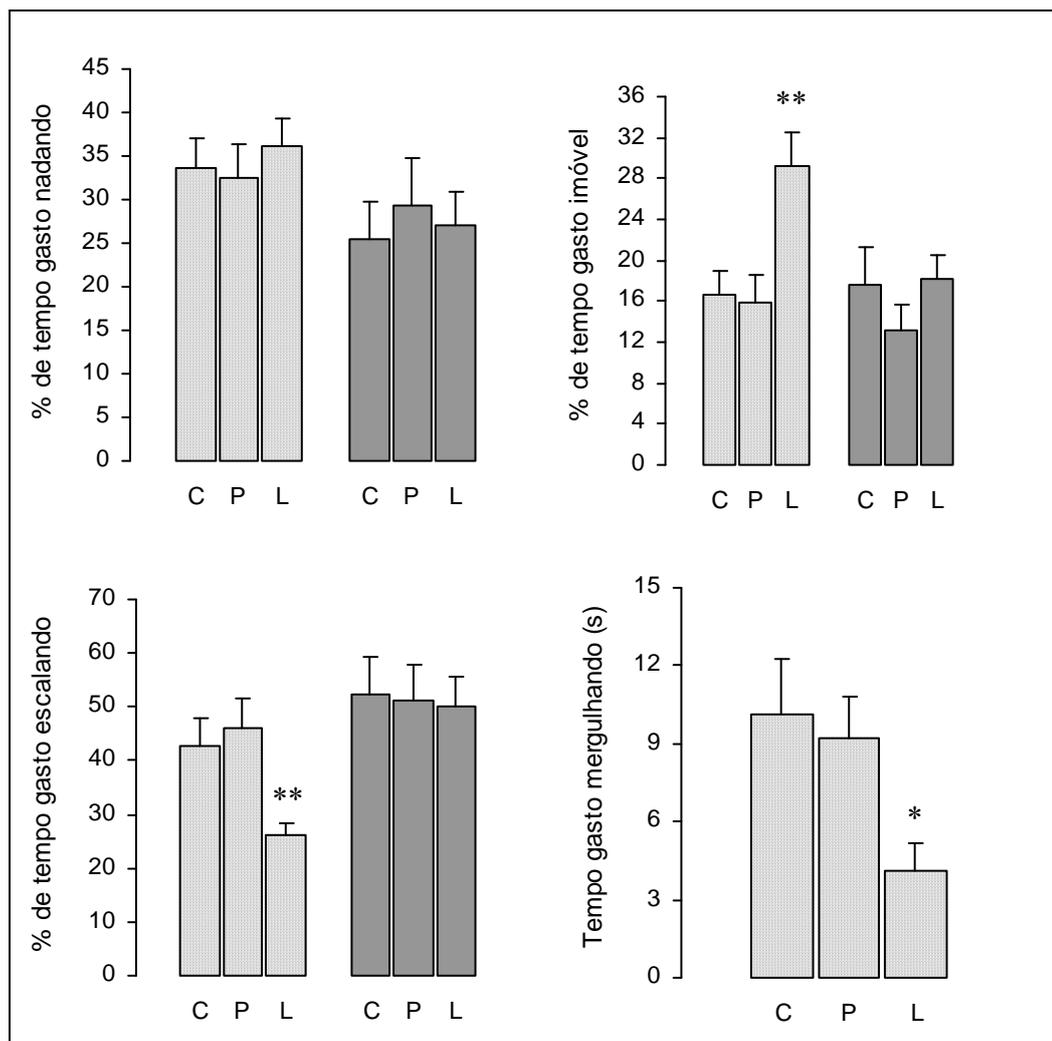


Figura 15. Comportamentos no teste de nado forçado de ratos adolescentes tratados com LPS nos dias 2 a 7 de vida.

As barras claras representam as médias da primeira sessão e as barras cinzas as médias da segunda sessão. As linhas verticais indicam o E.P.M. *, Diferente dos controles C e P; **, Diferente do grupo controle na primeira sessão, e diferente da segunda sessão (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

3.4. Comparação dos resultados dos Experimentos 1 e 2

3.4.1. Comportamentos relacionados à ansiedade e à locomoção

A Figura 16 ilustra os principais comportamentos relacionados à ansiedade e à locomoção no labirinto em cruz elevado de ratos adolescentes expostos a seis tipos de manipulações na primeira semana de vida. A manipulação precoce alterou as medidas relacionadas à ansiedade e à locomoção na adolescência. A ANOVA mostrou diferenças significativas no tempo de exploração dos braços abertos ($F_{[5,66]} = 3,849$, $p = 0,004$) e as comparações *post-hoc* indicaram que os animais submetidos a seis injeções de solução veículo e a injeções de LPS nos dias 3 e 5 de vida exploraram durante mais tempo os braços abertos do

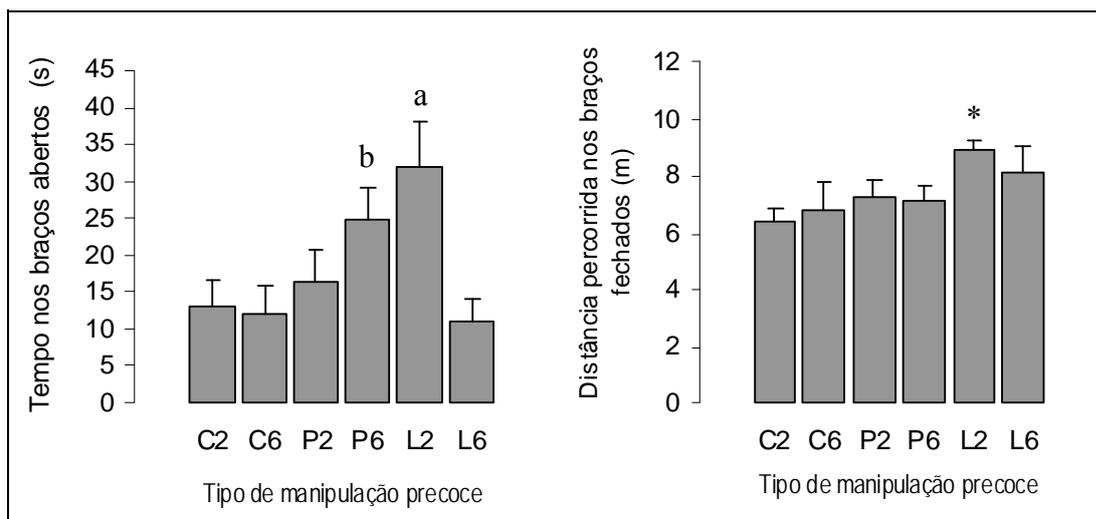


Figura 16. Efeito da manipulação precoce sobre medidas de ansiedade e locomoção de ratos adolescentes expostos ao labirinto em cruz elevado.

As barras representam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo; 2, manipulações nos dias 3 e 5 de vida; 6, manipulações nos dias 2 a 7 de vida. *, Diferente de todos os grupos; ^a, Diferente de C2, C6, P2, L6; ^b, Diferente de L6 (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

aparato quando comparados com os animais expostos à infecção repetida. As comparações *post-hoc* mostraram também que os animais expostos a injeções de LPS nos dias 3 e 5 de vida exploraram por mais tempo os braços abertos quando comparados com os animais dos grupos sem tratamento e os animais que receberam duas injeções de solução veículo. O teste Kruskal-Wallis mostrou diferenças significativas na distância percorrida nos braços fechados ($H_{[5]} = 13,917$, $p = 0,016$) e as comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com LPS nos dias 3 e 5 de vida percorreram maiores distâncias quando comparados com os animais dos outros grupos.

A Figura 17 mostra os principais comportamentos relacionados à ansiedade e à locomoção no campo aberto de ratos adolescentes manipulados na primeira semana de vida. A manipulação precoce alterou os comportamentos relacionados tanto à ansiedade como à locomoção. O teste Kruskal-Wallis mostrou diferenças significativas no tempo gasto na área central da arena ($H_{[5]} = 17,719$, $p = 0,003$) e as comparações *post-hoc* indicaram que os tanto os animais submetidos a seis injeções de solução veículo ou de LPS como os expostos a duas injeções de LPS, aumentaram o tempo de permanência na área central do aparato, quando comparados com os animais dos grupos sem tratamento e os animais que receberam duas injeções de solução veículo. As comparações *post-hoc* mostraram também que os animais sem tratamento, mas pesados durante os seis primeiros dias, gastaram mais tempo na área central quando comparados com os animais tratados com solução veículo nos dias 3 e 5 de vida, bem como com os animais que foram unicamente pesados durante esses dois dias. A ANOVA

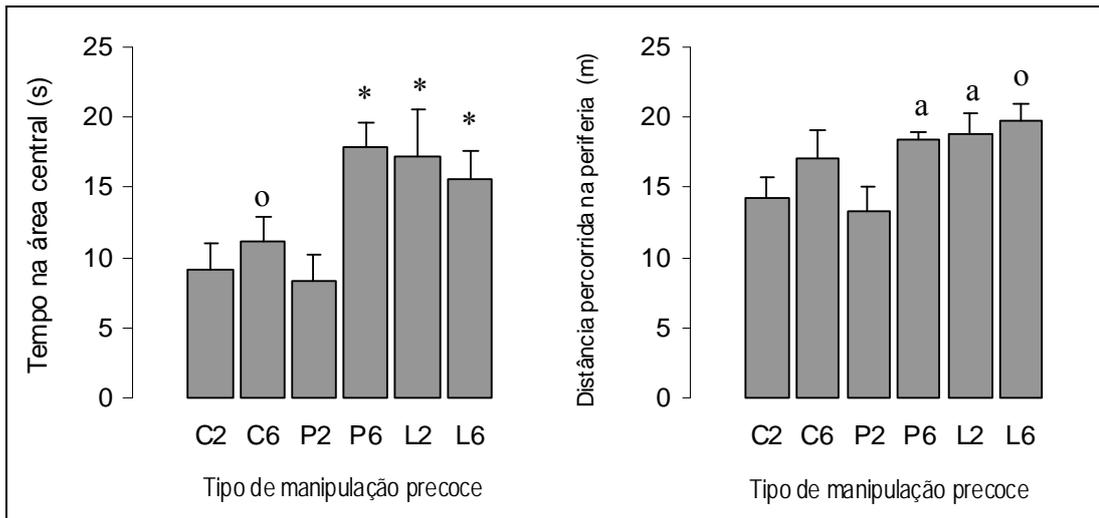


Figura 17. Efeito da manipulação precoce sobre medidas de ansiedade e locomoção de ratos adolescentes expostos ao campo aberto.

As barras representam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo; 2, manipulações nos dias 3 e 5 de vida; 6, manipulações nos dias 2 a 7 de vida. *, Diferente de C2, C6, P2; °, Diferente de C2 e P2, L6; ^a, Diferente de P2 (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

mostrou diferenças significativas na distância percorrida na periferia do campo aberto ($F_{[5,66]} = 2,888$, $p = 0,02$) e as comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com LPS, nos dias 3 e 5 de vida ou de forma repetida, bem como os animais que receberam seis injeções de veículo, percorreram maiores distâncias na periferia quando comparados com os animais do grupo que recebeu duas injeções de solução veículo. Além disso, os animais expostos a seis injeções de LPS aumentaram a locomoção na periferia quando comparados com os animais sem tratamento que foram pesados nos dias 3 e 5 de vida.

3.4.2. Resposta a estímulos novos

A Figura 18 ilustra a resposta a estímulos novos de ratos adolescentes manipulados durante a primeira semana de vida. A manipulação precoce alterou a exploração de objetos na adolescência. O teste Kruskal-Wallis mostrou diferenças significativas no tempo de exploração dos dois objetos tanto na sessão de aquisição ($H_{[5]} = 17,154$, $p = 0,004$) quanto na sessão de teste ($H_{[5]} = 17,081$, $p = 0,004$). As comparações *post-hoc* indicaram que animais expostos às manipulações repetidas (pesagem, injeções de solução veículo ou infecção) por seis dias, como os expostos nos dias 3 e 5 de vida, exploraram durante mais tempo os objetos, quando comparados com os animais dos grupos que receberam injeções de veículo nos dias 3 e 5 de vida e aqueles que foram unicamente pesados durante esses dois dias.

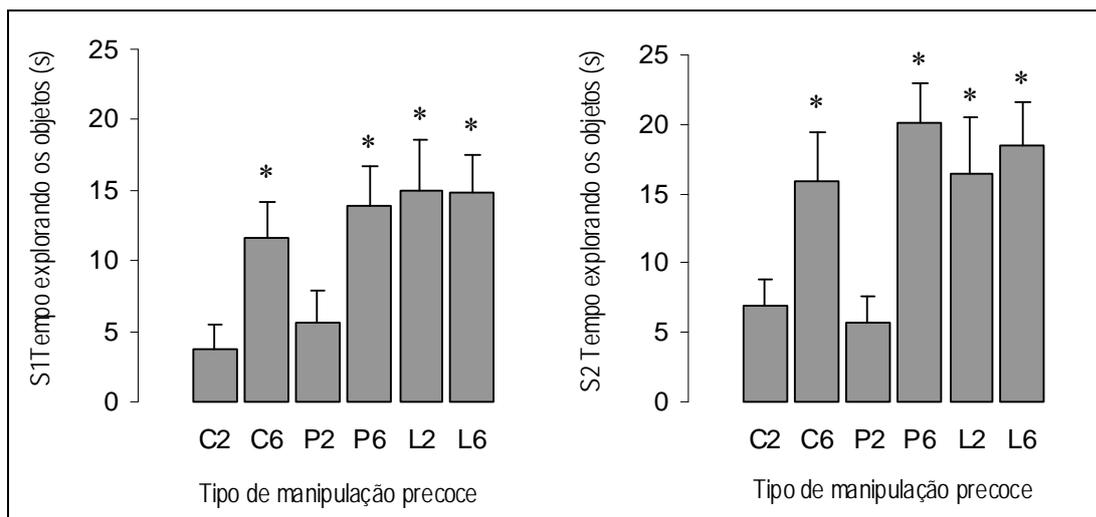


Figura 18. Efeito da manipulação precoce sobre a resposta a estímulos novos de ratos adolescentes expostos ao teste de reconhecimento de objeto.

As barras indicam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo; 2, manipulações nos dias 3 e 5 de vida; 6, manipulações nos dias 2 a 7 de vida. *, Diferente de C2 e P2 (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

3.4.3. Exploração direcionada

A Figura 19 mostra o comportamento exploratório de ratos que foram manipulados durante a primeira semana de vida adolescentes e testados na tábua de buracos quando adolescentes. Esse tipo de manipulação precoce alterou a exploração direcionada aos buracos. A ANOVA mostrou diferenças significativas na frequência de mergulhos de cabeça dentro dos buracos ($F_{[5,66]} = 4,651$, $p = 0,001$) e as comparações *post-hoc* indicaram que animais sem tratamento, mas pesados durante seis dias, e os animais tratados com LPS nos dias 3 e 5 de vida, mergulharam mais freqüentemente, quando comparados com os animais que foram somente pesados e com os animais tratados com solução veículo nos dias 3 e 5 de vida. As comparações *post-hoc* indicaram também que os animais que receberam seis injeções de solução veículo aumentaram a frequência de mergulhos quando comparados com os animais que foram unicamente pesados durante os dias 3 e 5 de vida.

3.4.4. Comportamento relacionado a impulsividade.

A Figura 20 mostra o tempo de exploração do braço aberto do gradiente de aversão elevado de ratos adolescentes que foram manipulados na primeira semana de vida. A manipulação precoce alterou o comportamento impulsivo de ratos adolescentes expostos a esse aparato. A ANOVA mostrou diferenças significativas no tempo gasto nos braços abertos ($F_{[5,66]} = 6,288$, $p = <0,001$) e as comparações *post-hoc* indicaram que unicamente os animais tratados com LPS nos dias 3 e 5 de vida aumentaram o tempo de permanência nessa área.

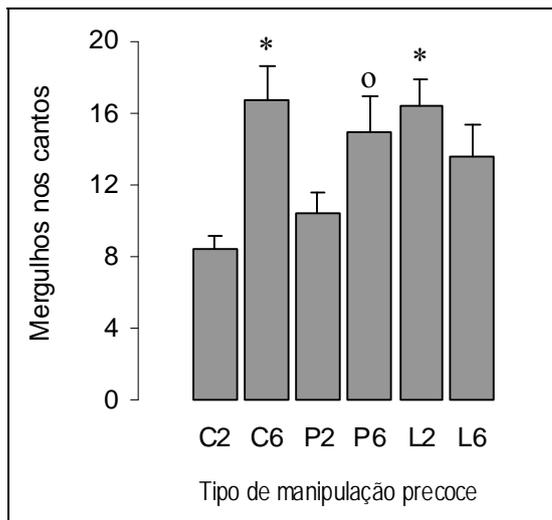


Figura 19. Efeito da manipulação precoce sobre a exploração direcionada de ratos adolescentes expostos à tábua de buracos.

As barras representam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo; 2, manipulações nos dias 3 e 5 de vida; 6, manipulações nos dias 2 a 7 de vida. *,Diferente de C2 e P2; °, Diferente de C2 (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

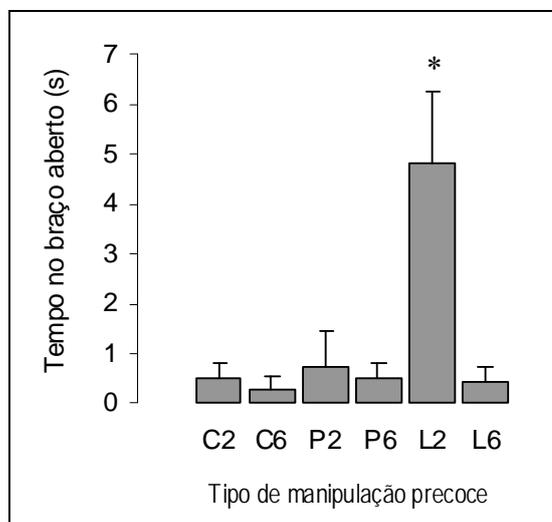


Figura 20. Efeito da manipulação precoce sobre o comportamento impulsivo de ratos adolescentes expostos ao gradiente de aversão elevado.

As barras representam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo; 2, manipulações nos dias 3 e 5 de vida; 6, manipulações nos dias 2 a 7 de vida. *,Diferente de todos os grupos (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

3.4.5. Estilos de enfrentamento do estresse.

A Figura 21 mostra dois comportamentos relacionados a estilos de enfrentamento do estresse por ratos adolescentes manipulados na primeira semana de vida. O tipo de manipulação precoce alterou o estilo de enfrentamento do estresse por ratos adolescentes na primeira sessão de treino do teste de nado forçado. A ANOVA mostrou diferenças significativas no tempo gasto na postura imóvel ($F_{[5,66]} = 7,104$, $p = <0,001$) e as comparações *post-hoc* indicaram que as manipulações repetidas por seis dias, como pesagem e injeções de solução veículo, reduziram o tempo de imobilidade em comparação com os animais dos outros grupos. O teste Kruskal-Wallis mostrou também diferenças no tempo que os animais mergulharam ($H_{[5]} = 17,459$, $p = 0,004$) e as comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com LPS nos dias 3 e 5 de vida mergulharam por tempos mais longos do que os animais dos grupos que foram pesados e os animais que foram tratados com solução veículo durante esses dois dias, bem como do que os animais que foram tratados com LPS de forma repetida.

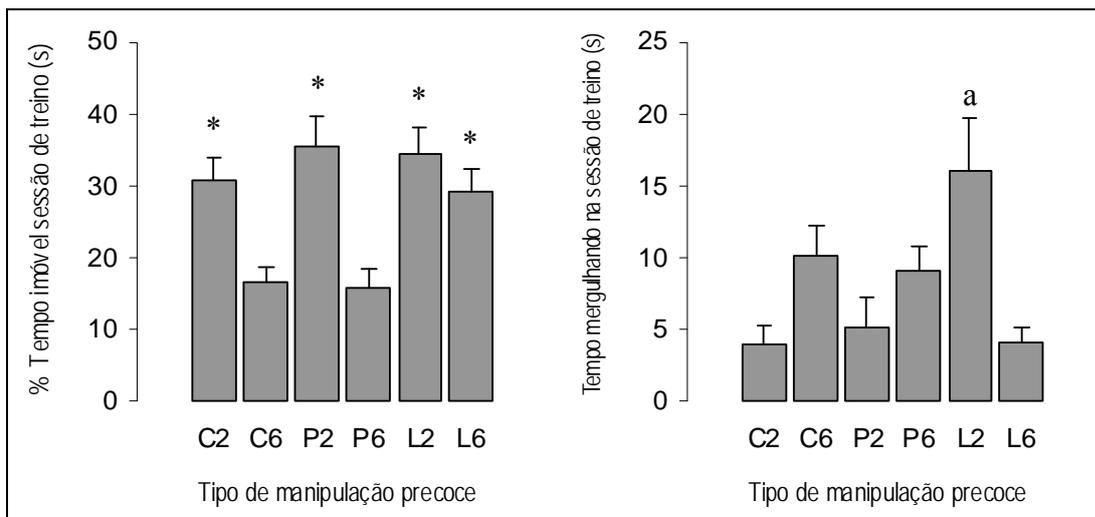


Figura 21. Efeito da manipulação precoce sobre a estratégias de enfrentamento de estresse de ratos adolescentes expostos à primeira sessão do nado forçado.

As barras representam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo; 2, manipulações nos dias 3 e 5 de vida; 6, manipulações nos dias 2 a 7 de vida. *, Diferente de C6 e P6; ^a, Diferente de C2, P2 e L6 (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

A Figura 22 mostra o tempo de imobilidade durante a re-exposição ao teste de nado forçado. O tipo de manipulação no início de vida alterou o estilo de enfrentamento do estresse de ratos adolescentes re-expostos ao teste. O teste Kruskal-Wallis mostrou diferenças significativas no tempo gasto na postura imóvel ($H_{[5]} = 14,949$, $p = 0,011$) e as comparações *post-hoc* indicaram que os animais expostos a qualquer tipo de manipulação repetida durante seis dias reduziram o tempo de imobilidade quando comparados com os animais expostos a qualquer tipo de manipulação durante os dias 3 e 5 de vida.

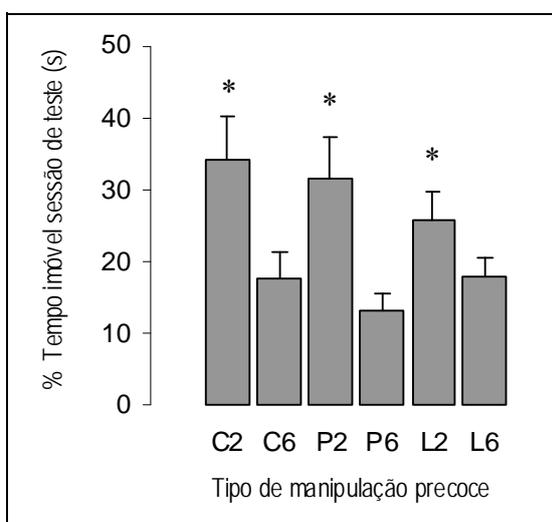


Figura 22. Efeito da manipulação precoce sobre a estratégia de enfrentamento de estresse de ratos adolescentes expostos à segunda sessão do nado forçado.

As barras representam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo; 2, manipulações nos dias 3 e 5 de vida; 6, manipulações nos dias 2 a 7 de vida. *, Diferente de C6, P6 e L6 (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

3.4.6. Frequência de levantadas

A Figura 23 mostra a frequência de levantadas pelos ratos adolescentes manipulados na primeira semana de vida. Exceto no teste de nado forçado, o tipo de manipulação precoce alterou o comportamento de levantar-se em todos os testes comportamentais utilizados. A ANOVA mostrou diferenças no labirinto em cruz elevado ($F_{[5,66]} = 5,40$, $p = <0,001$) e as comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com seis injeções de LPS levantaram-se mais frequentemente do que os animais do grupo controle sem tratamento e do que os animais injetados com solução veículo. As comparações *post-hoc* mostraram também que, quando comparados com os animais dos grupos que foram somente pesados e com os animais que receberam injeções de veículo nos dias 3 e 5 de vida, os animais dos grupos que receberam duas injeções de LPS e aqueles que foram tratados seis vezes com solução veículo levantaram-se mais vezes. O teste Kruskal-Wallis mostrou diferenças significativas no campo aberto ($H_{[5]} = 30,830$, $p = <0,001$) e as comparações *post-hoc* indicaram que os animais expostos a seis injeções de LPS aumentaram a frequência de levantadas quando comparados com todos os grupos. As comparações *post-hoc* mostraram também que os animais que receberam seis injeções de solução veículo levantaram-se mais do que os animais dos grupos sem tratamento e os animais que receberam injeções de veículo ou de LPS nos dias 3 e 5 de vida. As comparações *post-hoc* mostraram que os animais dos grupos sem tratamento, mas que foram pesados seis vezes, e os animais expostos a duas injeções de LPS levantaram-se mais frequentemente do que os animais dos grupos sem tratamento e os animais que receberam injeções de veículo nos dias 3 e 5 de vida. A ANOVA mostrou diferenças na sessão de aquisição do teste de reconhecimento de objeto ($F_{[5,66]} = 8,181$, $p = <0,001$) e as comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com seis injeções de LPS levantaram-se mais vezes do que os animais dos grupos que foram unicamente pesados e os que receberam injeções de veículo nos dias 3 e 5 de vida, bem como do que os animais que receberam seis injeções de solução veículo. As comparações *post-hoc* mostraram também que, quando comparados com os animais dos grupos que foram unicamente pesados e os que receberam injeções de veículo nos dias 3 e 5 de vida, tanto os animais tratados com duas injeções de LPS, como os que foram unicamente pesados seis vezes e os que receberam seis injeções de solução veículo, realizaram um número maior de levantadas. A ANOVA mostrou diferenças na segunda sessão do teste de reconhecimento de objeto ($F_{[5,66]} = 11,425$, $p = <0,001$) e as comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com seis injeções de LPS

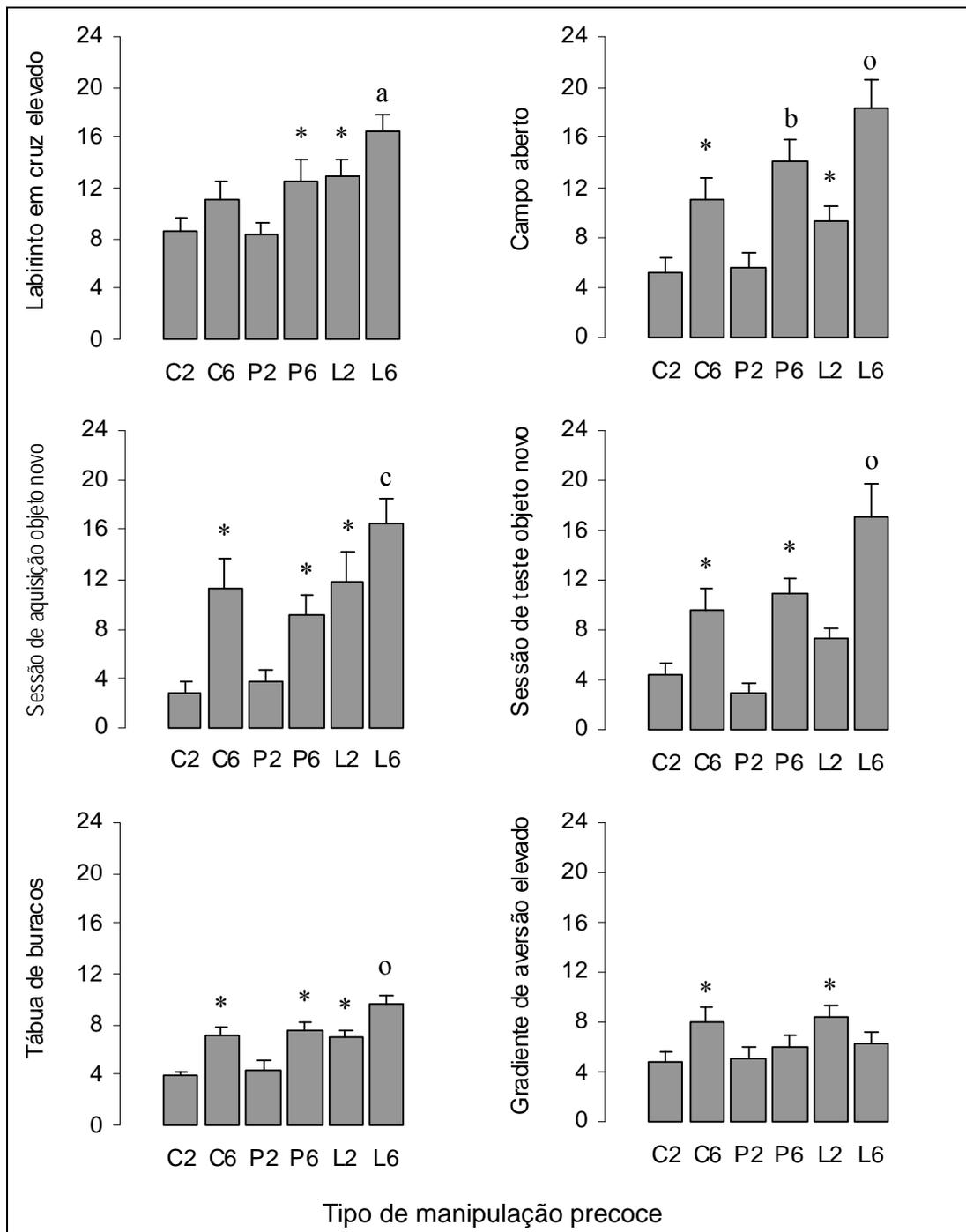


Figura 23. Efeito da manipulação precoce sobre a frequência de levantamentos de ratos adolescentes expostos a diferentes testes comportamentais.

As barras representam a média e as linhas verticais indicam o E.P.M. C, animais sem tratamento; P, animais tratados com solução veículo; L, animais tratados com lipopolissacarídeo; 2, manipulações nos dias 3 e 5 de vida; 6, manipulações nos dias 2 a 7 de vida. °, Diferente de todos os grupos; *, Diferente de C2 e P2; ^a, Diferente de C2, P2, C6 e P6; ^b, Diferente de C2, P2, C6 e L2; ^c, Diferente de C2, P2 e P6 (Student-Newman-Keuls, P < 0,05).

levantaram-se mais vezes do que os animais dos outros grupos. As comparações *post-hoc* mostraram também que, em comparação com os animais dos grupos que foram somente pesados e com os que receberam injeções de veículo nos dias 3 e 5 de vida, os animais que

receberam seis injeções de solução veículo, levantaram-se mais vezes. A ANOVA mostrou diferenças na tábua de buracos ($F_{[5,66]} = 9,412$, $p = <0,001$) e as comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com seis injeções de LPS levantaram-se mais vezes do que os animais dos outros grupos. As comparações *post-hoc* mostraram também que, quando comparados com os animais dos grupos que foram somente pesados e com os que receberam injeções de veículo nos dias 3 e 5 de vida, tanto os animais que foram somente pesados, como os que receberam injeções de solução veículo durante seis dias e os que foram tratados com duas injeções de LPS, levantaram-se mais vezes. Finalmente, a ANOVA mostrou diferenças no gradiente de aversão elevado ($F_{[5,66]} = 2,396$, $p = 0,047$) e as comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com duas injeções de LPS e os animais que foram somente pesados por seis dias, levantaram-se mais do que os animais dos grupos somente pesados e os tratados com injeções de veículo nos dias 3 e 5 de vida.

3.5. Discussão

A inoculação de LPS entre os dias 2 e 7 de vida não alterou significativamente o ganho de peso dos animais, nem durante o tratamento nem mesmo semanas depois. No entanto, os animais do grupo tratado com LPS exibiram oscilações de ganho de peso quando comparados com os controles. Enquanto que os animais sem tratamento ganharam peso progressivamente, os animais tratados com LPS ganharam peso antes da terceira administração da endotoxina e perderam peso antes da quarta administração. As oscilações de ganho de peso dos filhotes tratados com LPS podem estar relacionadas a um possível comportamento de doença. Esse comportamento, também observado em ratos adultos após a administração de LPS, é caracterizado por sintomas de anorexia e adipsia (Hart, 1988; Cross-Mellor et al., 2000).

Ao contrário do esperado, os resultados obtidos na bateria de testes comportamentais mostraram que, comparados com os controles, ratos adolescentes expostos à inoculação prolongada de LPS na primeira semana de vida não exibiram aumento da atividade exploratória. A administração prolongada de LPS pareceu não afetar os comportamentos relacionados com a ansiedade nem com a locomoção por ocasião da adolescência. Ao comparar o grupo de filhotes tratados de forma prolongada com LPS e o grupo de animais que não receberam injeções, não houve diferenças na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado nem da área central da arena. Da mesma forma, não se observaram diferenças na distância percorrida nos braços fechados do labirinto em cruz elevado nem na periferia do campo aberto.

Considerando que a inoculação prolongada de LPS pode causar tolerância (Fan e Cook, 2005), os resultados obtidos nos testes de ansiedade sugerem, inicialmente, uma possível

diminuição do efeito da endotoxina após a administração contínua. No entanto, ao considerar o comportamento exibido pelos animais que receberam seis injeções de solução veículo, levanta-se a hipótese de um possível efeito da manipulação precoce como evento estressante, e os efeitos a longo prazo desse evento sobre a resposta emocional.

Comparados com os animais que não receberam injeções, os ratos do grupo controle veículo aumentaram a exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado e da área central do campo aberto. Esses resultados sugerem que o procedimento de inoculação repetida, que inclui o manuseio do filhote e uma punção intraperitoneal diariamente por seis dias, pode ser um evento suficientemente estressante para produzir alterações duradouras no comportamento. Contudo, se a administração prolongada de endotoxina causou tolerância, como sugerido anteriormente, era de se esperar que os animais do grupo tratado com LPS exibissem também aumento da exploração das áreas abertas dos aparatos pelo fato de terem sido expostos ao procedimento de administração. Os resultados no labirinto em cruz elevado mostraram o contrário. Comparados com os animais do grupo controle veículo, os ratos submetidos a uma inoculação prolongada reduziram significativamente a exploração dos braços abertos.

A partir dos resultados anteriores, sugere-se que, durante estágios precoces do desenvolvimento, a exposição dos filhotes a níveis baixos ou muito altos de estresse pode ter como resultado o aumento das medidas relacionadas com ansiedade no labirinto em cruz elevado, enquanto a exposição a níveis moderados de estresse resultaria na diminuição dessas medidas. Assim, os comportamentos relacionados à ansiedade na adolescência seriam uma função em U da intensidade do estresse precoce. Considerando essa hipótese, o procedimento de administração ao qual foram submetidos os animais do grupo controle veículo poderia representar uma situação moderada de estresse precoce, o que teria como resultado a diminuição da ansiedade na adolescência. Já a exposição contínua a eventos simultâneos como manuseio, punções intraperitoneais e inoculação de LPS poderiam representar, no conjunto, um tipo de estresse de elevada intensidade, o que levaria ao aumento da ansiedade em resposta à novidade.

A hipótese anterior, do aumento ou diminuição de comportamentos relacionados a ansiedade em função da intensidade do estresse no início de vida, parece estar apoiada nos resultados descritos nos estudos de separação materna. Por exemplo, ratos adultos que foram separados de suas mães por períodos curtos (10-15 min / dia) durante as primeiras 1-2 semanas pós-parto, exibem diminuição dos comportamentos relacionados com ansiedade (Ladd et al., 2000; Macrí et al., 2004). Por sua vez, a exposição a longos períodos de separação materna (180

min/dia) durante o mesmo período pós-natal, tem como resultado o aumento dos comportamentos relacionados a ansiedade em ratos adultos (para uma revisão, ver Macrí e Würbel, 2006). Semelhante às evidências descritas em ratos adultos, foi demonstrado recentemente que ratos adolescentes, submetidos à separação materna durante períodos curtos, exibem menos comportamentos de ansiedade no labirinto em cruz elevado do que tanto animais submetidos a períodos longos de separação como os controles (Koehnle e Rinaman, 2010).

Os dados obtidos no teste de reconhecimento de objeto sugerem que uma inoculação prolongada no início de vida não reduz a neofobia de ratos adolescentes. Comparados com os controles, os ratos tratados com LPS não exibiram aumento da exploração dos objetos introduzidos na arena durante a sessão de aquisição nem durante a sessão de teste. No entanto, foram observadas diferenças devido ao tratamento nos índices de reconhecimento calculados para a segunda sessão. Comparados com os animais que não receberam tratamento, os ratos que receberam seis injeções de solução veículo e os ratos que receberam seis injeções de LPS exploraram durante mais tempo o objeto novo em relação ao tempo total de exploração dos dois objetos. Considerando que não houve um viés de preferência pelo objeto da direita ou da esquerda na sessão de aquisição, e que somente os ratos do grupo sem tratamento não discriminaram os estímulos aos quais foram previamente expostos, os resultados anteriores sugerem que o estresse precoce produzido pelo procedimento de administração repetida, bem como a exposição a uma infecção prolongada, podem melhorar o desempenho de ratos adolescentes na tarefa de reconhecimento de objeto.

Embora a literatura careça de estudos similares em ratos adolescentes, os dados apresentados concordam com os resultados de Jenkins et al (2009) e Rico et al (2010), mostrando que a administração de LPS nos primeiros dias de vida não compromete a tarefa de reconhecimento de objeto na adolescência. No entanto, nesses estudos não se observou um melhor desempenho dos animais nessa tarefa devido à infecção precoce. Como sugerido por Roberson et al (2006), é provável que a exposição a uma inoculação prolongada de LPS durante a primeira semana de vida acelere o desenvolvimento do sistema nervoso, o que teria como resultado um melhor desempenho em tarefas cognitivas e motoras. Semelhante ao modelo de inoculação prolongada utilizado neste experimento, no estudo de Roberson et al (2006) filhotes machos foram tratados com LPS ou com salina durante os dias 2, 3, 4, 5 e 6 de vida. Mais tarde, entre os dias 1 e 21 de vida, esses animais foram expostos a diferentes testes para avaliar o desenvolvimento sensório-motor, e na fase adulta, foram testados em modelos que avaliavam coordenação motora e equilíbrio. Comparados com os controles, os animais tratados com LPS exibiram geotaxia negativa e correção de postura mais cedo no desenvolvimento, e na fase

adulta, exibiram melhor desempenho nas tarefas de coordenação motora e equilíbrio.

Ao contrário do ocorrido nos testes de ansiedade e de reconhecimento de objeto novo, a inoculação prolongada de LPS não alterou comportamentos relacionados à exploração dirigida na tábua de buracos nem à impulsividade no gradiente de aversão elevado em ratos adolescentes. A única diferença foi observada no grupo de animais tratados com solução veículo e testados no gradiente de aversão elevado. Comparados com os animais do grupo sem tratamento, os animais tratados com seis injeções de veículo permaneceram mais tempo na área de transição túnel-fechado, uma medida relacionada ao aumento da avaliação de risco. Como observado no labirinto em cruz elevado, e discutido anteriormente, o procedimento de administração repetida no início de vida parece afetar comportamentos específicos de defesa na adolescência.

A inoculação prolongada de LPS na primeira semana de vida alterou o comportamento de levantar-se em ratos adolescentes. Comparados com os controles, os ratos tratados com LPS exibiram um aumento da frequência de levantadas nos testes de ansiedade, nas duas sessões do teste de reconhecimento de objeto novo e na tábua de buracos. Os resultados anteriores concordam com os dados de um estudo prévio (Rico et al., 2010), demonstrando que a exposição precoce a LPS nos dias 3 e 5 de vida resulta também no aumento da frequência de levantamentos em ratos adolescentes.

A administração prolongada de LPS no início de vida alterou os comportamentos relacionados ao enfrentamento do estresse e os sinais de depressão em ratos adolescentes. Durante a primeira sessão do teste de nado forçado, os ratos tratados com LPS escalaram e mergulharam durante menos tempo e permaneceram mais tempo na postura imóvel, comparados com os controles. Durante a segunda sessão, observou-se um padrão de comportamento inverso: os animais tratados com LPS aumentaram o tempo gasto escalando e reduziram o tempo de imobilidade. No teste de nado forçado, os comportamentos de escalar (Cryan et al., 2005) e de mergulhar (Rico et al., 2010) estão relacionados a estilos ativos de lidar com o estresse, enquanto que a postura imóvel representa um estilo passivo (Cryan et al., 2005), relacionado a sintomas de depressão (Porsolt, 1976). O perfil comportamental observado nesses animais durante a segunda sessão do nado forçado foi semelhante ao comportamento de animais tratados com agentes antidepressivos. Após a sessão de treino, animais tratados com antidepressivos exibem, na segunda sessão, uma diminuição do tempo de imobilidade, em comparação com animais controle (para uma revisão, ver Cryan e Slattery, 2007). Considerando que (1) os animais tratados de forma precoce com LPS não foram submetidos a tratamento farmacológico com antidepressivos entre as duas sessões de teste, e (2) que esses

animais exibem aumento dos comportamentos relacionados com estilos passivos de lidar com o estresse durante a primeira exposição ao nado forçado, levanta-se a hipótese de que a infecção precoce pode alterar os estilos de enfrentamento, dependendo da exposição/re-exposição à situação de estresse. Assim, um repertório de comportamentos passivos, relacionado a sintomas depressivos, seria inicialmente exibido para lidar com a novidade, enquanto que, uma vez que a situação de estresse se torna familiar, um repertório de comportamentos ativos seriam exibidos para lidar com a situação

Embora não existam estudos na literatura sobre inoculação precoce de LPS em ratos e posterior aparição de sintomas depressivos na adolescência, os dados apresentados são coerentes com os resultados descritos por Bilbo et al (2008). Nesse estudo, ratos expostos a uma infecção bacteriana precoce foram, na vida adulta, submetidos a estresse por choque inescapável na cauda, seguido de uma avaliação periódica de sintomas relacionados a depressão. Os autores mostraram que esse tipo de estresse teve como resultado uma marcada exibição de comportamentos relacionados a depressão em ratos adultos. No entanto, comparados com os animais controles, os ratos que sofreram um infecção no início de vida, exibiram uma recuperação mais rápida dos sintomas depressivos produzidos pelo choque inescapável.

No conjunto, os resultados do Experimento 2 sugerem que a administração prolongada de LPS nos dias 2 a 7 de vida pode produzir alterações comportamentais na adolescência. As alterações relacionadas ao aumento de ansiedade parecem ser o resultado tanto da exposição ao LPS quanto do procedimento prolongado de administração. Ao contrário do esperado, a inoculação prolongada de LPS no início de vida não alterou os comportamentos relacionados com impulsividade e neofobia. No entanto, esse evento precoce parece ter efeitos duradouro sobre o repertório de comportamento que os animais exibem quando re-expostos a situações de estresse.

3.5.1. Efeito das manipulações no início da vida sobre o comportamento exploratório de ratos adolescentes

Cada um dos grupos de animais utilizados nos Experimentos 1 e 2 foi submetido a um tipo de manipulação durante a primeira semana de vida. Uns foram separados da suas amas e pesados enquanto outros, além do procedimento anterior, receberam injeções de solução veículo ou de LPS. Com o objetivo de analisar os efeitos da manipulação precoce sobre o comportamento exploratório na adolescência, foram realizadas comparações entre os resultados de ambos os experimentos. Os dados obtidos dessas comparações forneceram

informações relevantes que explicam, em parte, as diferenças observadas entre os efeitos da inoculação de LPS nos dias 3 e 5 de vida e os efeitos de uma inoculação prolongada entre os dias 2 a 7 de vida, sobre o comportamento exploratório de ratos adolescentes.

No Experimento 1, observou-se que a administração de LPS nos dias 3 e 5 de vida teve como resultado o aumento da atividade exploratória de ratos adolescentes. Comparados com os controles, os ratos tratados com LPS exibiram um padrão de comportamento semelhante em cada um dos seis testes comportamentais aos quais foram expostos. Esse perfil de comportamento caracterizou-se pelo aumento de locomoção, busca de novidade e exposição ao risco. No entanto, a administração prolongada de LPS entre os dias 2 a 7 de vida, além de não parecer ter um efeito claro sobre o comportamento exploratório de ratos adolescentes, também não resultou em um padrão de comportamento semelhante ao longo dos testes utilizados.

De forma geral, os resultados obtidos nos testes comportamentais sugerem que o tipo de manipulação à qual os animais foram expostos no início de vida pode representar intensidades diferentes de estresse, com a capacidade de produzir alterações comportamentais a longo prazo. O primeiro tipo de manipulação consiste no procedimento ao que foram submetidos os controles do Experimento 1: separação da mãe para registro de peso (C2), bem como para a administração de solução veicular nos dias 3 e 5 de vida (P2). Comparado com os outros grupos, esse tipo de manipulação não parece alterar o comportamento exploratório em nenhum dos testes comportamentais utilizados. Considerando que ratos adolescentes desses dois grupos exibiram um padrão comportamental semelhante durante todos os testes, sugere-se que essa manipulação represente um nível baixo de estresse precoce. O segundo tipo de manipulação consiste na separação repetida da mãe, durante seis dias, para registro de peso (C6). Quando comparados com os animais dos grupos que foram expostos ao primeiro tipo de manipulação, ratos adolescentes expostos à separação repetida exibiram redução nas medidas de ansiedade no campo aberto, menos neofobia nas duas sessões do teste de reconhecimento de objeto, aumento da exploração direcionada na tábua de buracos e, exceto no labirinto em cruz elevado e nado forçado, aumento da frequência de levantadas. Considerando que ratos adolescentes desse grupo exibiram aumento da atividade exploratória em alguns dos testes utilizados, sugere-se que essa manipulação represente um nível de estresse precoce de baixo a moderado. O terceiro tipo de manipulação consistiu na separação diária da mãe durante seis dias para registro de peso e administração intraperitoneal de solução veicular (P6). Comparados com os animais expostos a seis injeções diárias de LPS, os ratos adolescentes do grupo P6 exibiram diminuição nas medidas relacionadas à ansiedade no labirinto em cruz elevado. Comparados com os animais expostos aos dois tipos de manipulação descritos anteriormente, esses ratos exibiram

diminuição das medidas de ansiedade no campo aberto e aumento da frequência de levantadas, bem como aumento da locomoção na periferia desse aparato quando comparados com os animais que receberam duas injeções de solução veículo. Comparados com os animais expostos ao primeiro tipo de manipulação, esses animais exibiram menos neofobia no teste de reconhecimento de objeto e aumento da frequência de levantadas. A partir dos efeitos observados, sugere-se que essa manipulação represente um nível moderado de estresse precoce.

A manipulação repetida durante seis dias parece resultar na desinibição do comportamento na adolescência, um efeito semelhante ao produzido pela administração de LPS nos dias 3 e 5 de vida. No entanto, os resultados mostraram que unicamente os animais tratados com duas injeções de LPS exibem aumento da locomoção e diminuição da ansiedade no labirinto em cruz elevado, bem como índices de impulsividade no gradiente de aversão elevado. Dessa forma, os efeitos da inoculação de LPS no início de vida podem ser diferenciados de outros tipos de estresse precoce. No caso da inoculação prolongada de LPS, o efeito da infecção pode confundir-se com o efeito da exposição a manipulações repetidas, como observado no grupo controle desse experimento. Contudo, os resultados obtidos no teste de nado forçado parecem indicar um efeito específico da administração prolongada de LPS durante seis dias. Na primeira sessão desse teste, os animais expostos a manipulações diárias repetidas exibiram um estilo ativo de lidar com a situação de estresse, quando comparados com os animais que foram manipulados nos dias 3 e 5 de vida. No entanto, diferente dos animais submetidos a manipulações diárias repetidas, os ratos tratados com seis injeções de LPS exibiram um estilo passivo, aumentando o tempo de imobilidade. Quando re-expostos ao teste, esses mesmos animais exibiram um estilo ativo, reduzindo o tempo de imobilidade.

Os resultados anteriores sugerem que eventos prolongados de estresse no início de vida podem preparar os indivíduos para lidar melhor com situações repetidas de estresse a longo prazo. O comportamento exibido pelos animais expostos a manipulações repetidas durante seis dias parecem apoiar a idéia anterior. No labirinto em cruz elevado, o primeiro a ser realizado dentre os testes da bateria, não se observaram muitas diferenças entre os seis grupos de animais utilizados neste estudo. No entanto, a partir do segundo teste, o campo aberto, os animais dos grupos manipulados de forma prolongada parecem mudar seu repertório comportamental: de um perfil inibido na sessão do labirinto em cruz elevado, passaram a exibir um perfil desinibido no segundo teste.

Em comparação com o modelo de inoculação de LPS nos dias 3 e 5 de vida, os resultados da inoculação prolongada devem ser interpretados cautelosamente dada a interferência de outros tipos de estresse precoce. Mas a relação entre inoculação prolongada no

início de vida e estilos de enfrentamento do estresse na adolescência parece ser uma promissora linha de pesquisa.

4. Discussão geral

O perfil comportamental de ratos adolescentes tratados com LPS nos dias 3 e 5 de vida caracterizou-se pelo aumento da atividade exploratória em ambientes novos. Esses animais exibiram pouca neofobia, aumentaram a locomoção, a exploração de áreas abertas, além da exploração de novos estímulos. No conjunto, esses resultados sugerem que a inoculação de LPS, nesse esquema de duas administrações, resulta em um repertório de comportamento impulsivo em resposta à novidade. Os achados anteriores foram coerentes com resultados observados em humanos e em animais com experiência de estresse precoce. Sabe-se por exemplo que a redução do auto-controle é um dos principais comportamentos característicos de psicopatologias decorrentes de maus-tratos em crianças (Hildyard e Wolfe, 2002; Tarquis, 2006). Nessa mesma direção, demonstrou-se que ratos adolescentes previamente submetidos à separação materna eram propensos a exibir comportamentos impulsivos, incluindo a incapacidade de esperar, e um aumento da reatividade a um novo ambiente (Marco et al., 2007). Relacionado às evidências anteriores, tem-se sugerido que eventos estressantes na infância podem levar ao comprometimento permanente dos processos inibitórios, governado principalmente pelo córtex frontal, sobre a resposta do sistema límbico ao medo (Braquehais et al., 2010). Embora diversos estudos tenham descrito efeitos duradouros da infecção precoce sobre o comportamento, relacionados principalmente à ansiedade e à locomoção (Spencer et al., 2005; Walker et al., 2004; 2009), bem como ao comprometimento da memória (Bilbo et al., 2005; 2006), os dados apresentados no primeiro experimento constituem, até onde se sabe, uma evidência inicial de fatores imunológicos associados ao comportamento impulsivo na adolescência.

Os efeitos da inoculação prolongada de LPS durante os dias 2 a 7 de vida parecem confundir-se com os efeitos do estresse precoce, produzidos pela manipulação repetida. Contudo, os resultados sugerem que ratos adolescentes expostos a uma inoculação prolongada de LPS no início de vida exibem repertórios de comportamento que dependem da novidade do ambiente. Quando expostos a situações totalmente novas, como o labirinto em cruz elevado e a primeira sessão do nado forçado, esses animais exibiram respectivamente, aumento das medidas relacionadas com ansiedade e um estilo passivo de lidar com o estresse. Esse repertório comportamental mudou no campo aberto e na segunda sessão do nado forçado, nas quais os sujeitos exibiram diminuição das medidas relacionadas com ansiedade e um estilo

ativo de lidar com o estresse. Na primeira sessão do nado forçado observou-se um aumento do tempo de imobilidade, uma medida associada a sintomas depressivos (Porsolt, 1976). Considerando que sintomas depressivos estão fortemente relacionados com a inflamação crônica (Dantzer et al., 2008), os resultados sugerem que uma inoculação prolongada de LPS durante o início de vida pode aumentar a probabilidade de aparição desses sintomas na adolescência.

Os resultados dos experimentos anteriores mostraram que a inoculação de LPS no início de vida pode alterar o comportamento exploratório de ratos adolescentes. Contudo, a comparação dos experimentos realizados sugere que o comportamento exploratório parece depender de (1) fatores presentes no início de vida como o tipo e a intensidade do evento de estresse precoce e (2) fatores presentes na adolescência como a re-exposição a ambientes. Expostos à novidade, ratos adolescentes testados no labirinto em cruz elevado exibiram comportamentos relacionados à ansiedade que parecem corresponder a uma função em U da intensidade de estresse ao qual foram submetidos no início de vida. Sugere-se assim, que eventos estressantes de baixa ou alta intensidade resultariam no aumento das medidas relacionadas com ansiedade, enquanto eventos de intensidade moderada levariam à diminuição dessas medidas. Por outra parte, após a primeira experiência com um ambiente novo, ratos adolescentes testados no campo aberto e nos testes consecutivos, exibiram comportamentos relacionados a ansiedade e neofobia que parecem corresponder a uma função linear da intensidade do estresse precoce. Nesse caso, sugere-se que eventos estressantes de baixa intensidade resultariam no aumento das medidas relacionadas com ansiedade, enquanto eventos de intensidade moderada e alta levariam à diminuição dessas medidas.

Os resultados sugerem também que o estresse produzido pela inoculação precoce de LPS resulta em respostas específicas à novidade. Por exemplo, apenas os animais tratados com LPS nos dias 3 e 5 de vida exibiram aumento nas medidas relacionadas à impulsividade, além de diminuição nas medidas relacionadas à ansiedade na primeira exposição a um ambiente novo. Nessa mesma direção, o tratamento com LPS no início de vida, seja no paradigma de duas administrações seja no de inoculação prolongada por seis dias, alterou o número de levantadas pelos ratos adolescentes expostos aos testes de exploração forçada. O comportamento exploratório de levantar-se pode servir como uma medida para diferenciar perfis de alta ou baixa resposta à novidade (Pawlak e Schwarting, 2002; Thiel et al., 1999). Ratos que exibem aumento de levantadas em resposta à novidade, diferenciam-se daqueles que exibem poucas levantadas tanto na atividade dopaminérgica no estriado (Thiel et al., 1999), quanto na atividade colinérgica no hipocampo (Thiel et al., 1998). Considerando que a administração de LPS induz um aumento de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez podem

afetar neurônios do hipocampo (Bauman et al., 1997; Bilbo et al., 2005), e que a administração de LPS causa lesões de neurônios dopaminérgicos da substância negra (Fan et al., 2005; 2008), sugere-se que o aumento de levantadas em resposta à novidade por ratos adolescentes tratados com LPS seja o resultado de alterações permanentes nessas estruturas.

Do ponto de vista do valor adaptativo, os resultados deste estudo indicam que as condições às quais foram expostos os animais durante a primeira semana de vida parecem prepará-los para lidar, na adolescência, com ambientes de condições semelhantes. Filhotes que foram manipulados de forma repetida parecem se habituarem melhor a novos ambientes na adolescência. Em outras palavras, é como se a exposição precoce a eventos prolongados de estresse determinasse repertórios comportamentais que permitissem lidar melhor, no futuro, com a exposição a situações prolongadas de estresse. O processo pelo qual os eventos da vida precoce afetam permanentemente os sistemas fisiológicos tem sido descrito como programação perinatal, um conceito baseado na ideia de que experiências durante o início de vida podem modular o curso normal do desenvolvimento, tendo como resultado alterações permanentes que podem incluir o comportamento (Hodgson e Coe, 2006). Um exemplo importante dessa programação consiste na correlação entre baixo peso ao nascer (devido à fome) e o risco de obesidade em humanos adultos. Esse exemplo é conhecido como a hipótese do "fenótipo poupador", porque, na ausência de calorias suficientes no ambiente fetal, o metabolismo neonatal prepara ou "programa" o indivíduo para conservar calorias, mesmo na idade adulta (Hales e Barker, 1992). No entanto, o excesso de alimentos com que o indivíduo se depara posteriormente, torna essa programação não-adaptativa. Outro exemplo corresponde à "hipótese da higiene", uma forma de explicar o aumento da incidência de asma, alergias e outras doenças auto-imunes em países desenvolvidos. A hipótese parte da ideia de que um ambiente muito estéril no início de vida não fornece suficiente informação para o sistema imunológico, com o conseqüente excesso de reações imunológicas na vida adulta (para uma revisão, ver, Sironi e Clerice, 2010). Os resultados obtidos parecem indicar que eventos de estresse no início de vida, relacionados com fatores imunológicos, podem programar o comportamento exploratório. Considerando que em ratos adolescentes, um perfil de comportamento impulsivo em resposta à novidade pode ter como conseqüência, de um lado, uma maior exposição a perigos (predadores, venenos etc) e, de outro, facilitar um perfil de rato alfa (baixa neofobia na exploração de novos ambientes, disputa de hierarquia), os resultados parecem indicar que esse repertório de comportamentos possa estar associado a um padrão de respostas do sistema imunológico que garanta a sobrevivência dos indivíduos que exibem esse perfil comportamental.

Em conclusão, o estudo destaca a importância da experiência precoce com organismos

infecciosos e a sua contribuição na elaboração de respostas adaptativas à novidade. Estudos futuros são necessário para entender melhor os mecanismos subjacentes à relação bidirecional entre sistema imunológico e programação do comportamento.

5. Referências bibliográficas

- Alexander, C., & Rietschel, E. T. (2001). Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of Endotoxin Research*, 7(3), 167-202.
- Andersen, S. L., Thompson, A. T., Rutstein, M., Hostetter, J. C., & Teicher, M. H. (2000). Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. *Synapse (New York, N.Y.)*, 37(2), 167-169.
- Bardo, M., Bowling, S., Robinet, P., Rowlett, J., Lacy, M., & Mattingly, B. (1993). Role of Dopamine D1 and D2 Receptors in Novelty-Maintained Place Preference. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 1(1-4), 101-109.
- Bauman, M. L., Filipek, P. A., & Kemper, T. L. (1997). Early infantile autism. *International Review of Neurobiology*, 41, 367-386.
- Beane, M. L., Cole, M. A., Spencer, R. L., & Rudy, J. W. (2002). Neonatal handling enhances contextual fear conditioning and alters corticosterone stress responses in young rats. *Hormones and Behavior*, 41(1), 33-40.
- Beishuizen, A., & Thijs, L. G. (2003). Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Journal of Endotoxin Research*, 9(1), 3-24.
- Besedovsky, H. O., del Rey, A., Klusman, I., Furukawa, H., Monge Arditi, G., & Kabiersch, A. (1991). Cytokines as modulators of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 40(4-6), 613-618.
- Bilbo, S. D. (2010). Early-life infection is a vulnerability factor for aging-related glial alterations and cognitive decline. *Neurobiology of Learning and Memory*, 94(1), 57-64.
- Bilbo, S. D., Barrientos, R. M., Eads, A. S., Northcutt, A., Watkins, L. R., Rudy, J. W., & Maier, S. F. (2008). Early-life infection leads to altered BDNF and IL-1beta mRNA expression in rat hippocampus following learning in adulthood. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(4), 451-455.
- Bilbo, S. D., Levkoff, L. H., Mahoney, J. H., Watkins, L. R., Rudy, J. W., & Maier, S. F. (2005). Neonatal infection induces memory impairments following an immune challenge in adulthood. *Behavioral Neuroscience*, 119(1), 293-301.
- Bilbo, S. D., Rudy, J. W., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2006). A behavioural characterization of neonatal infection-facilitated memory impairment in adult rats. *Behavioural Brain Research*, 169(1), 39-47.
- Boksa, P. (2010). Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(6), 881-897.
- Braquehais, M. D., Oquendo, M. A., Baca-García, E., & Sher, L. (2010). Is impulsivity a link between childhood abuse and suicide? *Comprehensive Psychiatry*, 51(2), 121-129.
- Breivik, T., Stephan, M., Brabant, G. E., Straub, R. H., Pabst, R., & von Hörsten, S. (2002). Postnatal lipopolysaccharide-induced illness predisposes to periodontal disease in adulthood. *Brain, Behavior, and Immunity*, 16(4), 421-438.
- Brodsky, B. S., & Stanley, B. (2008). Adverse childhood experiences and suicidal behavior. *The Psychiatric Clinics of North America*, 31(2), 223-235.
- Bumiller, A., Götz, F., Rohde, W., & Dörner, G. (1999). Effects of repeated injections of interleukin 1beta or lipopolysaccharide on the HPA axis in the newborn rat. *Cytokine*, 11(3), 225-230.
- Cai, Z., Pan, Z. L., Pang, Y., Evans, O. B., & Rhodes, P. G. (2000). Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatric Research*, 47(1), 64-72.
- Caldji, C., Francis, D., Sharma, S., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (2000). The effects of early rearing environment on the development of GABAA and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 22(3), 219-229.
- Clark, R. E., Zola, S. M., & Squire, L. R. (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(23), 8853-8860.
- Colorado, R. A., Shumake, J., Conejo, N. M., Gonzalez-Pardo, H., & Gonzalez-Lima, F. (2006). Effects of maternal separation, early handling, and standard facility rearing on orienting and impulsive behavior of adolescent rats. *Behavioural Processes*, 71(1), 51-58.
- Coyle, P., Tran, N., Fung, J. N. T., Summers, B. L., & Rofe, A. M. (2009). Maternal dietary zinc supplementation prevents aberrant behaviour in an object recognition task in mice offspring exposed to LPS in early pregnancy. *Behavioural Brain Research*, 197(1), 210-218.
- Cross-Mellor, S. K., Kent, W. D., Kavaliers, M., & Ossenkopp, K. P. (2000). Examining the effects of lipopolysaccharide and cholecystokinin on water ingestion: comparing intake and palatability. *Brain Research*, 861(2), 220-232.
- Cryan, J. F., & Slattery, D. A. (2007). Animal models of mood disorders: Recent developments. *Current Opinion*

- in *Psychiatry*, 20(1), 1-7.
- Cryan, J. F., Valentino, R. J., & Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 547-569.
- Daniels, W. M. U., Pietersen, C. Y., Carstens, M. E., & Stein, D. J. (2004). Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metabolic Brain Disease*, 19(1-2), 3-14.
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(1), 46-56.
- Dent, G. W., Smith, M. A., & Levine, S. (1999). The ontogeny of the neuroendocrine response to endotoxin. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 117(1), 21-29.
- Ellis, S., Mouihate, A., & Pittman, Q. J. (2006). Neonatal programming of the rat neuroimmune response: stimulus specific changes elicited by bacterial and viral mimetics. *The Journal of Physiology*, 571(Pt 3), 695-701.
- Engeland, C. G., Kavaliers, M., & Ossenkopp, K. (2003). Sex differences in the effects of muramyl dipeptide and lipopolysaccharide on locomotor activity and the development of behavioral tolerance in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 74(2), 433-447.
- Engeland, C. G., Kavaliers, M., & Ossenkopp, K. (2006). Influence of the estrous cycle on tolerance development to LPS-induced sickness behaviors in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 31(4), 510-525.
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47-59.
- Estanislau, C., & Morato, S. (2006). Behavior ontogeny in the elevated plus-maze: prenatal stress effects. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 24(4), 255-262.
- Fan, H., & Cook, J. A. (2004). Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *Journal of Endotoxin Research*, 10(2), 71-84.
- Fan, L., Pang, Y., Lin, S., Tien, L., Ma, T., Rhodes, P. G., & Cai, Z. (2005). Minocycline reduces lipopolysaccharide-induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. *Journal of Neuroscience Research*, 82(1), 71-82.
- Fan, L., Tien, L., Mitchell, H. J., Rhodes, P. G., & Cai, Z. (2008). Alpha-phenyl-n-tert-butyl-nitrone ameliorates hippocampal injury and improves learning and memory in juvenile rats following neonatal exposure to lipopolysaccharide. *The European Journal of Neuroscience*, 27(6), 1475-1484.
- File, S. E., & Wardill, A. G. (1975). Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia*, 44(1), 53-59.
- Fortier, M., Joobar, R., Luheshi, G. N., & Boksa, P. (2004). Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine-induced locomotion and startle responses in adult rat offspring. *Journal of Psychiatric Research*, 38(3), 335-345.
- Franklin, A. E., Engeland, C. G., Kavaliers, M., & Ossenkopp, K. (2003). Lipopolysaccharide-induced hypoactivity and behavioral tolerance development are modulated by the light-dark cycle in male and female rats. *Psychopharmacology*, 170(4), 399-408.
- Gaskin, S., Tardif, M., Cole, E., Piterkin, P., Kayello, L., & Mumby, D. G. (2010). Object familiarization and novel-object preference in rats. *Behavioural Processes*, 83(1), 61-71.
- Gaykema, R. P., Goehler, L. E., Tilders, F. J., Bol, J. G., McGorry, M., Fleshner, M., Maier, S. F., et al. (1998). Bacterial endotoxin induces fos immunoreactivity in primary afferent neurons of the vagus nerve. *Neuroimmunomodulation*, 5(5), 234-240.
- Gilmore, J. H., Fredrik Jarskog, L., Vadlamudi, S., & Lauder, J. M. (2004). Prenatal infection and risk for schizophrenia: IL-1beta, IL-6, and TNFalpha inhibit cortical neuron dendrite development. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 29(7), 1221-1229.
- Girard, S., Kadhim, H., Roy, M., Lavoie, K., Brochu, M., Larouche, A., & Sébire, G. (2009). Role of perinatal inflammation in cerebral palsy. *Pediatric Neurology*, 40(3), 168-174.
- Gomes, C. M., Donadio, M. V. F., Franskoviaki, I., Anselmo-Franci, J. A., Franci, C. R., Lucion, A. B., & Sanvito, G. L. (2006). Neonatal handling reduces angiotensin II receptor density in the medial preoptic area and paraventricular nucleus but not in arcuate nucleus and locus coeruleus of female rats. *Brain Research*, 1067(1), 177-180.
- Goshen, I., & Yirmiya, R. (2009). Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30(1), 30-45.
- Granger, D. A., Hood, K. E., Dreschel, N. A., Sergeant, E., & Likos, A. (2001). Developmental effects of early immune stress on aggressive, socially reactive, and inhibited behaviors. *Development and Psychopathology*, 13(3), 599-610.
- Granger, D. A., Hood, K. E., Ikeda, S. C., Reed, C. L., & Block, M. L. (1996). Neonatal endotoxin exposure alters the development of social behavior and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in selectively bred mice.

Brain, Behavior, and Immunity, 10(3), 249-259.

- Haddad, J. J., Saadé, N. E., & Safieh-Garabedian, B. (2002). Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *Journal of Neuroimmunology*, 133(1-2), 1-19.
- Hales, C. N., & Barker, D. J. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35(7), 595-601.
- Harré, E., Galic, M. A., Mouihate, A., Noorbakhsh, F., & Pittman, Q. J. (2008). Neonatal inflammation produces selective behavioural deficits and alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA in the adult rat brain. *The European Journal of Neuroscience*, 27(3), 644-653.
- Hart, B. L. (1988). Biological basis of the behavior of sick animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 12(2), 123-137.
- Hava, G., Vered, L., Yael, M., Mordechai, H., & Mahoud, H. (2006). Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. *Developmental Psychobiology*, 48(2), 162-168.
- Herlenius, E., & Lagercrantz, H. (2001). Neurotransmitters and neuromodulators during early human development. *Early Human Development*, 65(1), 21-37.
- Hildyard, K. L., & Wolfe, D. A. (2002). Child neglect: developmental issues and outcomes. *Child Abuse & Neglect*, 26(6-7), 679-695.
- Hodgson, D. M., & Knott, B. (2002). Potentiation of tumor metastasis in adulthood by neonatal endotoxin exposure: sex differences. *Psychoneuroendocrinology*, 27(7), 791-804.
- Hodgson, D. M., & Coe, C. L. (2006). *Perinatal programming: early life determinants of adult health & disease*. Taylor & Francis.
- Hodgson, D. M., Knott, B., & Walker, F. R. (2001). Neonatal endotoxin exposure influences HPA responsivity and impairs tumor immunity in Fischer 344 rats in adulthood. *Pediatric Research*, 50(6), 750-755.
- Huleihel, M., Golan, H., & Hallak, M. (2004). Intrauterine infection/inflammation during pregnancy and offspring brain damages: possible mechanisms involved. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 2, 17.
- Imanaka, A., Morinobu, S., Toki, S., & Yamawaki, S. (2006). Importance of early environment in the development of post-traumatic stress disorder-like behaviors. *Behavioural Brain Research*, 173(1), 129-137.
- Jenkins, T. A., Harte, M. K., Stenson, G., & Reynolds, G. P. (2009). Neonatal lipopolysaccharide induces pathological changes in parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the rat. *Behavioural Brain Research*, 205(2), 355-359.
- Karrow, N. A. (2006). Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system during inflammation and altered programming of the neuroendocrine-immune axis during fetal and neonatal development: lessons learned from the model inflammagen, lipopolysaccharide. *Brain, Behavior, and Immunity*, 20(2), 144-158.
- Kendler, K. S., Sheth, K., Gardner, C. O., & Prescott, C. A. (2002). Childhood parental loss and risk for first-onset of major depression and alcohol dependence: the time-decay of risk and sex differences. *Psychological Medicine*, 32(7), 1187-1194.
- Koehnle, T. J., & Rinaman, L. (2010). Early experience alters limbic forebrain Fos responses to a stressful interoceptive stimulus in young adult rats. *Physiology & Behavior*, 100(2), 105-115.
- Kohman, R. A., Tarr, A. J., Sparkman, N. L., Bogale, T. M. H., & Boehm, G. W. (2008). Neonatal endotoxin exposure impairs avoidance learning and attenuates endotoxin-induced sickness behavior and central IL-1beta gene transcription in adulthood. *Behavioural Brain Research*, 194(1), 25-31.
- Ladd, C. O., Huot, R. L., Thirivikraman, K. V., Nemeroff, C. B., Meaney, M. J., & Plotsky, P. M. (2000). Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Progress in Brain Research*, 122, 81-103.
- Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Setem, J., & Morato, S. (2008). Thigmotactic responses in an open-field. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 41(2), 135-140.
- Lanté, F., Meunier, J., Guiramand, J., De Jesus Ferreira, M., Cambonie, G., Aimar, R., Cohen-Solal, C., et al. (2008). Late N-acetylcysteine treatment prevents the deficits induced in the offspring of dams exposed to an immune stress during gestation. *Hippocampus*, 18(6), 602-609.
- Laviola, G., Macri, S., Morley-Fletcher, S., & Adriani, W. (2003). Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(1-2), 19-31.
- Lehmann, J., & Feldon, J. (2000). Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Reviews in the Neurosciences*, 11(4), 383-408.
- Lesage, J., Sebaai, N., Leonhardt, M., Dutriez-Casteloot, I., Breton, C., Deloof, S., & Vieau, D. (2006). Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 9(4), 183-198.
- Levy, E. A., Paolini, A. G., Govic, A., Hazi, A., Penman, J., & Kent, S. (2010). HPA and sympathoadrenal activity of adult rats perinatally exposed to maternal mild calorie restriction. *Behavioural Brain Research*, 208(1), 202-208.
- Levine, S. (2005). Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology*,

- 30(10), 939-946.
- Lippmann, M., Bress, A., Nemeroff, C. B., Plotsky, P. M., & Monteggia, L. M. (2007). Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *The European Journal of Neuroscience*, 25(10), 3091-3098.
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(6), 434-445.
- Macri, S., Mason, G. J., & Würbel, H. (2004). Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. *The European Journal of Neuroscience*, 20(4), 1017-1024.
- Macri, S., & Würbel, H. (2006). Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: a critical review of the maternal mediation hypothesis. *Hormones and Behavior*, 50(5), 667-680.
- Marco, E. M., Adriani, W., Llorente, R., Laviola, G., & Viveros, M. (2009). Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(4), 498-507.
- Marco, E. M., Adriani, W., Canese, R., Podo, F., Viveros, M. P., & Laviola, G. (2007). Enhancement of endocannabinoid signalling during adolescence: Modulation of impulsivity and long-term consequences on metabolic brain parameters in early maternally deprived rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 86(2), 334-345.
- Marx, C. E., Jarskog, L. F., Lauder, J. M., Lieberman, J. A., & Gilmore, J. H. (2001). Cytokine effects on cortical neuron MAP-2 immunoreactivity: implications for schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 50(10), 743-749.
- McGowan, P. O., Sasaki, A., D'Alessio, A. C., Dymov, S., Labonté, B., Szyf, M., Turecki, G., et al. (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature Neuroscience*, 12(3), 342-348.
- Meaney, M. J., Diorio, J., Francis, D., Widdowson, J., LaPlante, P., Caldji, C., Sharma, S., et al. (1996). Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Developmental Neuroscience*, 18(1-2), 49-72.
- Meyer, U., Feldon, J., Schedlowski, M., & Yee, B. K. (2006). Immunological stress at the maternal-foetal interface: a link between neurodevelopment and adult psychopathology. *Brain, Behavior, and Immunity*, 20(4), 378-388.
- Millstein, R. A., & Holmes, A. (2007). Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31(1), 3-17.
- Misiewicz, B., Poltorak, M., Gomez, M., Glowa, J. R., Gold, P. W., & Sternberg, E. M. (1996). Intracerebroventricularly transplanted embryonic neuronal tissue from inflammatory-resistant F344/N rats decreases acoustic startle responses in inflammatory-susceptible LEW/N rats. *Cell Transplantation*, 5(2), 287-291.
- Misiewicz, B., Zelazowska, E., Raybourne, R. B., Cizza, G., & Sternberg, E. M. (1996). Inflammatory responses to carrageenan injection in LEW/N and F344/N rats: LEW/N rats show sex- and age-dependent changes in inflammatory reactions. *Neuroimmunomodulation*, 3(2-3), 93-101.
- Morgan, C., Kirkbride, J., Leff, J., Craig, T., Hutchinson, G., McKenzie, K., Morgan, K., et al. (2007). Parental separation, loss and psychosis in different ethnic groups: a case-control study. *Psychological Medicine*, 37(4), 495-503.
- Moritz, K. M., Boon, W. M., & Wintour, E. M. (2005). Glucocorticoid programming of adult disease. *Cell and Tissue Research*, 322(1), 81-88.
- Orsin, D., Vergnano, S., & Costello, A. (2004). Serious bacterial infections in newborn infants in developing countries. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 17(3), 217-224.
- Pang, Y., Cai, Z., & Rhodes, P. G. (2003). Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 140(2), 205-214.
- Paus, T., Keshavan, M., & Giedd, J. N. (2008). Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(12), 947-957.
- Pawlak, C. R., & Schwarting, R. K. W. (2002). Object preference and nicotine consumption in rats with high vs. low rearing activity in a novel open field. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 73(3), 679-687.
- Plotsky, P. M., Thrivikraman, K. V., Nemeroff, C. B., Caldji, C., Sharma, S., & Meaney, M. J. (2005). Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 30(12), 2192-2204.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730-732.
- Rico, J. L. R., Ferraz, D. B., Ramalho-Pinto, F. J., & Morato, S. (2010). Neonatal exposure to LPS leads to heightened exploratory activity in adolescent rats. *Behavioural Brain Research*, 215(1), 102-109.
- Roberson, R., Woodard, J. E., Toso, L., Abebe, D., Poggi, S. H., & Spong, C. Y. (2006). Postnatal inflammatory

- rat model for cerebral palsy: too different from humans. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195(4), 1038-1044.
- Romero, E., Ali, C., Molina-Holgado, E., Castellano, B., Guaza, C., & Borrell, J. (2007). Neurobehavioral and immunological consequences of prenatal immune activation in rats. Influence of antipsychotics. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 32(8), 1791-1804.
- Rosenberger, C. M., Scott, M. G., Gold, M. R., Hancock, R. E., & Finlay, B. B. (2000). Salmonella typhimurium infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(11), 5894-5904.
- Schröder, N., O'Dell, S. J., & Marshall, J. F. (2003). Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse (New York, N.Y.)*, 49(2), 89-96.
- Seckl, J. R., & Meaney, M. J. (2006). Glucocorticoid "programming" and PTSD risk. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1071, 351-378.
- Shanks, N., Larocque, S., & Meaney, M. J. (1995). Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: early illness and later responsivity to stress. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(1 Pt 1), 376-384.
- Shanks, N., & Meaney, M. J. (1994). Hypothalamic-pituitary-adrenal activation following endotoxin administration in the developing rat: a CRH-mediated effect. *Journal of Neuroendocrinology*, 6(4), 375-383.
- Shanks, N., Windle, R. J., Perks, P. A., Harbuz, M. S., Jessop, D. S., Ingram, C. D., & Lightman, S. L. (2000). Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5645-5650.
- Shea, A., Walsh, C., Macmillan, H., & Steiner, M. (2005). Child maltreatment and HPA axis dysregulation: relationship to major depressive disorder and post traumatic stress disorder in females. *Psychoneuroendocrinology*, 30(2), 162-178.
- Silverman, M. N., Pearce, B. D., Biron, C. A., & Miller, A. H. (2005). Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunology*, 18(1), 41-78.
- Sironi, M., & Clerici, M. (2010). The hygiene hypothesis: an evolutionary perspective. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 12(6), 421-427.
- Skogstrand, K., Hougaard, D. M., Schendel, D. E., Bent, N., Svaerke, C., & Thorsen, P. (2008). Association of preterm birth with sustained postnatal inflammatory response. *Obstetrics and Gynecology*, 111(5), 1118-1128.
- Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(4), 417-463.
- Spear, L. P., & Brake, S. C. (1983). Periadulthood: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Developmental Psychobiology*, 16(2), 83-109.
- Spencer, S. J., Heida, J. G., & Pittman, Q. J. (2005). Early life immune challenge--effects on behavioural indices of adult rat fear and anxiety. *Behavioural Brain Research*, 164(2), 231-238.
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Adams-Chapman, I., Fanaroff, A. A., Hintz, S. R., Vohr, B., & Higgins, R. D. (2004). Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 292(19), 2357-2365.
- SucHECKI, D., & Tufik, S. (1997). Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats. *The American Journal of Physiology*, 273(4 Pt 2), R1332-1338.
- Tarquis, N. (2006). [Neurobiological hypothesis relating to connections between psychopathy and childhood maltreatment]. *L'Encéphale*, 32(3 Pt 1), 377-384.
- Teicher, M. H., Tomoda, A., & Andersen, S. L. (2006). Neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment: are results from human and animal studies comparable? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1071, 313-323.
- Teicher, M. H., Andersen, S. L., & Hostetter, J. C. (1995). Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 89(2), 167-172.
- Tenk, C. M., Foley, K. A., Kavaliers, M., & Ossenkopp, K. (2007). Neonatal immune system activation with lipopolysaccharide enhances behavioural sensitization to the dopamine agonist, quinpirole, in adult female but not male rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(7), 935-945.
- Thiel, C. M., Huston, J. P., & Schwarting, R. K. (1998). Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience*, 85(4), 1253-1262.
- Thiel, C. M., Müller, C. P., Huston, J. P., & Schwarting, R. K. (1999). High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience*, 93(1), 243-251.
- Tilders, F. J., DeRijk, R. H., Van Dam, A. M., Vincent, V. A., Schotanus, K., & Persoons, J. H. (1994). Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals.

- Psychoneuroendocrinology*, 19(2), 209-232.
- Tönissaar, M., Mällo, T., Eller, M., Häidkind, R., Kõiv, K., & Harro, J. (2008). Rat behavior after chronic variable stress and partial lesioning of 5-HT-ergic neurotransmission: effects of citalopram. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 32(1), 164-177.
- Tyrka, A. R., Wier, L., Price, L. H., Ross, N., Anderson, G. M., Wilkinson, C. W., & Carpenter, L. L. (2008). Childhood parental loss and adult hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Biological Psychiatry*, 63(12), 1147-1154.
- Walker, A. K., Nakamura, T., Byrne, R. J., Naicker, S., Tynan, R. J., Hunter, M., & Hodgson, D. M. (2009). Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis. *Psychoneuroendocrinology*, 34(10), 1515-1525.
- Walker, F. R., Hodyl, N. A., Krivanek, K. M., & Hodgson, D. M. (2006). Early life host-bacteria relations and development: long-term individual differences in neuroimmune function following neonatal endotoxin challenge. *Physiology & Behavior*, 87(1), 126-134.
- Walker, F. R., Knott, B., & Hodgson, D. M. (2008). Neonatal endotoxin exposure modifies the acoustic startle response and circulating levels of corticosterone in the adult rat but only following acute stress. *Journal of Psychiatric Research*, 42(13), 1094-1103.
- Walker, F. R., March, J., & Hodgson, D. M. (2004). Endotoxin exposure in early life alters the development of anxiety-like behaviour in the Fischer 344 rat. *Behavioural Brain Research*, 154(1), 63-69.
- Wall, P. M., & Messier, C. (2001). Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(3), 275-286.
- Wang, H., Meng, X., Ning, H., Zhao, X., Wang, Q., Liu, P., Zhang, H., et al. (2010). Age- and gender-dependent impairments of neurobehaviors in mice whose mothers were exposed to lipopolysaccharide during pregnancy. *Toxicology Letters*, 192(2), 245-251.
- Wang, X., Rousset, C. I., Hagberg, H., & Mallard, C. (2006). Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 11(5), 343-353.
- Yuan, T., Yu, H., Gu, W., & Li, J. (2005). White matter damage and chemokine induction in developing rat brain after intrauterine infection. *Journal of Perinatal Medicine*, 33(5), 415-422.
- Zuckerman, L., Rehavi, M., Nachman, R., & Weiner, I. (2003). Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: a novel neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 28(10), 1778-1789.

6. Anexo

Esboço um manuscrito a ser vertido para o inglês e submetido à publicação à revista *Journal of Neuroscience Methods*, com autoria de J. L. R. Rico e S. Morato.

Gradiente de aversão elevado: um novo modelo animal para o estudo do comportamento impulsivo

Introdução

Diversos estudos sugerem que a impulsividade é um conceito multidimensional caracterizado principalmente pela desinibição do comportamento e a escolha impulsiva (Evenden, 1999a; Swann et al., 2002; Castellanos e Tannock, 2002; Franken e Muris, 2006; Reynolds et al., 2006; Winstanley et al., 2006). Outros estudos sugerem que a impulsividade reflete uma elevada procura da novidade e a tendência de assumir riscos (Eysenck e Eysenck, 1977; Eysenck et al., 1985; Cloninger et al., 1993; Romer D, 2010). Essas dimensões da impulsividade tem um papel essencial no abuso e dependência de drogas (Jentsch JD, 2008; Perry e Carrol, 2008; Groman et al., 2009) e no déficit de atenção e hiperatividade (Groman et al., 2009; Tripp e Wickens, 2009; Purper-Ouakil et al., 2010).

Diversos modelos relacionados à escolha impulsiva e inibição do comportamento tem sido utilizados para avaliar impulsividade em humanos e animais de laboratório (Winstanley et al., 2006; Perry e Carrol, 2008; Verbruggen e Logan, 2009). Em modelos animais, esse tipo de avaliação requer o treino prévio dos sujeitos em tarefas de comportamento operante como o atraso de reforço e tempos de reação (Monterosso e Ainslie, 1999; Evenden, 1999b; Evenden e Ko, 2005; Winstanley et al., 2006). Outros componentes da impulsividade como a busca de novidade e a tendência de assumir riscos tem sido medidos utilizando-se modelos de exploração forçada. Por exemplo, em ratos expostos a um campo aberto, a exploração de um objeto novo foi utilizada como parâmetro de impulsividade (Stansfield e Kirstein, 2006). Além disso, modelos animais que permitem avaliar ansiedade têm sido utilizados para a obtenção de índices de impulsividade (Colorado et al., 2006; Spivey et al., 2009; Pothakos et al., 2010). O campo aberto, o labirinto em cruz elevado e a caixa claro-escuro são alguns desses modelos (Lister, 1990; Carobrez e Bertoglio, 2005; Ramos, 2008; Ramos et al., 2008) e caracterizam-se pelo contraste entre um local relativamente seguro e outro menos seguro. Os índices de impulsividade obtidos a partir desses testes relacionam-se à exploração do local menos protegido desses aparatos, o que representaria uma medida de exposição a riscos (Colorado et al., 2006; Spivey et al., 2009; Pothakos et al., 2010).

A utilização de modelos de exploração forçada para a obtenção de índices de impulsividade tem algumas vantagens metodológicas. Como esses testes não exigem sessões prévias de treino em tarefas operantes, as medidas de impulsividade não estão diretamente relacionadas à aprendizagem. Nesse mesmo sentido, considerando-se a menor demanda de tempo desses procedimentos, medidas de impulsividade podem ser obtidas durante etapas cruciais e curtas do desenvolvimento, como a adolescência, um período crítico para o início do uso e dependência de drogas (Stansfield e Kirstein, 2006). Contudo, nos paradigmas de exploração forçada, os animais são geralmente expostos a mais de um teste comportamental (Colorado et al., 2006; Spivey et al., 2009; Pothakos et al., 2010) e esse procedimento pode afetar a sua resposta emocional devido à experiência prévia dos outros testes, intervalo de tempo entre testes e manuseio (Ramos et al., 2008; Ramos, 2008). Por essa razão torna-se importante elaborar e validar novos modelos que permitam avaliar o comportamento impulsivo em uma única sessão. Neste trabalho se elaborou e validou um modelo útil para o estudo experimental do comportamento impulsivo.

Método

Sujeitos. Foram utilizados ratos machos de uma derivação Wistar (220 ± 20 g) provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto submetidos a um período de habituação de 72 horas no biotério local. Os ratos foram alojados em caixas de polipropileno (seis por caixa de 40 x 34 x 17 cm), sob um ciclo claro-escuro de 12:12-h (luzes acesas às 07:00 h), temperatura mantida entre 24 e 27°C, com livre acesso a comida e água. Os testes comportamentais foram realizados entre 08:00 e 12:00 h.

Equipamento (Gradiente de aversão elevado - EAG). A construção do aparato —gradiente de aversão elevado— (Fig. 1) foi inspirada no labirinto em cruz elevado e na caixa claro-escuro. No entanto, diferente desses testes de ansiedade, o aparato apresentou o formato de uma pista com três compartimentos dispostos de forma gradualmente aversiva segundo a exploração do animal fora de uma área segura. Uma pista de fórmica de 210 cm de comprimento e 20 cm de largura, foi dividida em três áreas de 70 cm de comprimento e elevada a 40 cm do piso. Os primeiros 70 cm da pista consistiram em um compartimento completamente fechado, semelhante a um túnel, com piso de fórmica preta, duas paredes laterais com 25 cm de altura feitas de fórmica preta com uma porta de guilhotina (20 x 25 cm) na extremidade e cobertura de acrílico vermelho transparente. O acrílico, ao mesmo tempo em que barrou a luz visível ao rato, permitiu ainda a observação dos comportamentos do animal. Na parte oposta à porta de

guilhotina, uma abertura comunicava o túnel com os 70 cm seguintes da pista, que consistiram em um compartimento semelhante ao braço fechado de um labirinto em cruz elevado: piso de fórmica preta opaca fechado por duas paredes laterais (60 cm de altura) também de fórmica preta opaca. Esse compartimento não tinha cobertura na parte superior. A última parte da pista era semelhante a um braço aberto de labirinto em cruz elevado e consistiu de uma plataforma com piso de fórmica branca opaca cercada por três bordas de acrílico branco de 1 cm de altura. Uma lâmpada incandescente de 60 W forneceu claridade à sala de testes e permitiu uma intensidade (medida no centro de cada partição) de 2 lux no túnel, 20 lux no braço fechado e 35 lux no braço aberto.

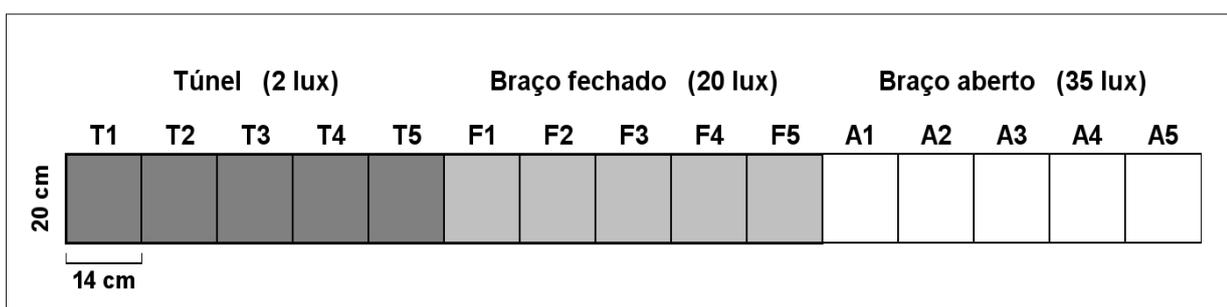


Fig. 1. Diagrama do gradiente de aversão elevado com as divisões usadas para o registro. Vista superior.

Procedimento. Cada animal foi colocado na extremidade do túnel e teve três minutos para explorar o aparato livremente. Após cada teste, o aparato foi limpo com uma solução de 5% de etanol e seco com papel toalha. As sessões experimentais foram gravadas por uma câmera montada verticalmente acima do aparato e acoplada a um computador em uma sala adjacente à sala de teste. Para registrar os deslocamentos e outros comportamentos, a imagem do piso do aparelho foi dividida em 15 seções (14 x 20 cm) proporcionais as dimensões reais do aparato em uma transparência colocada sobre o monitor. Uma entrada foi registrada sempre que o animal colocava ambas as patas traseiras em uma seção. Os deslocamentos e comportamentos foram registrados com o uso de um software elaborado no nosso laboratório para esse fim (O software pode ser descarregado livremente no site <http://scotty.ffclrp.usp.br/X-Plo-Rat.html>).

Comportamento exploratório em um estudo-piloto. Um estudo inicial foi realizado para se obter uma visão geral da resposta emocional dos animais expostos ao aparelho, bem como para determinar os parâmetros de sessão mais adequados para a realização do teste. Inicialmente, por desconhecer o comportamento dos ratos nesse aparelho, 10 sujeitos foram expostos a sessões de 240 minutos. Após a observação de que os sujeitos gastavam as três horas finais adormecidos dentro do túnel, decidiu-se registrar os comportamentos ocorridos apenas na primeira hora do

teste. Foi registrado o número de transições do túnel para o braço fechado e deste para o braço aberto. Finalmente, com finalidade de comparação, esses 60 minutos foram divididos em três intervalos de tempo, com base na observação assistemática das gravações: (1) os primeiros 3 minutos da sessão, e os intervalos compreendendo (2) do quarto ao décimo quinto minuto e (3) décimo sexto até o final da sessão. Foram somente consideradas as transições no sentido do túnel para o braço fechado e do braço fechado para o aberto.

Tratamento farmacológico. Considerando o efeito das drogas gabaérgicas sobre comportamentos relacionados à ansiedade (Rodgers, 1997; Chaouloff et al., 1997; Carobrez e Bertoglio, 2005; Ramos et al., 2008), bem como das drogas monoaminérgicas sobre comportamentos relacionados à impulsividade (Eveden, 1998; 1999b; Eveden e Ko, 2005; Davids et al. 2003), neste estudo investigou-se o efeito das drogas gabaérgicas clordiazepóxido e o pentilenotetrazol, assim como das drogas monoaminérgicas apomorfina e imipramina, sobre o comportamento de ratos expostos ao gradiente de aversão elevado. Durante 3 minutos, os animais foram expostos ao teste sendo tratados 30 min antes com 0, 5 e 10 mg/kg de clordiazepóxido (DEG, Brasil), cinco min antes com 0, 10 e 20 mg/kg de pentilenotetrazol (Sigma, EUA), quinze min antes com 0, 0,5 e 1 mg/kg de hidrocloreto de apomorfina (Sigma, EUA) e 30 min antes com as dose de 0, 8 e 16 mg/kg de cloridrato de imipramina (Liane Manipulação, Brasil), administrada de forma aguda e crônica. Os animais submetidos ao tratamento crônico, receberam injeções i.p. diárias de imipramina (16 mg/kg) durante 20 dias, e no dia seguinte receberam a última injeção 30 minutos antes do teste. Exceto o clordiazepóxido, que foi dissolvido em água destilada contendo uma gota de Tween 20, as outras drogas foram dissolvidas em salina (0,9%). Todas as drogas foram administradas em um volume de 1ml/kg. Os animais dos grupos controle receberam um volume similar das soluções veículo descritas antes.

Análises estatística. Os dados (média \pm EPM) do comportamento exploratório no estudo-piloto foram analisados através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, comparando os três intervalos de tempo em que foi dividida a sessão.

Para validação do aparato, foram observados os efeitos das drogas descritas anteriormente. Porém, antes de se analisar os dados farmacológicos, um maior número de sujeitos, que serviram de controles, teve seus dados submetidos a duas análises fatoriais, para se obter uma visão mais abrangente das dimensões comportamentais que o teste poderia estar avaliando. Para tanto, foram registradas as seguintes medidas: tempo gasto em cada uma das quinze seções em que foi dividida a pista, número de entradas no braço fechado e no braço

aberto, latência de entrada no braço aberto, distância total percorrida e a frequência de levantar-se nas patas traseiras. A primeira análise fatorial foi realizada a partir das medidas de tempo gasto em cada uma das 15 seções em que foi dividida a pista. Os tempos nas áreas que correlacionaram com os fatores obtidos na primeira análise fatorial fizeram parte da segunda análise, que incluiu também as medidas comportamentais registradas.

Cada análise fatorial foi realizada através do método de componentes principais seguida de uma rotação ortogonal Varimax. Foram considerados unicamente os fatores com autovalores superiores a 1 e as cargas para cada fator superiores a 0,4. Somente após as análises fatoriais foi que os efeitos dos diferentes fármacos utilizados foram analisados, utilizando as medidas comportamentais representativas de cada um dos fatores encontrado na análise. Os dados do tratamento farmacológico foram analisados com análise de variância (ANOVA). Quando os dados não mostravam um critério de normalidade, analisaram-se através dos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. Sempre que apropriado, foi utilizado o teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. Em todos os casos, valores de P iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

Resultados

Comportamento exploratório no estudo-piloto. A Figura 2 resume o comportamento exploratório de animais durante uma hora de sessão. O teste de Kruskal-Wallis mostrou diferenças significativas entre os intervalos de tempo em que foi dividida a sessão, tanto na frequência de entradas no braço fechado ($H_{[2]} = 18,10$, $P < 0,001$) quanto na frequência de entradas no braço aberto ($H_{[2]} = 8,923$, $P = 0,012$). As comparações *post-hoc* indicaram que os animais realizaram mais entradas no braço fechado e no braço aberto durante os três primeiros minutos quando comparado com os 12 minutos seguintes e com os últimos 45 minutos da sessão.

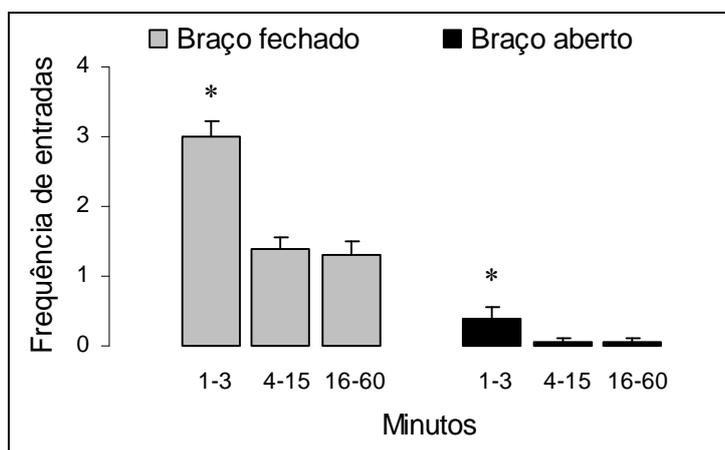


Figura 2. Exploração fora do túnel durante uma hora de sessão.

*, Diferente dos outros intervalos de tempo (Student-Newman-Keuls).

Tabela 1. Análise de componentes principais com rotação ortogonal Varimax das medidas de tempo gasto em cada uma das 15 seções em que foi dividida a pista.

Parâmetros	Fatores				
	1	2	3	4	5
<i>Túnel</i>					
T1	-0,466		-0,683		
T2				-0,821	
T3			0,789		
T4			0,736		
T5					-0,931
<i>Braço fechado</i>					
F1	0,555			0,442	
F2	0,741				
F3	0,724				
F4	0,788				
F5	0,783				
<i>Braço aberto</i>					
A1		0,416			
A2		0,737			
A3		0,764			
A4		0,799			
A5		0,825			
% Variância	25,47	14,58	11,12	10,07	7,22

Análise fatorial. A Tabela 1 resume os resultados da primeira análise de componentes principais, realizada a partir das medidas de tempo gasto em cada uma das 15 seções em que foi dividida a pista. Após uma rotação ortogonal Varimax emergiram cinco fatores representando o 68,45% da variância. Os primeiros dois fatores, que representaram 40,04% da variância, eram relacionados, respectivamente, às medidas de tempo gasto no braço fechado e no braço aberto. As medidas de tempo gasto em seções do túnel contribuíram para a emergência dos últimos três fatores. O tempo de permanência nas cinco seções do braço fechado correlacionou-se de forma positiva com o primeiro fator, enquanto o tempo na extremidade do túnel (T1) correlacionou de forma negativa. O segundo fator relacionou-se unicamente ao tempo de permanência nas seções do braço aberto. O tempo na extremidade do túnel (T1) e na seção seguinte (T2) correlacionaram-se de forma negativa com o fator 3 e 4 respectivamente. Finalmente, o fator cinco foi representado pelo tempo na área de transição do túnel para o braço fechado. A partir dessa primeira análise foi possível identificar quatro áreas importantes do gradiente de aversão

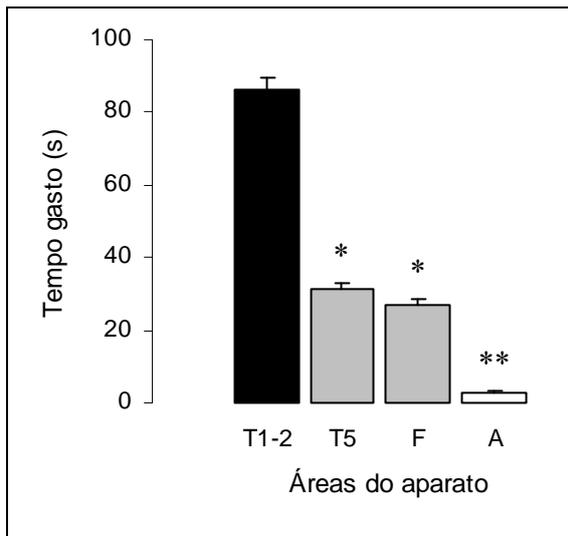


Figura 3. Tempo de permanência nas quatro áreas do aparato obtidas após a análise de componentes principais.

** , Diferente das outras áreas do aparato; * , Diferente da área T1-2 (Student-Newman-Keuls).

elevado: (1) a extremidade do túnel (T1 e T2), (2) a seção de transição entre o túnel e braço fechado (T5), (3) as cinco seções do braço fechado (F1 a F5) e (4) as cinco seções do braço aberto (de A1 a A5).

A Figura 3 ilustra o tempo de permanência nas quatro áreas do aparato, obtidas após a análise de componentes principais. O teste Kruskal-Wallis mostrou diferenças significativas no tempo gasto nessas áreas da pista ($H_{[2]} = 192,271$, $P = <0,001$). As comparações *post-hoc* mostraram que o tempo de permanência no braço aberto foi reduzido quando comparado com o tempo gasto pelos animais nas outras três áreas da pista. Além disso, quando comparado com o tempo na extremidade do túnel (T1-T2), o tempo gasto na área de transição túnel-fechado (T5) e no braço fechado foi menor.

A Tabela 2 resume os resultados da segunda análise fatorial. Além dos tempos nas quatro áreas identificadas na primeira análise fatorial, a segunda análise incluiu o número de entradas no braço fechado e no braço aberto, latência de entrada no braço aberto, distância total percorrida e a frequência de levantamentos. Após a rotação ortogonal Varimax emergiram 3 fatores representando o 79,31% da variância. O primeiro fator era relacionado às medidas de exploração do braço fechado, à distância percorrida e ao tempo gasto na extremidade do túnel. As medidas de exploração do braço aberto correlacionaram com o segundo fator, enquanto o tempo na seção de transição túnel/braço fechado, a frequência de levantamentos e o tempo na extremidade do túnel representaram o fator 3.

Tratamento farmacológico. A Figura 4 mostra o efeito de drogas gabaérgicas e monoaminérgicas sobre as medidas comportamentais relacionadas ao primeiro fator. A parte superior ilustra o tempo gasto na extremidade do túnel, a parte central mostra a exploração do braço fechado e a parte inferior ilustra a distância total percorrida na pista. A ANOVA mostrou

Tabela 2. Análise de componentes principais com rotação ortogonal Varimax do tempo gasto nas quatro áreas principais do aparato e dos comportamentos registrados.

Parâmetros	Fatores		
	1	2	3
<i>Túnel</i>			
Tempo na extremidade T1 e T2 (s)	-0,619		0,659
Tempo na área de transição T5 (s)			-0,898
<i>Braço fechado</i>			
Tempo gasto F1 a F5 (s)	0,904		
Número de entradas	0,893		
<i>Braço aberto</i>			
Tempo gasto A1 a A5 (s)		0,885	
Número de entradas		0,945	
Latência de entrada (s)		-0,938	
<i>Outros comportamentos</i>			
Distância total percorrida (m)	0,851		
Frequência de levantamentos			0,479
% variância total explicada	45,20	19,94	14,16

diferenças devido ao tratamento com PTZ no número de entradas no braço fechado ($F_{[2,29]} = 5.725$, $P = 0,008$) e na distância total percorrida ($F_{[2,29]} = 7.293$, $P = 0,003$). As comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com a dose de 20 mg/kg de PTZ reduziram o número de entradas e percorreram menores distâncias quando comparados com os animais tratados com 0 e 10 mg/kg dessa droga. Não foram observadas diferenças devido ao tratamento com PTZ no tempo gasto no braço fechado ($H_{[2]} = 5.127$, $P = 0.077$) nem no tempo gasto na extremidade do túnel ($F_{[2,29]} = 1.268$, $P = 0,298$). A ANOVA também mostrou diferenças devido ao tratamento com CDP no tempo gasto ($F_{[2,29]} = 4.420$, $P = 0,022$) e no número de entradas no braço fechado ($H_{[2]} = 7,329$, $P = 0,026$), bem como na distância total percorrida ($H_{[2]} = 7,301$, $P = 0,026$). As comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com a dose de 5 e 10 mg/kg de CDP entraram mais frequentemente no braço fechado e nele percorreram maiores distâncias, quando comparados com os animais do grupo controle. Ainda em comparação com os animais do grupo controle, os animais tratados com a dose de 10 mg/kg dessa droga passaram mais tempo no braço fechado. Finalmente, a ANOVA mostrou diferenças devido ao tratamento com APO nas quatro medidas do primeiro fator: tempo na extremidade do túnel ($F_{[2,29]} = 5,115$, $P = 0,013$), tempo gasto ($F_{[2,29]} = 9,854$, $P = <0,001$) e número de entradas

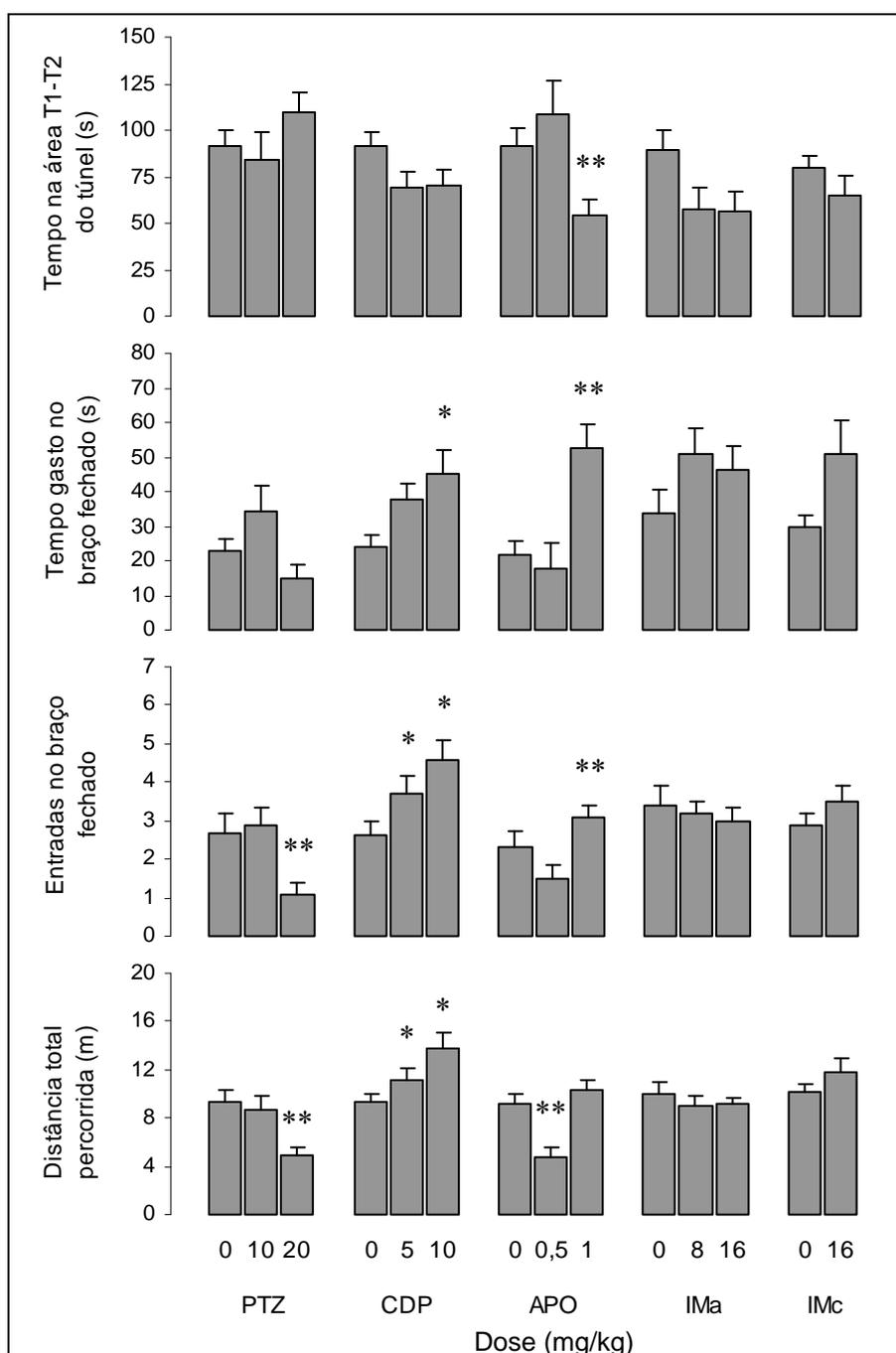


Figura 4. Efeito de drogas gabaérgicas e monoaminérgicas sobre as medidas relacionadas ao primeiro fator.

*, Diferente de 0 mg/ml; **, Diferente de todos os grupos (Student-Newman-Keuls).

no braço fechado ($H_{[2]} = 7,329$, $P = 0,026$) e distância total percorrida ($F_{[2,29]} = 11,800$, $P < 0,001$). As comparações *post-hoc* indicaram que, comparados com os animais dos grupos tratados com a dose de 0 e 0,5 mg/kg, os ratos tratados com a dose de 1 mg/kg de APO permaneceram menos tempo na extremidade do túnel e mais tempo no braço fechado, além de aumentarem a frequência de entradas nesse compartimento. As comparações *post-hoc* indicaram também que, comparados com os animais dos grupos tratados com a dose de 0 e

1 mg/kg, os ratos tratados com a dose de 0,5 mg/kg de APO percorreram menores distâncias na pista. Não foram observadas diferenças devido ao tratamento com imipramina em nenhuma das medidas relacionadas ao primeiro fator.

A Figura 5 mostra o efeito de drogas gabaérgicas e monoaminérgicas sobre os comportamentos relacionados ao segundo fator: a exploração do braço aberto. A parte superior ilustra o tempo gasto, a parte central mostra o número de entradas e a parte inferior ilustra a

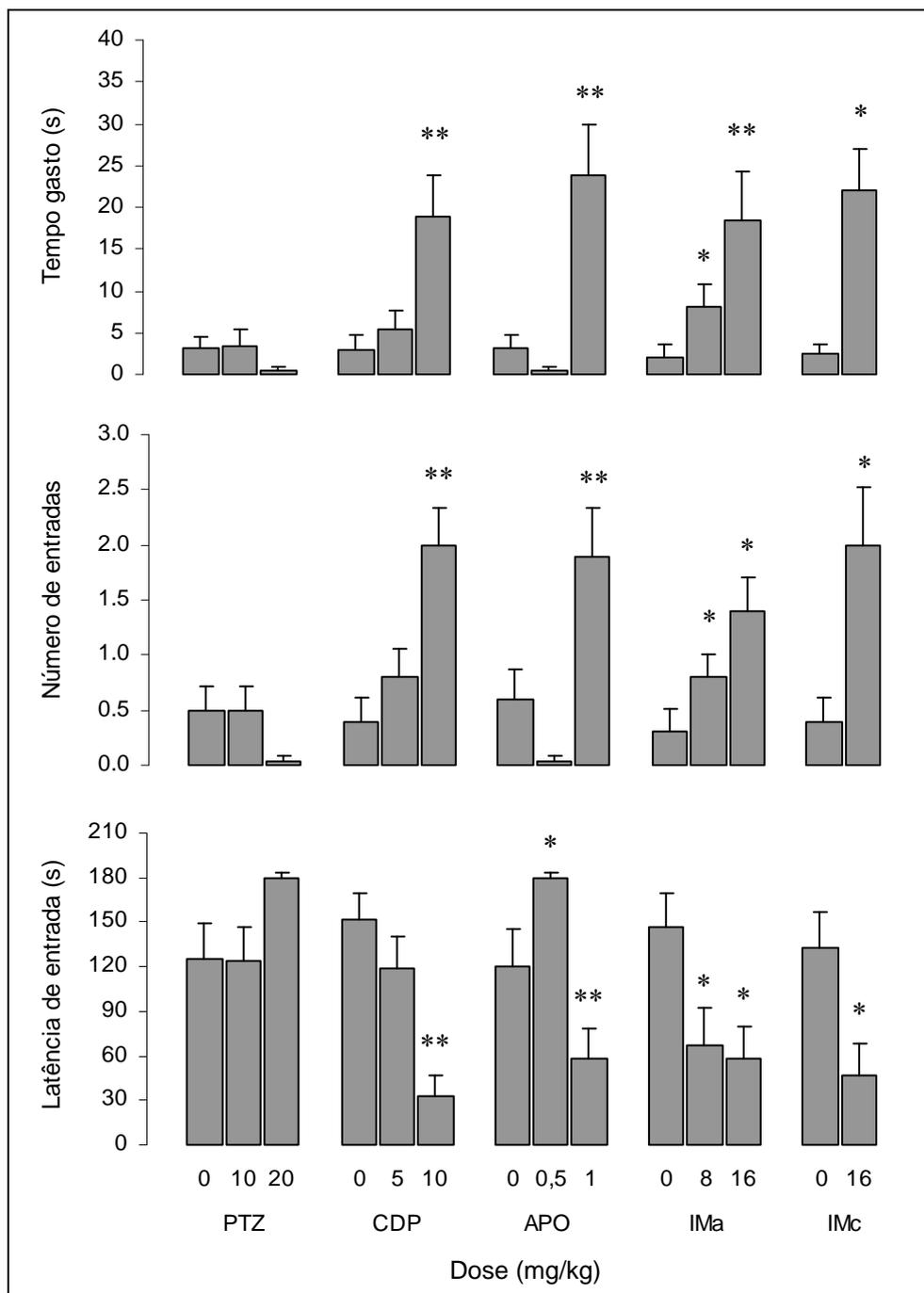


Figura 5. Efeito de drogas gabaérgicas e monoaminérgicas sobre as medidas relacionadas ao segundo fator: exploração do braço aberto.

*, Diferente de 0 mg/ml; **, Diferente de todos os grupos (Student-Newman-Keuls).

latência da primeira entrada nesse braço. O teste de Kruskal-Wallis mostrou diferenças devidas ao tratamento com CDP no tempo gasto ($H_{[2]} = 12,099$, $P = 0,002$), número de entradas ($H_{[2]} = 12,028$, $P = 0,002$) e na latência de entrada no braço aberto ($H_{[2]} = 16,031$, $P < 0,001$). As comparações *post-hoc* indicaram que, comparados com os animais dos grupos tratados com 0 e 5 mg/kg, os ratos tratados com 10 mg/kg de CDP entraram mais vezes e permaneceram mais tempo no braço aberto, além de levarem menos tempo para efetuar a primeira entrada nessa área. O teste de Kruskal-Wallis também mostrou diferenças devidas ao tratamento com APO nas três medidas do segundo fator: tempo gasto ($H_{[2]} = 17,105$, $P < 0,001$), número de entradas ($H_{[2]} = 13,727$, $P = 0,001$) e latência de entrada no braço aberto ($H_{[2]} = 11,843$, $P = 0,003$). As comparações *post-hoc* indicaram que, comparados com os animais dos grupos tratados com 0 e 0,5 mg/kg, os ratos tratados com 1 mg/kg de APO entraram mais vezes e permaneceram mais tempo no braço aberto, além de gastarem menos tempo para entrar pela primeira vez nesse local. As comparações *post-hoc* indicaram também que, comparados com os animais dos grupos tratados com 0 e 1 mg/kg, os ratos tratados com 0,5 mg/kg de APO não realizaram nenhuma entrada no braço aberto, estabelecendo assim uma latência de entrada nessa área igual ao tempo da sessão. A ANOVA mostrou diferenças devido ao tratamento agudo com imipramina no tempo gasto ($H_{[2]} = 9,480$, $P = 0,009$), número de entradas ($H_{[2]} = 8,083$, $P = 0,018$) e latência de entrada ($F_{[2,29]} = 4,473$, $P = 0,021$). As comparações *post-hoc* indicaram que, comparados com os animais do grupo controle, os ratos tratados com 8 e 16 mg/kg de imipramina permaneceram mais tempo e entraram mais vezes no braço aberto, além de gastarem menos tempo para efetuar a primeira entrada nesse local. Ainda, os animais tratados com 16 mg/kg de imipramina permaneceram mais tempo no braço aberto quando comparados com os animais tratados com 8 mg/kg dessa droga. Finalmente, o teste de Mann-Whitney mostrou diferenças devidas ao tratamento crônico com imipramina na exploração do braço aberto. Comparados com os animais do grupo controle, os ratos tratados de forma crônica com 16 mg/kg de imipramina permaneceram mais tempo ($U = 85,000$, $P = 0,006$), entraram mais vezes ($U = 81,500$, $P = 0,013$) e levaram menos tempo para efetuar a primeira entrada nesse local ($t_{[18]} = 2,605$, $P = 0,018$). Não foram observadas diferenças devido ao tratamento com PTZ nas medidas relacionadas ao segundo fator.

A Figura 6 mostra o efeito de drogas gabaérgicas e monoaminérgicas sobre as medidas comportamentais relacionadas ao terceiro fator. A ANOVA mostrou diferenças devidas ao tratamento com PTZ na frequência de levantadas ($H_{[2]} = 16,099$, $P < 0,001$) e as comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com 20 mg/kg reduziram a frequência de levantadas quando comparados com os animais dos grupos tratados com 0 e 10 mg/kg

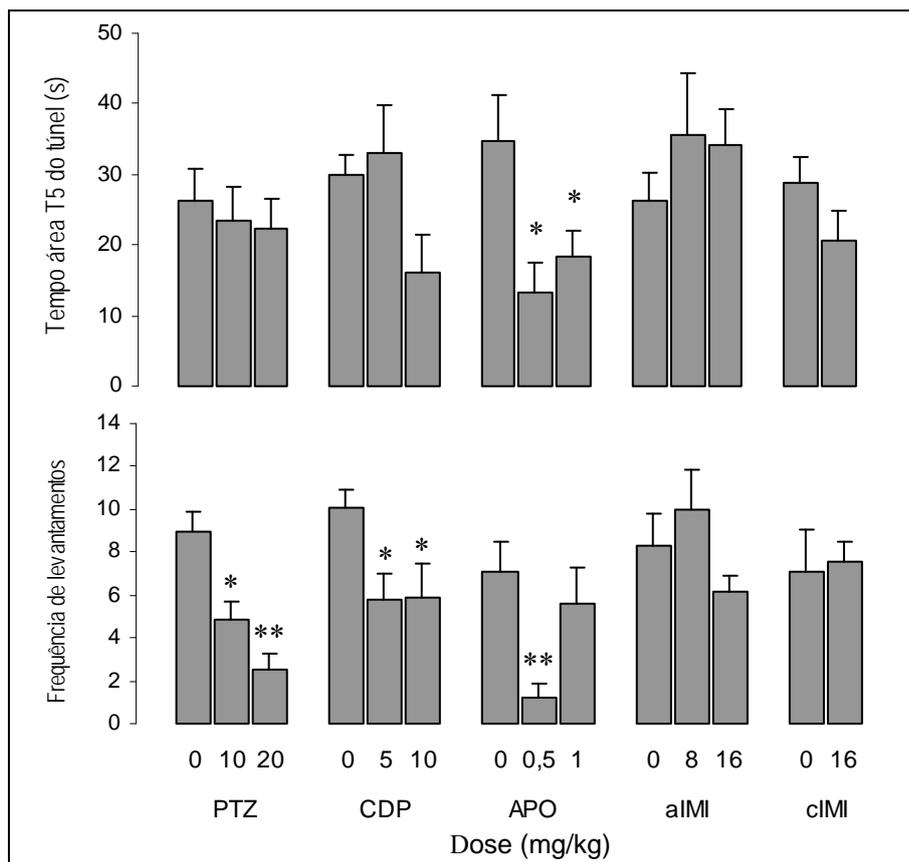


Figura 6. Efeito de drogas gabaérgicas e monoaminérgicas sobre as medidas relacionadas ao terceiro fator.

*, diferente de 0 mg/ml; **, Diferente de todos os grupos (Student-Newman-Keuls)

dessa droga. Os animais tratado com 10 mg/kg também reduziram a frequência desse comportamento quando comparados com os animais do grupo controle. A ANOVA também mostrou diferenças devidas ao tratamento com CDP na frequência de levantadas ($F_{[2,29]} = 3,878$, $P = 0,033$) e as comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com 5 e 10 mg/kg reduziram o número de levantadas quando comparados com os animais do grupo controle. Não foram observadas diferenças no tempo gasto na área de transição túnel-braço fechado devido ao tratamento com PTZ ($F_{[2,29]} = 0,212$, $P = 0,81$) nem com CDP ($F_{[2,29]} = 2,730$, $P = 0,083$). Finalmente, a ANOVA mostrou diferenças devidas ao tratamento com APO no tempo gasto na área de transição túnel/braço fechado ($F_{[2,29]} = 5,308$, $P = 0,011$) e na frequência de levantadas ($H_{[2]} = 12,185$, $P = 0,002$). As comparações *post-hoc* indicaram que os animais tratados com 0,5 e 1 mg/kg reduziram o tempo gasto nessa área de transição quando comparados com os animais do grupo controle, e que os animais tratados com 0,5 mg/kg reduziram a frequência de levantadas quando comparados com os ratos tratados com 0 e 1 mg/kg dessa droga. Não foram observadas diferenças devidas ao tratamento com imipramina em nenhuma das medidas relacionadas ao terceiro fator.

Discussão

Os resultados sugerem que o Gradiente de Aversão Elevado é um modelo útil para o estudo experimental do comportamento impulsivo em animais expostos a um ambiente novo. O estudo piloto permitiu constatar que a maior parte da atividade exploratória dos animais expostos a esse teste ocorre nos primeiros três minutos da sessão. Após esse período, os animais não exibem entradas no braço aberto e reduzem a exploração do braço fechado, confirmando assim a utilidade do teste para se obter índices de impulsividade em sessões de curto tempo.

Os dados da primeira análise fatorial mostraram quatro áreas importantes, das quinze secções em que foi dividida a pista. O primeiro fator integrou as cinco secções do braço fechado e o segundo fator agrupou as cinco secções do braço aberto. Esses resultados sugerem que o tempo de permanência em cada um desses braços podem constituir dimensões comportamentais diferentes. Ao contrário do observado nas áreas iluminadas do aparato, o tempo gasto dentro do túnel mostrou uma distribuição em três fatores, e o tempo na área de transição entre o túnel e o braço fechado (T5), deu origem a um único fator. Considerando que a extremidade fechada do túnel (T1) é a única secção da pista protegida por cinco paredes, sugere-se que esse lugar, junto a secção seguinte (T2), representem uma área de relativa segurança para os animais. Além disso, o tempo gasto em T1 e T2 correlacionou-se de forma negativa com o tempo de permanência em áreas afastadas dessa extremidade fechada do túnel. De forma geral, as medidas de exploração do túnel foram analisadas como o tempo de permanência na área de segurança (T1 e T2) e na área de transição (T5). Os resultados mostraram que os animais permaneceram a maior parte do tempo da sessão na área de segurança e que o tempo de permanência no braço aberto foi quase nulo.

Uma vez determinadas as principais áreas onde os animais permanecem durante a sessão, uma segunda análise fatorial foi realizada para tentar observar a relação de outros comportamentos exploratórios com o tempo gasto nesses locais. Dos três fatores que emergiram, o primeiro integrou medidas de exploração do braço fechado, de locomoção e de permanência na área de segurança. Semelhante ao primeiro, o terceiro fator relacionou a medida de permanência na área de segurança (T1 e T2) com o tempo na área de transição (T5) e com o número de levantadas. Diferente dos anteriores, o segundo fator mostrou ser uma dimensão característica da exploração do braço aberto. As correlações, tanto positivas quanto negativas dos comportamento com seu fator, forneceram uma aproximação sobre as possíveis dimensões que o teste poderia avaliar. O tempo de permanência na área de segurança correlacionou de forma negativa, enquanto a exploração do braço fechado e a distância percorrida correlacionaram de forma positiva com o primeiro fator. Em outras palavras, nesse

fator indica-se que os animais que realizaram uma exploração maior do braço fechado, ao mesmo tempo aumentaram a locomoção e gastaram menos tempo na extremidade do túnel. Considerando essas condições, é provável que o primeiro fator corresponda a uma medida relacionada à ansiedade, mas que depende do comportamento motor. De forma semelhante, no terceiro fator indica-se que os animais que permaneceram mais tempo na secção de transição (T5), por sua vez, gastaram menos tempo na área de segurança e realizaram menos levantadas. A partir dessas características, é provável que o terceiro fator corresponda a uma medida de avaliação de risco: uma medida relacionada a ansiedade, mas que não depende dos deslocamentos nem da exploração fora do túnel. Diferente dos fatores anteriores, o segundo fator não se correlacionou com medidas de exploração do túnel, do braço fechado nem locomoção. O tempo gasto e o número de entradas no braço aberto correlacionaram de forma positiva, enquanto que a latência de entrada nessa área correlacionou de forma negativa com o segundo fator. Em outras palavras, nesse fator indica-se uma rápida tomada de decisão no momento de avançar para o braço aberto, acompanhado do aumento da exposição ao risco. As condições anteriores permitem inferir que o segundo fator pode ser uma dimensão relacionada ao comportamento impulsivo.

No conjunto, os três fatores parecem mostrar repertórios de comportamentos relacionados ao grau de aversão encontrados no aparato. De forma gradualmente aversiva, o primeiro repertório consistiria nos comportamentos observados no terceiro fator: os animais conseguem sair da área de segurança, no entanto, permanecem na secção de transição durante um tempo antes de sair ao braço fechado. O segundo repertório consistiria nos comportamentos relacionados ao primeiro fator: os animais aumentam locomoção, exploram o braço fechado sem aumentar a exploração do braço aberto. Finalmente, um repertório impulsivo estaria representado nos comportamentos do segundo fator: os animais entram no braço fechado sem realizar uma avaliação prévia e alcançam rapidamente o braço aberto permanecendo algum tempo nele. O aumento no número de entradas nesse braço permite constatar que, embora adquirindo informação das características aversivas desse local, os animais expõem-se novamente ao risco.

Uma vez analisadas as possíveis dimensões comportamentais do Gradiente de Aversão Elevado, foram estudados os efeitos de drogas gabaérgicas e monoaminérgicas sobre as medidas comportamentais relacionadas aos três fatores. As drogas gabaérgicas mostraram efeitos sobre as medidas relacionadas ao primeiro e ao terceiro fator, enquanto as drogas monoaminérgicas tiveram efeitos claros sobre as medidas relacionadas ao segundo fator. O tratamento com drogas gabaérgicas pareceu comprometer a locomoção dos animais.

Comparados com os animais do grupo controle, os ratos tratados com PTZ diminuíram o número de cruzamentos, de levantadas e a exploração fora do túnel. Os ratos tratados com CDP aumentaram o número de cruzamentos, a exploração do braço fechado e diminuíram o número de levantadas. Apenas o tratamento com a dose alta de CDP teve efeito sobre as medidas de exploração do braço aberto. O tratamento com drogas monoaminérgicas aumentou a exploração do braço aberto sem produzir alterações claras no comportamento motor. Comparados com os animais do grupo controle, os ratos tratados com apomorfina aumentaram a exploração tanto do braço fechado quanto do braço aberto e permaneceram menos tempo na área de segurança e na secção de transição (T5). O tratamento com imipramina teve um efeito seletivo para a exploração do braço aberto. Diferente da apomorfina, não foram observadas diferenças devidas ao tratamento com imipramina na exploração do braço fechado. De forma geral, os animais tratados com drogas monoaminérgicas parecem realizar uma rápida tomada de decisão no momento de avançar para o braço aberto, reduzindo assim a latência de entrada nessa área.

Os dados farmacológicos sugerem maiores evidências sobre a possibilidade de que os fatores 1 e 3 estejam relacionados a comportamentos de ansiedade, e que as medidas de exploração do braço aberto estejam associadas a índices de impulsividade. Em animais expostos ao labirinto em cruz elevado, um teste amplamente utilizado nos estudos de ansiedade, a benzodiazepina clordiazepóxido é conhecida por produzir um efeito ansiolítico (Carobrez e Bertoglio, 2005), enquanto o pentilenotetrazol, um antagonista de receptores GABA, produz um efeito ansiogênico (Cruz et al., 1994). No mesmo modelo, o agonista dopaminérgico apomorfina produz um aumento da exploração dos braços abertos (García et al., 2005), enquanto o tratamento agudo e subcrônico com o antidepressivo tricíclico imipramina, um inibidor da recaptação de noradrenalina e serotonina, não tem mostrado efeitos ansiolíticos (Cole e Rodgers, 1995). Como observado nos estudos que utilizam o labirinto em cruz elevado, no Gradiente de Aversão Elevado não foram observadas diferenças devido ao tratamento com imipramina, administrada de forma aguda ou crônica, em nenhuma das medidas relacionadas aos fatores de ansiedade. No entanto, os efeitos desse antidepressivo foram evidentes sobre as medidas relacionadas a impulsividade. Os resultados observados no Gradiente de Aversão Elevado foram coerentes com outros estudos que, utilizando modelos de comportamento operante, demonstraram o efeito de drogas monoaminérgicas sobre o comportamento impulsivo (Eveden, 1998; 1999b; Eveden e Ko, 2005; Davids et al., 2003).

Em conclusão, os dados sugerem que os comportamentos relacionados à exploração do braço aberto do Gradiente de Aversão Elevado podem ser utilizados como medidas de

impulsividade. O aumento da exploração dessa área foi sensível a drogas monoaminérgicas sem observar-se alteração da locomoção. Como nesse aparato, as medidas relacionadas à ansiedade parecem depender do comportamento motor, sugere-se o uso conjunto de modelos de ansiedade.

Referências bibliográficas

- Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1193–1205.
- Castellanos, F. X., & Tannock, R. (2002). Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. *Nature Reviews. Neuroscience*, 3(8), 617–628.
- Chaouloff, F., Durand, M., & Mormède, P. (1997). Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behavioural Brain Research*, 85(1), 27–35.
- Cloninger, C. R., Svrakic, D. M., & Przybeck, T. R. (1993). A psychobiological model of temperament and character. *Archives of General Psychiatry*, 50(12), 975–990.
- Cole, J. C., & Rodgers, R. J. (1995). Ethological comparison of the effects of diazepam and acute/chronic imipramine on the behaviour of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 52(3), 473–478.
- Colorado, R. A., Shumake, J., Conejo, N. M., Gonzalez-Pardo, H., & Gonzalez-Lima, F. (2006). Effects of maternal separation, early handling, and standard facility rearing on orienting and impulsive behavior of adolescent rats. *Behavioural Processes*, 71(1), 51–58.
- Cruz, A. P., Frei, F., & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 49(1), 171–176.
- Davids, E., Zhang, K., Tarazi, F. I., & Baldessarini, R. J. (2003). Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 42(1), 1–21.
- Evenden, J. L. (1998). The pharmacology of impulsive behaviour in rats II: the effects of amphetamine, haloperidol, imipramine, chlordiazepoxide and other drugs on fixed consecutive number schedules (FCN 8 and FCN 32). *Psychopharmacology*, 138(3-4), 283–294.
- Evenden, J. L. (1999a). Varieties of impulsivity. *Psychopharmacology*, 146(4), 348–361.
- Evenden, J. L. (1999b). The pharmacology of impulsive behaviour in rats VII: the effects of serotonergic agonists and antagonists on responding under a discrimination task using unreliable visual stimuli. *Psychopharmacology*, 146(4), 422–431.
- Evenden, J., & Ko, T. (2005). The psychopharmacology of impulsive behaviour in rats VIII: effects of amphetamine, methylphenidate, and other drugs on responding maintained by a fixed consecutive number avoidance schedule. *Psychopharmacology*, 180(2), 294–305.
- Eysenck, S. B., & Eysenck, H. J. (1977). The place of impulsiveness in a dimensional system of personality description. *The British Journal of Social and Clinical Psychology*, 16(1), 57–68.
- Eysenck, S. B. G., Pearson, P. R., Easting, G., & Allsopp, J. F. (1985). Age norms for impulsiveness, venturesomeness and empathy in adults. *Personality and Individual Differences*, 6(5), 613–619.
- Franken, I. H., & Muris, P. (2006). Gray's impulsivity dimension: A distinction between Reward Sensitivity versus Rash Impulsiveness. *Personality and Individual Differences*, 40(7), 1337–1347.
- Garcia, A. M. B., Martinez, R., Brandão, M. L., & Morato, S. (2005). Effects of apomorphine on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiology & Behavior*, 85(4), 440–447.
- Groman, S. M., James, A. S., & Jentsch, J. D. (2009). Poor response inhibition: at the nexus between substance abuse and attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(5), 690–698.
- Jentsch, J. D. (2008). Impulsivity in Animal Models for Drug Abuse Disorders. *Drug Discovery Today. Disease Models*, 5(4), 247–250.
- Lister, R. G. (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 46(3), 321–340.
- Monterosso, J., & Ainslie, G. (1999). Beyond discounting: possible experimental models of impulse control. *Psychopharmacology*, 146(4), 339–347.
- Perry, J. L., & Carroll, M. E. (2008). The role of impulsive behavior in drug abuse. *Psychopharmacology*, 200(1), 1–26.
- Pothakos, K., Robinson, J. K., Gravanis, I., Marsteller, D. A., Dewey, S. L., & Tsirka, S. E. (2010). Decreased serotonin levels associated with behavioral disinhibition in tissue plasminogen activator deficient (tPA^{-/-}) mice. *Brain Research*, 1326, 135–142.

- Purper-Ouakil, D., Lepagnol-Bestel, A., Grosbellet, E., Gorwood, P., & Simonneau, M. (2010). [Neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder]. *Médecine Sciences: M/S*, 26(5), 487–496.
- Ramos, A. (2008). Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(10), 493–498.
- Ramos, A., Pereira, E., Martins, G. C., Wehrmeister, T. D., & Izidio, G. S. (2008). Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behavioural Brain Research*, 193(2), 277–288.
- Reynolds, B., Ortengren, A., Richards, J. B., & Wit, H. D. (2006). Dimensions of impulsive behavior: Personality and behavioral measures. *Personality and Individual Differences*, 40(2), 305–315.
- Rodgers, R. J. (1997). Animal models of 'anxiety': where next? *Behavioural Pharmacology*, 8(6-7), 477–496; discussion 497-504.
- Romer, D. (2010). Adolescent risk taking, impulsivity, and brain development: Implications for prevention. *Developmental Psychobiology*, 52(3), 263–276.
- Spivey, J. M., Shumake, J., Colorado, R. A., Conejo-Jimenez, N., Gonzalez-Pardo, H., & Gonzalez-Lima, F. (2009). Adolescent female rats are more resistant than males to the effects of early stress on prefrontal cortex and impulsive behavior. *Developmental Psychobiology*, 51(3), 277–288.
- Stansfield, K. H., & Kirstein, C. L. (2006). Effects of novelty on behavior in the adolescent and adult rat. *Developmental Psychobiology*, 48(1), 10–15.
- Swann, A. C., Bjork, J. M., Moeller, F. G., & Dougherty, D. M. (2002). Two models of impulsivity: relationship to personality traits and psychopathology. *Biological Psychiatry*, 51(12), 988–994.
- Tripp, G., & Wickens, J. R. (2009). Neurobiology of ADHD. *Neuropharmacology*, 57(7-8), 579–589.
- Verbruggen, F., & Logan, G. D. (2009). Models of response inhibition in the stop-signal and stop-change paradigms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(5), 647–661.
- Winstanley, C. A., Eagle, D. M., & Robbins, T. W. (2006). Behavioral models of impulsivity in relation to ADHD: translation between clinical and preclinical studies. *Clinical Psychology Review*, 26(4), 379–395.