

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

**Estudo dos efeitos da ativação imunológica materna em camundongos provocada pela
vacina A (H1N1) e o efeito neuroprotetor do resveratrol sobre os prejuízos
comportamentais relacionados à ansiedade, depressão, sociabilidade e memória na prole
em idade adulta**

Rener Mateus Francisco Duarte

Professora Dra. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini
Instituto de Ciências Biomédicas

Uberlândia – MG

Julho- 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**Estudo dos efeitos da ativação imunológica maternal em camundongos provocada
pela vacina A(H1N1) e o efeito neuroprotetor do resveratrol sobre os prejuízos
comportamentais relacionados à ansiedade, depressão, sociabilidade e memória na
prole em idade adulta**

Rener Mateus Francisco Duarte

Professora Dra. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Biotecnologia, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel
em Biotecnologia

Uberlândia – MG

Julho- 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**Estudo dos efeitos da ativação imunológica maternal em camundongos provocada
pela vacina A(H1N1) e o efeito neuroprotetor do resveratrol sobre os prejuízos
comportamentais relacionados à ansiedade, depressão, sociabilidade e memória na
prole em idade adulta**

Rener Mateus Francisco Duarte

Professora Dra. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini
Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM)

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em __/__/__

Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG
Julho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Estudo dos efeitos da ativação imunológica materna em camundongos provocada pela vacina A(H1N1) e o efeito neuroprotetor do resveratrol sobre os prejuízos comportamentais relacionados à ansiedade, depressão, sociabilidade e memória na prole em idade adulta

Rener Mateus Francisco Duarte

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 12 de julho de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Universidade Federal de Uberlândia, por ter me proporcionado tantas oportunidades e experiências dentro do âmbito universitário, fornecendo ferramentas e espaços para o desenvolvimento de tantas atividades contribuindo para o meu crescimento profissional e acadêmico.

Aos meus pais, Maria Amorim Duarte e Manoel Francisco de Deus Duarte, meu irmão João Paulo de Deus Duarte os quais me incentivaram e me apoiaram sempre, fornecendo muito amor e carinho ao longo desse tempo. A minha família, padrinhos e primos pelo alicerce durante esse processo.

À minha orientadora, Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini, pelo exemplo de pessoa e profissional que é, dedicada e atenciosa, agradeço pela paciência e por todo o ensinamento passado durante esse tempo, essenciais para minha formação acadêmica e pessoal.

À minha outra orientadora, Erika Renata Barbosa Neiro, por todo apoio, orientação, e conhecimentos compartilhados durante a minha vida na universidade, que foi de longe fundamental para minha vida.

Aos colaboradores, Frederico Rogerio Ferreira e Elias José Oliveira, sem os quais não seria possível a realização desse trabalho.

Aos amigos e companheiros do laboratório, pela disposição em ajudar quando necessário e pelo trabalho em equipe, afinal sozinhos não chegamos a lugar nenhum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmulas moleculares do resveratrol, mostrando na forma trans e cis.....	8
Figura 2. Ilustração (A) e (B) do aparato do Teste do Labirinto em Cruz Elevado utilizado nos experimentos.....	14
Figura 3- Paramêtros complementares visualizados durante o Teste de Labirinto em Cruz Elevado, como <i>stretchedattendposture</i> e <i>head dipping</i>	14
Figura 4. Representação dos principais comportamentos que podem ser observados durante o teste de Nado Forçado em camundongos.....	16
Figura 5. Ilustração do aparato e de como foi realizado o Teste de Reconhecimento de Objeto, mostrando os períodos de habituação, pré-teste e teste.....	17
Figura 6. Ilustração do aparato utilizado no Teste de Interação Social, mostrando os compartimentos A, B, e C do aparato, mostrando a diferença e a posição dos animais durante o Teste 1 e do Teste 2.....	18
Figura 7. Tempo de permanência em porcentagem dos animais dos quatro grupos experimentais no Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	20
Figura 8. Frequência do comportamento de <i>Stretched-attend posture</i> dos quatro grupos experimentais no Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	21
Figura 9. <i>Head dipping</i> protegido (Figura A) e <i>Head dipping</i> desprotegido (Figura B), dos animais dos quatro grupos experimentais durante o Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	22
Figura 10. Imobilidade em segundos dos animais dos 4 grupos experimentais no Teste do Nado Forçado.....	23
Figura 11. Tempo de exploração dos objetos novos (ON) e familiares (OF), em segundos, pelos animais dos quatro grupos experimentais no Teste de Reconhecimento de Objeto.....	24
Figura 12. Tempo de interação em porcentagem dos animais dos quatro grupos experimentais na primeira parte do Teste de Interação Social.....	25
Figura 13. Tempo de interação em porcentagem dos animais dos quatro grupos experimentais na segunda parte do Teste de Interação Social.....	26

RESUMO

Desordens psiquiátricas estão entre as doenças que mais afetam e incapacitam a população mundial, tendo em sua etiologia fatores genéticos e ambientais. Sabe-se que o período pré-natal, pelo fato do cérebro fetal estar em desenvolvimento, é criticamente determinante, tornando a gestação um período particularmente vulnerável, em que adversidades ambientais podem afetar diretamente o neurodesenvolvimento fetal. Alterações estruturais, celulares e moleculares que ocorrem no cérebro fetal podem formar a base para disfunções comportamentais e cognitivas mais tarde na vida adulta. A infecção da mãe durante a gravidez tem sido correlacionada com o aumento do risco de transtornos psiquiátricos na prole e evidências sugerem que a imunoativação materna, independentemente da própria infecção, pode ser responsável por tais alterações. Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da Ativação Imunológica Materna (AIM) pela Vacina influenza A(H1N1) sobre comportamentos relacionados a ansiedade, depressão, sociabilidade e memória na prole adulta e se o Resveratrol (RSV) é capaz de reverter os prejuízos comportamentais vistos na prole. Fêmeas prenhas de Balb C foram divididas em quatro grupos experimentais: G1 (fêmeas que receberam PBS em E16 + Tween 5% de E14 a E19); G2 (fêmeas que receberam vacina influenza A (H1N1) + Tween 5% de E14 a E19); G3 (fêmeas que receberam PBS em E16 + RSV de E14 a E19); e G4 (fêmeas que receberam vacina influenza A(H1N1) em E16 + RSV de E14 a E19). A vacina influenza A(H1N1) trivalente (15 mcg/cepa/0,5 mL) na dose de 1 µL/g e o PBS foram administrados via intramuscular, enquanto o Resveratrol (na dose de 40 mg/kg peso animal) e Tween 80 a 5% foram administrados por via subcutânea. Os filhotes machos adultos (P60) provenientes das mães tratadas tiveram seus comportamentos avaliados nos testes de Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Nado Forçado (NF), Reconhecimento de Objetos (RO) e Interação Social (IS). Os resultados evidenciaram prejuízos comportamentais na prole adulta das mães que receberam a vacina, principalmente nos comportamentos do tipo ansiosos e depressivos. No RO esses mesmos animais demonstraram alterações no aprendizado e memória, não apresentando predileção á novidade sendo percebida também alteração na sociabilidade desses animais no teste de IS. Por outro lado, o resveratrol apresentou um efeito neuroprotetor revertendo os prejuízos comportamentais apresentados na prole que sofreu AIM. E, além disso, o G3 foi o único grupo a

apresentar preferencia pela novidade social no em IS. Sendo assim, a vacina A(H1N1) administrada em E16 foi capaz de gerar prejuízos comportamentais na prole adulta e o RSV apresentou um efeito neuroprotetor revertendo tais danos como visto nos testes comportamentais.

Palavras chaves: Imunoativação Maternal, Vacina Influenza A(H1N1), ansiedade, depressão, Resveratrol, Nado Forçado, Labirinto em Cruz Elevado, Reconhecimento de objeto.

ABSTRACT

Psychiatric disorders are among the diseases that most affect and incapacitate the world population, having genetic and environmental factors in their etiology. It is known that the prenatal period, because the fetal brain is in development, is critically determinant, making pregnancy a particularly vulnerable period, in which environmental adversities can directly affect fetal neurodevelopment. Structural, cellular, and molecular changes that occur in the fetal brain may form the basis for behavioral and cognitive dysfunction later in adulthood. Infection of the mother during pregnancy has been correlated with increased risk of psychiatric disorders in the offspring and evidence suggests that maternal immunoactivation, regardless of the infection itself, maybe responsible for such changes. The objective of this study was to investigate the effects of the Maternal Immune Activation (MIA) on vaccine influenza A (H1N1) on behaviors related to anxiety, depression, sociability and memory in adult offspring and whether Resveratrol (RSV) is capable of reversing behavioral losses seen in offspring. Female Balb C were divided into four experimental groups: G1 (females receiving PBS at E16 + Tween 5% from E14 to E19); G2 (females receiving influenza A (H1N1) in E16 + Tween 5% E14 to E19); G3 (females receiving PBS in E16 + RSV from E14 to E19); and G4 (females receiving vaccine influenza A (H1N1) in E16 + RSV from E14 to E19). Trivalent influenza A (H1N1) vaccine (15 mcg / strain / 0.5 mL) at the dose of 1 μ l / g and PBS were administered intramuscularly, while Resveratrol (at a dose of 40 mg / kg body weight) and Tween 80 5% were administered subcutaneous. Adult male offspring (P60) from treated mothers had their behaviors evaluated in the Elevated Plus Maze (EPM), Swimming Forced (SF), Object Recognition (OR) and Social Interaction (SI) tests. The results showed behavioral damages in the adult offspring of the mothers who received the vaccine, mainly in the anxious and depressive type behaviors. In OR, these same animals showed alterations in learning and memory, not having a predilection for novelty, and also a change in the sociability of these animals in the SI test. On the other hand, the resveratrol presented a neuroprotective effect reversing the behavioral damages presented in the offspring that suffered AIM. And, in addition, G3 was the only group to show preference for social novelty in IS. Thus, the vaccine A (H1N1) administered in E16 was able to generate behavioral damage in adult offspring and RSV had a neuroprotective effect reversing such damage as seen in behavioral tests.

Keywords: Maternal Immunization, Vaccine influenza A (H1N1), Anxiety, Depression, Resveratrol, Forced Swim, Elevated Plus Maze, Object Recognition.

LISTA DE ABREVIATURAS

6 – OHDA - 6-hidroxidopamina
AIM – Ativação Imunológica Materna
BHE – Barreira Hematoencefálica
BP- Barreira Placentária
CRF- Hormônio liberador de corticotrofina
E16- 16º de gravidez
E14- 14º de gravidez
E19- 19º de gravidez
GD – Giro Dentado
GR- Receptor Glicorticóide
HD – Head dipping
HDp - Head dipping protegido
HDd - Head dipping desprotegido
HHA – Eixo Hipófise-Hipotálamo-Adrenal
IS – Interação Social
LCE – Labirinto em Cruz Elevado
LPS – Lipopolissacarídeo
MAPK- Proteína quinase ativada por mitógenos
NAD - Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF – Nado Forçado
NF- κ B- Factor nuclear kappa B
NO – Oxido Nítrico
OF – Objeto familiar
ON – Objeto novo
PBS- Solução tampão fosfato-salina
PolyI: C - Ácido policitidílico
P60 – 60 dias de vida pós-nascimento
RO – Reconhecimento de Objetos
RSV- Resveratrol
SAPt - Stretch-attend posture total
SNC- Sistema Nervoso Central
TNF- Fator de Necrose Tumoral

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Alterações no neurodesenvolvimento e AIM	2
1.2 Vacinação contra influenza A (H1N1) durante a gestação.....	5
1.3 Resveratrol.....	8
2. JUSTIFICATIVA.....	10
3. OBJETIVOS.....	10
3.1 Objetivo geral.	10
3.2 Objetivos Específicos.	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1 Animais experimentais	11
4.2 Delineamento Experimental	11
4.3 Testes Comportamentais.....	13
4.4 Eutanásia dos animais.....	19
4.5 Análise estatística	199
5. RESULTADOS	20
5.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	20
5.1.1 Parâmetros complementares	21
5.2 Teste do Nado Forçado.....	233
5.3 Teste de Reconhecimento de Objetos.....	244
5.4 Teste de Interação Social.....	255
5.4.1 Parte 1: Sociabilidade	255
5.4.2 Parte II: Preferencia por novidade social.....	266
6. DISCUSSÃO	277
7. CONCLUSÃO.....	355
8. REFERÊNCIAS	366

1. INTRODUÇÃO

Desde a primeira descrição da *síndrome da adaptação geral*, feita por Hans Seyle em 1936, e da introdução do termo “estresse”, que foi pego emprestado da Física e introduzido na Medicina, ficou evidente que estados mentais afetam a fisiologia de um organismo, particularmente o sistema imunológico (REICHE et al., 2004). A partir daí, diversas evidências indicaram que essa interação entre os sistemas nervoso e imunológico é recíproca, fornecendo as bases da neuroimunomodulação. Nas últimas décadas, devido às várias pesquisas realizadas, ficou evidente que o desenvolvimento e o comportamento de um organismo não são determinados apenas por fatores genéticos e pelo ambiente pós-natal, mas também pelas condições maternas vividas durante a gestação (KYLE; PICHARD, 2006).

Particularmente, as condições de vida do ambiente intrauterino desempenham um papel fundamental para o desenvolvimento do feto, sendo que alterações causadas por diversos estímulos aplicados sobre a mãe são capazes de alterar a homeostasia fisiológica do mesmo (NUNES; MADHI, 2015). Uma vez que o desenvolvimento do embrião pode ser facilmente perturbado durante a formação dos órgãos e tecidos, as experiências vivenciadas durante a vida pré-natal são capazes de desencadear profundas alterações no organismo e na saúde da prole mesmo durante a vida adulta (PAINTER ET AL., 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2017, cerca de 433 milhões de pessoas sofriam de alterações mentais ou comportamentais no mundo, sendo que as perturbações mentais já representam quatro das dez principais causas de incapacidade em todo o mundo. Esse ônus, que continua a crescer, representa um custo bastante alto em termos de sofrimento humano, e prejuízos econômicos.

Em particular, processos infecciosos ocorridos na mãe durante a gravidez têm sido correlacionados com o aumento do risco de transtornos psiquiátricos e de alterações no desenvolvimento neurológico do feto. Evidências sugerem que a ativação imunológica materna (AIM), independentemente da própria infecção, pode ser responsável pelas alterações na prole. Esse reconhecimento resultou na expansão dos desenhos de estudo das correlações epidemiológicas para a busca de uma relação causal entre a ativação do sistema imunológico materno e as possíveis consequências cognitivas para a prole (BOULANGER-BERTOULOS et al., 2018).

1.1 Alterações no neurodesenvolvimento e AIM

Tem sido descrito na literatura que a exposição a agentes infecciosos virais ou bacterianos durante o 1º ou 2º trimestre de gravidez está fortemente ligada à predisposição a transtornos afetivos e psiquiátricos na vida tardia da prole (BOKSA, 2010; JURGENS et al., 2012). Depois da pandemia de rubéola, em 1964, a incidência de dois distúrbios psiquiátricos, espectro autista e esquizofrenia, subiu de menos de 1% para cerca de 13 % e 20 % respectivamente, na população exposta ao vírus (PATTERSON, 2009).

Pesquisas têm demonstrado que a exposição à infecção pré-natal, como gripe, rubéola, sarampo, herpes e infecções bacterianas, podem aumentar o risco de a prole desenvolver diferentes alterações psiquiátricas (PLOEGER et al., 2010; JIANG et al., 2016), e também demonstraram um risco maior para o desenvolvimento de autismo (ZERBO et al., 2011), esquizofrenia (KONRATH et al., 2016) e transtorno bipolar (TORREY et al., 1996) nos bebês nascidos durante o inverno, possivelmente devido à elevada prevalência de gripe e doenças infecciosas que são mais comuns nessa estação do ano (DAVIES et al., 2003).

Sendo assim, a exposição da mãe a agentes infecciosos que induzem a uma resposta imunológica representa um importante fator de risco tanto para a saúde materna quanto para a saúde do embrião, feto e neonato (BONNEY, 2016). Um caso específico dessa relação é a ativação imunológica materna (AIM), onde as implicações da interação entre o sistema imunológico de gestantes e as infecções por diferentes agentes podem estar relacionados com alterações no neurodesenvolvimento fetal, aumentando o risco da prole desenvolver transtornos psiquiátricos, pelo fato do organismo materno gerar uma resposta imunológica que consequentemente produzirá citocinas, como IL-6, durante o período gestacional.

O sistema imunológico e o sistema nervoso se comunicam através de conexões bidirecionais. O sistema nervoso central (SNC) regula o sistema imunológico através das vias neuronais e neuroendócrinas e por sua vez o sistema imunológico sinaliza ao cérebro por meio das rotas neurais e humorais (TIZARD, 2008). Além disso, o sistema imunológico é capaz de sinalizar ao SNC através da liberação de citocinas, que são moléculas proteicas que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatorios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do SNC. Têm função autócrina agindo na

própria célula produtora, parácrina atuando em células próximas e endócrinas quando sua ação é à distância. Atuam em concentrações baixíssimas e sua síntese habitualmente ocorre após estimulação antigênica (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

Uma hipótese que vem sendo amplamente aceita é a de que a expressão alterada dos níveis de moléculas inflamatórias, como algumas citocinas, no ambiente fetal em resposta à ativação imunológica, pode perturbar o desenvolvimento do cérebro e as conexões neurais, podendo, por sua vez, ter efeitos a longo prazo sobre as funções mentais do indivíduo, expressando-se mais tardiamente na vida (KNUESEL et al. 2014; MILLE; RAISON, 2016).

Estudos epidemiológicos relataram que níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-8) no soro materno estão associados ao aumento da probabilidade de desenvolver psicose (BROWN et al., 2004), enquanto níveis mais elevados de citocinas anti-inflamatórias maternas (IL-4, IL-5 e IL-13) estão associados com a diminuição da chance de psicose (ALLSWEDE et al., 2016).

Através de evidências pré-clínicas e dados epidemiológicos, foi possível associar os níveis alterados da expressão de citocinas no compartimento fetal; devido à exposição pré-natal a agentes imunogênicos; com o surgimento das alterações comportamentais na prole, sendo que o tipo do agente, o período da imunoativação e sua intensidade são responsáveis pelo tipo de mudança neurológica e comportamental observada na prole (MEYER, 2014).

Comumente, os agentes que são usados para gerar a resposta imunológica são o lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina bacteriana; ou ácido polirribininosínico-polirribocitidílico [poly (I: C)], um RNA de cadeia dupla sintético; ambos são capazes de induzir resposta imunológica e ocasionar na liberação de citocinas (MEYER, 2014). A exposição materna e a resposta do sistema imunológico foram capazes de aumentar os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-1 β) no soro materno, líquido amniótico, placenta e cérebro fetal de camundongos (URAKUBO et al., 2001), demonstrando que as moléculas inflamatórias produzidas pelo organismo materno são capazes de alcançar o organismo em neurodesenvolvimento.

Tanto a IL-1 β como a IL-6 desempenham um papel importante na ativação da resposta imunológica materna. A exposição das células neurais fetais de ratas progenitoras a IL-1 β , foi capaz de inibir a proliferação celular e neurogênese (CRAMPTON et al., 2012).

Alterações neuroquímicas e morfológicas foram detectadas nos descendentes de mães expostas à AIM, como na desregulação dos sistemas dopaminérgico (MEYER et al., 2008a), serotoninérgico (FATEMI et al., 2008), glutamatérgico (MEYER et al., 2008b) e GABAérgico foram observadas (SAMUELSSON et al., 2006), ou seja, a ocorrência da AIM na fase gestacional provoca mudanças em sistemas importantes na vida pós natal do indivíduo. Morfologicamente, a AIM provoca lesões no córtex cerebral durante a fase neonatal (GIRARD et al., 2010), diminuição da atividade cerebelar das células Purkinje (SHI et al., 2009) e aumento da apoptose de ambos os neurônios e células da glia em várias regiões cerebrais (BOKSA, 2010).

Somado a isso, a neurogênese no giro denteado (GD) hipocampal tem se mostrado prejudicada na prole adulta induzida por AIM (MEYER et al., 2006; CUI et al., 2009), sendo que esta região desempenha um forte papel na codificação e recuperação da memória, bem como na codificação e reconhecimento de cenas ambientais, sendo muito importante nas relações sociais como um todo.

O comportamento socialmente motivado compreende as respostas fisiológicas de um indivíduo frente à interação com um ou mais membros da mesma espécie, possuindo uma circuitaria complexa sendo vistos desde organismos complexos a organismos mais simples, como insetos (SOKOLOWSKI, 2010). No ser humano, foi observado que a percepção usando processos visuais de faces evoca a atividade do giro fusiforme lateral em maior intensidade; sendo esta área muito envolvida no reconhecimento facial, corporal, de palavras e de informações de cores; comparado a percepção de um estímulo não social (HAXBY et al., 2002). Já em roedores, o sistema olfatório acessório detecta exclusivamente pistas olfatórias de caráter social. Logo, essa evidência sugere que o cérebro possui circuitos neurais específicos para o processamento de estímulos sociais. Além disso, outras evidências vêm demonstrando a importância da participação do sistema colinérgico em processos cognitivos. As projeções colinérgicas para o córtex perirrinal participam do processamento da memória para o reconhecimento de objetos em ratos (WINTERS; BUSSEY, 2005) e também da memória visual em primatas não humanos (TANG et al., 1997; TURCHI et al., 2005). No hipocampo, a acetilcolina é importante para a formação da memória espacial (KIM; LEVIN, 1996; MISHIMA et al., 2000; HUNSAKER et al., 2007) e do condicionamento contextual ao medo (ROGERS; KESNER, 2004).

Deste modo, o desafio imunogênico pré-natal provocado por vírus ou bactéria, consequentemente levando à AIM, contribui para alterações na neurogênese e mielinização fetal e está diretamente envolvida na patogênese de transtornos neurodesenvolvimentais na prole, em especial a esquizofrenia e o autismo (LIU et al., 2013), além de ansiedade e depressão (BABRI et al., 2014).

1.2 Vacinação contra influenza A (H1N1) durante a gestação

A utilização de vacinas de forma mais ampla foi introduzida à partir do início do século passado e contribuiu de forma significativa para a redução da incidência das doenças infecciosas. Normalmente são aplicadas para proteger o organismo de doenças bacterianas ou virais. A habilidade dos vírus em infectar seus hospedeiros e permanecer na natureza somente é possível devido ao sucesso de suas adaptações ao longo do tempo, criando a capacidade de produzir infecções, resistir, escapar dos mecanismos antivirais do hospedeiro, e se disseminar para outros hospedeiros susceptíveis (RIDPATH; FLORES, 2007).

O vírus influenza representa uma ameaça à saúde pública mundial devido à sua alta transmissibilidade, capacidade de causar doença grave e potencial pandêmico (DOMINGUES et al., 2012). A doença é caracterizada por uma infecção respiratória, comumente conhecida por gripe, cuja gravidade pode variar desde uma doença branda ou assintomática, até uma infecção grave do trato respiratório inferior, em que a evolução pode ser fatal (WHO, 2009a; WHO, 2009b).

Considerando-se o cenário global, sabe-se que a vacinação contra influenza é o principal meio de reduzir o seu impacto, interferindo tanto na morbidade quanto na considerável perda econômica em decorrência dos atendimentos hospitalares, absenteísmo ao trabalho, entre outros (NEUMANN; KAWAOKA, 2011).

Desde 2005 a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2005; 2014), recomenda que mulheres grávidas sejam vacinadas contra a influenza A. Porém, a utilização desta vacina durante a gravidez permanece controversa, devido às preocupações sobre o desenvolvimento do feto e os possíveis efeitos teratogênicos, uma vez que a gravidez é um critério de exclusão para a participação em ensaios clínicos com vacinas. Entretanto,

sabe-se, que as grávidas são consideradas o grupo de risco mais importante para a vacinação contra a gripe causada pelo vírus influenza.

Ambas as vacinas, pandêmica ou sazonal para gripe, são recomendadas internacionalmente para mulheres grávidas, independente das condições de risco a saúde pré-existent, no intuito de garantir a proteção da mulher grávida e do feto, recém-nascido e/ou lactente, dotando-o de anticorpos para que possa resistir a infecções durante o período de maior vulnerabilidade (SOGC, 2009). Por outro lado, segundo (BRENT, 2006) a vacinação na gravidez comporta riscos reais, teóricos e hipotéticos, como a transmissão do vírus vivo-atenuado para a placenta ou feto, reações idiossincrásicas ou imprevisíveis que é uma reação anormal a droga por inibição de uma atividade enzimática, sem mecanismo imunológico envolvido, único daquele indivíduo, e ineficácia da vacina. E em razão do risco teórico de ocorrer infecção fetal, a administração de vacinas contendo bactérias ou vírus vivo atenuado é contra indicada na gravidez (TAVARES et al, 2011).

McMillan e colaboradores (2015) afirmam que as mulheres grávidas são uma população única devido às várias alterações imunológicas e fisiológicas que acontecem durante essa fase. Em particular, as alterações imunológicas, como a ativação de citocinas pró-inflamatórias, podem ocasionar reações de reatogenicidade pela vacina contra influenza e, assim, o risco de dano ao feto torna-se uma grande preocupação.

O ambiente materno é altamente protegido, apresentando proteção para o feto por meio da barreira placentária (BP). O SNC fetal também é protegido pela barreira hematoencefálica (BHE). Juntas, as duas barreiras protegem o embrião da passagem de algumas moléculas proteicas e substâncias tóxicas vindas do sangue periférico e sangue maternal, ao mesmo tempo em que permitem a migração de nutrientes essenciais que são úteis para seu desenvolvimento durante a organogênese (MISHRA et al., 2009).

Além de controlar o que entra em contato com os tecidos nervosos fetais, a BHE possui outras funções importantes relacionadas à imunidade, incluindo a secreção de citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico. A BHE pode receber um estímulo de um compartimento, por exemplo, vindo da circulação sistêmica e, simultaneamente, responder com secreções para outros compartimentos do SNC, sendo esta função de papel central na resposta neuroimune. Por exemplo, LPS aplicado na face abluminal do endotélio estimula a secreção de IL-6 a partir de sua superfície luminal (BANKS; ERICKSON, 2010).

Infecção, estresse psicossocial e o alto índice de massa corporal são condições que são comumente associadas a estados inflamatórios, que durante a gestação têm sido relacionados a taxas aumentadas de prejudicar o neurodesenvolvimento, levando a transtornos mentais (KNUESEL et al., 2014). Além da resposta inflamatória que pode ocorrer no ambiente materno, alterações nos níveis de citocinas ou outros mediadores na placenta, também são possíveis indutores de infecção pré-natal.

Estas alterações na placenta podem resultar em consequências prejudiciais no desenvolvimento do encéfalo fetal, pois podem comprometer a sua função de proteção, diminuindo a sua seletividade a substâncias potencialmente prejudiciais ao feto, já que o aumento dos níveis de citocinas inflamatórias tais como $\text{TNF-}\alpha$, tem sido implicado na disfunção do trofoblasto e apoptose da placenta (DEL ZOPPO et al., 2000), contribuindo para o dano ao feto (YAMADA et al., 2000; DINARELLO, 2005). Levando em consideração a capacidade das citocinas em gerar prejuízos nos processos de desenvolvimento do SNC, a presença de moléculas inflamatórias no encéfalo fetal pode comprometer a sobrevivência de subpopulações neuronais (MARTNER et al., 2008).

Acredita-se que a indução da resposta materna para produção de citocinas e a cascata celular de eventos moleculares subsequentes são responsáveis pelo desenvolvimento alterado do encéfalo (JAUNEIKAITE et al., 2012), associado a disfunções na BP podem permitir a transmissão, via útero, de infecções ao feto. Por exemplo, a transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV) da mãe para a criança é relatada na taxa de 25 a 35% (KWIEK et al., 2006).

Baseado nisso, modelos animais de AIM tem sido utilizado a fim de demonstrar a relação entre a infecção maternal e transtornos psiquiátricos. Prejuízos relacionados a estes transtornos são observados na prole adulta de modelos animais, incluindo alterações comportamentais, anormalidades em regiões encefálicas e o desequilíbrio em sistemas de neurotransmissores (BOULANGER-BERTOLUS et al, 2018).

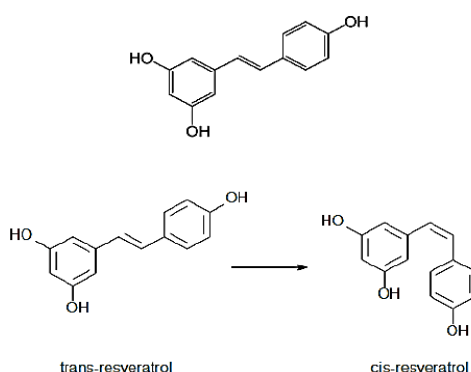
1.3 Resveratrol

O uso dos produtos naturais iniciou-se há milhares de anos por populações de diferentes países, com o intuito de tratar diversas patologias. Nos dias atuais as plantas medicinais têm um importante papel na saúde mundial e estima-se que cerca de 25% a 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR; MELLO, 2008).

Os medicamentos à base de plantas podem ser uma fonte alternativa e valiosa para potenciais alvos de tratamento dos transtornos psiquiátricos. Um composto que vem chamando a atenção pelas suas inúmeras propriedades é o Resveratrol. O resveratrol (3, 4, 5-trihidroxi-trans-estilbeno) é uma fitoalexina de natureza polifenólica (FRÉMONT, 2000), presente em pelo menos 72 espécies de plantas, com amplos efeitos sobre diversos processos biológicos nas células (MARKUS; MORRIS, 2008).

Quimicamente, trata-se de um composto polifenólico derivado da fenilalanina, contendo dois anéis aromáticos com hidroxilas reativas em sua estrutura e que pode se apresentar sob duas formas isoméricas: *cis* e *trans*-resveratrol (Fig.1) O processo de isomerização ocorre pela ação da luz e o isômero *trans* é o principal responsável pelos efeitos biológicos do resveratrol em mamíferos (SOLEAS et al., 1997).

Figura 1 - Fórmulas moleculares do resveratrol



Fonte: Soleas et al., 1997

Estudos *in vivo* mostram que o resveratrol pode exercer neuroproteção contra isquemia (SINGH et al., 2015), doenças neurodegenerativas (SINGH et al., 2013; MARKUS; MORRIS, 2008) e possui efeitos benéficos em modelos experimentais de Doença de Parkinson (CHAO et al., 2008). Além disso, estudos também demonstraram que o resveratrol na dose de 40 mg/kg possui efeito neuroprotetor em ratos Sprague-Dawley que foram lesionados unilateralmente pela 6-OHDA (JIN et al., 2008).

Em estudos *in vitro* o resveratrol apresenta a capacidade de exercer efeito neuroprotetor sobre os neurônios dopaminérgicos (BLANCHET et al., 2008; LU et al., 2008). Uma das mais conhecidas propriedades do resveratrol é a capacidade antioxidante, atenuando a acumulação de espécies reativas de oxigênio. Dados da literatura mostram que resveratrol é capaz de impedir aumento das espécies reativas de oxigênio e a morte por apoptose causada pelo estresse oxidativo (JANG; SURH, 2001; DE SALVIA et al., 2002; LOSA, 2003; OVESNA et al., 2006).

Além de sua ação antioxidante, estudos têm demonstrado um papel anti-inflamatório do resveratrol, reduzindo as inflamações agudas e crônicas, evitando todas as características do processo inflamatório (CHEN et al., 2005). Os principais alvos do resveratrol que estão envolvidos no seu processo de proteção são: o óxido nítrico (NO) (HATTORI et al., 2002; IMAMURA et al., 2002; HUNG et al., 2004), receptores de adenosina (DAS et al., 2005a, b), além de diferentes vias de sinalização celular, como a da PI3-K (DAS et al., 2006a, b) e MAPK (DAS et al., 2006a, b).

O resveratrol é produzido normalmente nas cascas das uvas maduras em resposta à infecções fúngicas ocorridas na planta, encontrando-se praticamente ausente em plantas não estimuladas, sendo que sua função biológica na planta está relacionada com a proteção a agentes lesivos a planta e a estresses ambientais (SOLEAS et al., 1997). Já foi demonstrado também que o resveratrol é capaz de inibir a ativação microglial e a liberação de citocromo c em ratos isquemiados (CSISZAR, 2011), além de prevenir déficits de memória, prevenindo o aumento da atividade da acetilcolinesterase em ratos diabéticos (SCHMATZ et al., 2009), demonstrando que este composto pode modular a neurotransmissão colinérgica e, conseqüentemente, melhorar a cognição.

Em lesões do sistema nervoso, o tratamento com RSV seria capaz de induzir a expressão do NAD e de sirtuínas, os quais seriam responsáveis pela ativação de genes relacionados à proteção neuronal (ARAKI et al., 2004; BEDALOV; SIMON, 2005; RAVAL et al., 2008). Tais efeitos podem atuar juntamente com sua ação antioxidante na

redução de danos cerebrais durante vários tipos de injúrias ocorridas durante a gestação, fornecendo substrato para o seu uso futuro em várias doenças neurodegenerativas.

2. JUSTIFICATIVA.

Uma vez que vários estudos mostram a relação entre o estresse imunológico no período pré-natal e o maior risco de desenvolvimento de doenças psiquiátricas na prole, faz-se necessário verificar o impacto que a ativação imunológica materna provocada pela vacina A (H1N1) tem no comportamento da prole adulta, bem como um possível efeito neuroprotetor do flavonoide resveratrol, sobre tais alterações.

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo geral.

Investigar a hipótese de que o estresse pré-natal por agentes imunogênicos causa danos ao encéfalo fetal, aumentando a predisposição ao surgimento de doenças psiquiátricas na prole, e que o resveratrol contribui para proteger o cérebro desses eventuais danos.

3.2 Objetivos Específicos.

-Investigar se a indução de resposta imunogênica causada pela vacina influenza A (H1N1), em camundongos fêmeas em idade gestacional E16, provoca alterações comportamentais na prole em idade adulta, em relação à ansiedade, depressão, memória e sociabilidade.

-Investigar, através da realização de testes comportamentais, se o resveratrol administrado durante a gestação protege a prole contra os prejuízos comportamentais induzidos pelo estresse imunogênico materno.

4. MATERIAL E MÉTODOS.

4.1 Animais experimentais

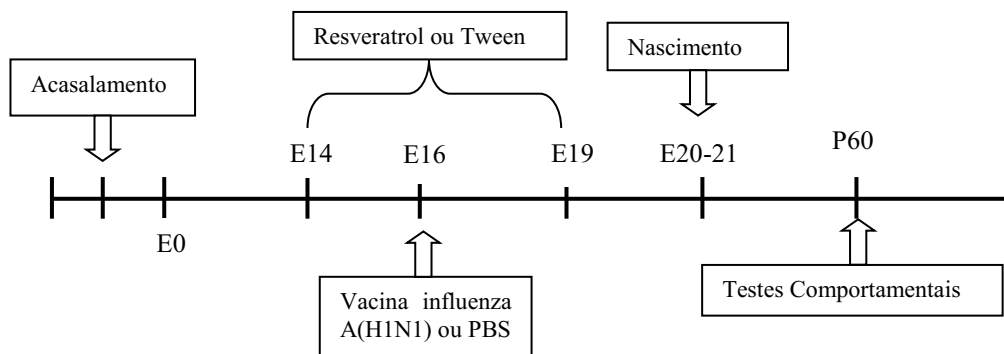
Para o experimento foram disponibilizados pela Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia, camundongos da linhagem Balb C, em um total de 24 fêmeas e 12 machos. Eles foram colocados em gaiolas, na proporção de duas fêmeas para um macho, durante o período de acasalamento. As fêmeas foram avaliadas diariamente para observação da rolha vaginal (tampão vaginal resultante da mistura de secreção vaginal com sêmen), sendo que o dia de sua observação foi considerado o dia zero de gestação (E0).

4.2 Delineamento Experimental

Os animais foram colocados para acasalar visando à obtenção de cerca de 10 filhotes por grupo (n=10), sendo utilizados para os testes comportamentais apenas os machos, uma vez que as fêmeas podem exibir mudanças comportamentais relacionadas ao ciclo estral. Para atingir esse número, estimou-se a necessidade de utilização de 6 fêmeas grávidas por experimento, uma vez que cada fêmea gera em média 4 a 6 filhotes, entre machos e fêmeas.

As fêmeas gestantes foram divididas em 4 grupos experimentais (descritos abaixo) e submetidas aos tratamentos. As injeções de Resveratrol e Tween foram feitas via subcutânea, uma dose por dia ao longo de seis dias consecutivos, e a Vacina influenza A (H1N1) e PBS via intramuscular, em uma dose única. O Resveratrol utilizado foi fornecido pelo laboratório Evova da Suíça, sendo na forma de trans-resveratrol, utilizado na dosagem de 40mg/kg do animal. O veículo utilizado na preparação do resveratrol foi o Tween 80 a 5%, sendo, portanto usado no grupo controle. A Vacina influenza trivalente utilizada é composta pelo vírus fragmentado e nativado, na concentração de 15 mcg/cepa/mL, e utilizado na dosagem de 1 µL/g do peso do animal.

Cronograma em linha do tempo:



Grupos experimentais:

Grupo 1 - fêmeas (n=6) que receberam veículo Tween (1 dose por dia), de E14 a E19 + 1 injeção única de PBS em E16;

Grupo 2 - fêmeas (n=6) que receberam Tween (1 dose por dia), de E14 a E19 + 1 injeção única de Vacina A(H1N1) em E16;

Grupo 3 - fêmeas (n=6) que receberam resveratrol (1 dose por dia), de E14 a E19, + 1 injeção única de PBS em E16;

Grupo 4 - fêmeas (n=6) que receberam resveratrol (1 dose por dia), de E16 a E19 + 1 injeção única de Vacina A(H1N1) em E16;

Para os testes comportamentais foram utilizados os filhotes machos adultos das matrizes de cada grupo experimental. Por isso ao longo do trabalho, quando for citado G1, G2, G3 e G4, estará automaticamente sendo feita referência à prole de cada grupo experimental.

4.3 Testes Comportamentais

Comportamento pode ser definido como o conjunto de respostas de um organismo em uma dada situação ou ainda como a resposta específica a um ou mais estímulos específicos. Muito embora seja possível fazer mensurações com base em um único teste, é sugestivo se utilizar mais de um teste realizando uma combinação de vários testes comportamentais, já que mensuram os transtornos psiquiátricos sob diferentes condições. Os dados obtidos então através de diferentes testes podem ser combinados para criar variáveis mais concisas, oferecendo uma descrição mais completa do perfil comportamental do organismo (VAN GAALEN; STECKLER, 2000). Sendo assim, após 60 dias do nascimento (P60), os animais dos quatro grupos (oriundos das mães tratadas) foram submetidos aos testes comportamentais, realizados no Laboratório de Farmacologia Comportamental no departamento de Ciências Fisiológicas (ARFIS) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os testes então foram filmados para posterior análise e compilação dos dados.

Labirinto em cruz elevada (LCE): O labirinto em cruz elevado é um dos testes comportamentais para estudo de ansiedade e alguns aspectos relacionados a desordens de pânico. Em geral, os animais apresentam uma exploração e preferência maior dos braços fechados, tanto no número de entradas quanto no tempo gasto nos mesmos. Esse modelo baseia-se na atividade exploratória espontânea e na aversão natural dos roedores a espaços abertos, sendo que os animais que apresentam um comportamento do tipo ansioso eles tendem a permanecer ainda mais tempo nos braços fechados, possuindo uma aversão aos braços aberto ainda maior. Pellow e colaboradores (1985) propôs que o aumento na exploração dos braços abertos estaria relacionado a uma diminuição nos níveis de ansiedade do animal. Além dessas medidas, outras medidas também são analisadas como o levantar-se (*rearing*), mergulhar a cabeça pela borda do braço aberto (*head dipping* desprotegido) ou pelo braço fechado (*head dipping* protegido), esticar o corpo (*Stretchedattendpostures*), e auto-limpeza (*grooming*).

A atividade exploratória do animal foi avaliada por 5 minutos em um aparato elevado 50 cm do solo e formado por dois braços abertos (30 x 5 cm), que formam uma cruz com dois braços fechados (30 x 5 x 15cm), (Fig.2). Os braços abertos ficam posicionados um de lado oposto ao outro e não possuem borda ou estrutura ao redor delimitando suas extremidades. Os animais foram observados principalmente em relação à comportamentos do tipo ansiosos, atentando-se para as distribuições de tempo entre os braços abertos onde o animal fica mais exposto e os braços fechados.

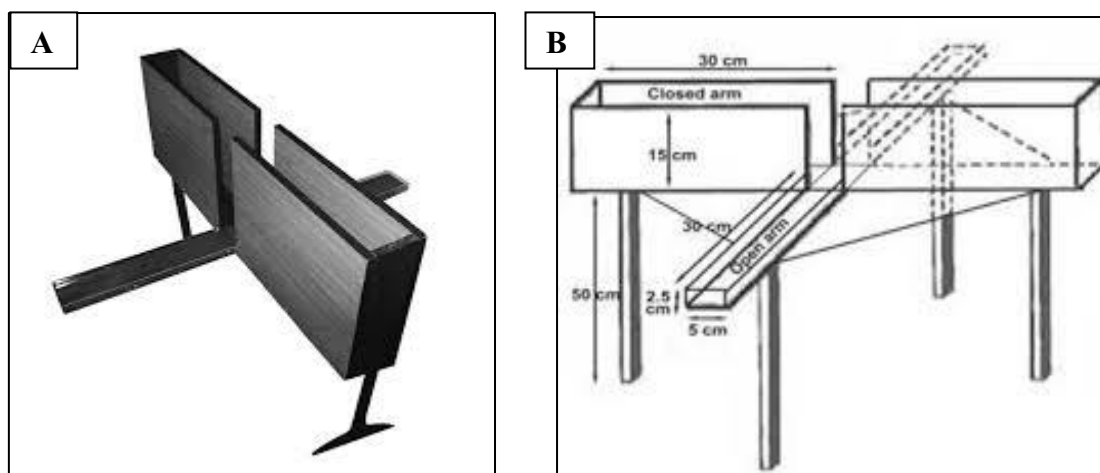
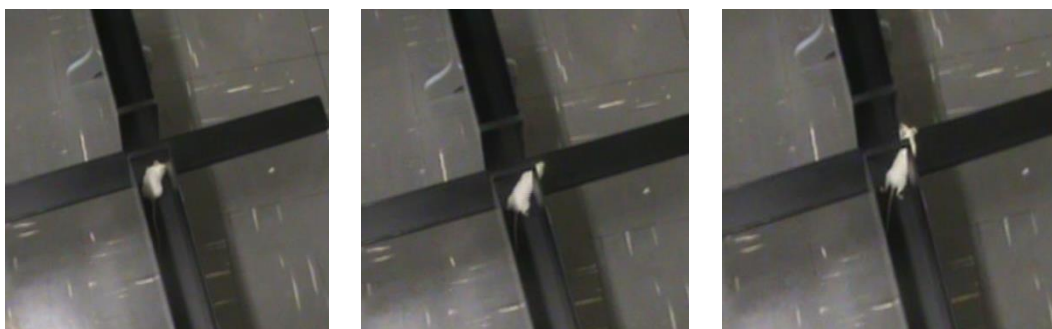


Figura 2 – Ilustração (A) e (B) do aparato do Teste do Labirinto em Cruz Elevado utilizado nos experimentos.

Figura 3- Paramêtros complementares visualizados durante o Teste de Labirinto em Cruz Elevado: (a) *Stretchedattendpostures* (b) *head dipping* desprotegido (c) (*head dipping* protegido).

a)



b)



c)



Nado forçado (NF): O teste de natação forçada (NF) foi inicialmente descrito por Porsolt et al. (1977) e é atualmente um dos modelos animais mais utilizado em laboratórios para se avaliar o potencial de fármacos com atividade antidepressiva (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005; CRYAN; PAGE; LUCKI, 2005; MEZADRI et al., 2011). Esse teste é realizado em um recipiente cilíndrico de 33 cm de diâmetro com coluna de água de 39 cm. O experimento se baseia no comportamento do roedor quando ele é exposto a uma coluna de água e se há uma tentativa do animal de tentar sair desse local, sendo que o nado e a escalada são negativos para o comportamento depressivo e a imobilidade positiva para o mesmo.

Primeiramente foi realizada a fase de pré-teste, na qual os animais de ambos os grupos foram colocados nesse recipiente com água na temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, de acordo com Joca e Guimarães, 2006, por um período de 15 minutos. No dia seguinte foi realizado o teste, no qual os animais foram colocados no recipiente com água e mantidos lá por 5 minutos. Neste teste, os animais foram filmados por câmera colocada acima do recipiente com água e o filme analisado posteriormente para quantificação dos comportamentos de nado e imobilidade que podem indicar neste modelo animal comportamentos do tipo depressivos. A imobilidade refere-se ao animal boiar sem realizar movimentos, exceto o necessário para manter a cabeça fora da água. O nado é considerado todo movimento natatório que o animal realiza em sentido horizontal. Após cada exposição dos animais ao nado, eles foram enxugados com toalha de tecido antes de serem devolvidos à suas caixas de criação (Fig.4).

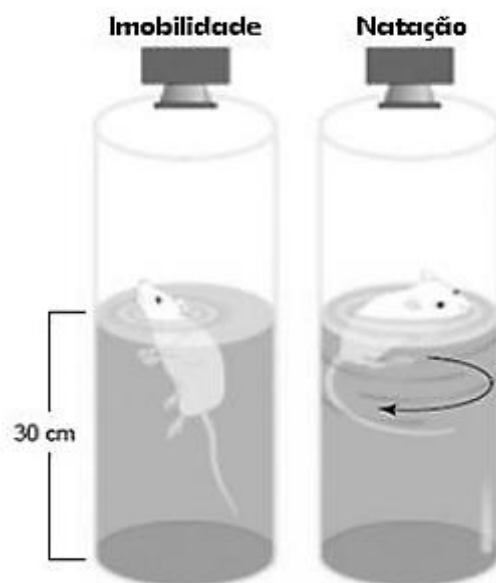


Figura 4 - Representação dos principais comportamentos que podem ser observados durante o teste de Nado Forçado em camundongos. FONTE: adaptado de CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002.

Reconhecimento de objeto (RO): Roedores têm uma tendência a interagir mais com um objeto novo do que com um familiar. Essa tendência tem sido utilizada para estudos de funções cognitivas, como memória e aprendizagem, que são diminuídas em alguns transtornos psiquiátricos. O teste de reconhecimento de objeto foi realizado em uma arena quadrangular de polipropileno branca (40x40), (Fig.5). Os animais foram manuseados por ao menos 1 minuto durante 3 dias antes do experimento, na mesma sala onde foi realizado o teste comportamental. Um dia antes do experimento, cada animal foi submetido a uma sessão de habituação na arena, na presença de 2 objetos iguais, com duração de 15 min.

No dia do experimento, os animais foram submetidos a duas avaliações. Durante a primeira (teste de aquisição, T1), os animais foram colocados na arena contendo dois objetos idênticos ao do pré-teste, por um período de 10 min. Para a segunda avaliação (teste, T2), realizada 60 min após T1, permaneceu um dos objetos sendo considerado objeto familiar e o outro objeto foi substituído por um objeto novo (ON) colocados na mesma posição de T1, e em seguida os animais foram colocados na arena novamente por um período de 10 min.

Todo o experimento foi documentado por meio de vídeo, com a câmera posicionada acima da arena quadrangular. A memória de reconhecimento foi avaliada a partir da análise do vídeo, determinando-se a diferença entre o tempo de exploração do objeto novo e objeto familiar em relação ao tempo de exploração total dos dois objetos. A exploração foi definida pelo direcionamento da face do animal ao objeto até uma distância aproximada de 2 cm enquanto observava, cheirava ou tocava o objeto.

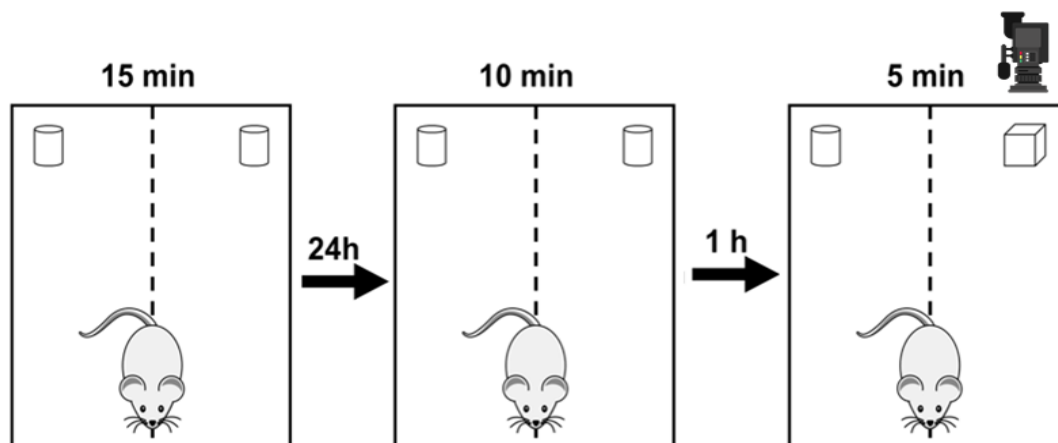


Figura 5- Ilustração do aparato do Teste de Reconhecimento de Objeto utilizado no experimento. Fonte: O autor, 2019.

Interação Social (IS): O teste de paradigma de três câmaras conhecido como “sociabilidade Crawley e preferência por novidade social” têm sido empregado com sucesso para estudar a sociabilidade e memória social em várias linhas puras e ratos mutantes (Clapcote et al., 2007). Baseia-se no princípio da livre escolha do rato ou camundongo experimental em explorar por mais tempo um dos três compartimentos do aparato (denominados CA, CB e CC), e sua interação com os animais controles ou gaiola vazia (Fig.6).

Cada animal foi submetido a uma sessão de habituação na arena, com os compartimentos abertos e gaiolas vazias, onde o animal pôde explorar livremente o aparato por 5 minutos. 24 horas após a sessão de habituação foi realizado o Teste 1 (T1), ou Teste de Sociabilidade Crawley, no qual um animal controle é colocado na gaiola de metal localizada no compartimento CA, o animal experimental posicionado no compartimento central CB e o compartimento CC permanecendo com a gaiola vazia.

Na sequência todas as divisórias foram removidas e o animal experimental pode explorar o aparato livremente por 10 min. Todo o experimento foi documentado por meio de vídeo, com a câmera posicionada acima do aparato.

A sociabilidade do animal experimental é avaliada a partir da análise do vídeo, considerando o número total de contatos, duração total de contatos diretos (em segundos) entre o animal experimental e a gaiola de metal vazia em comparação com o tempo de contato com o animal controle, duração média por contato, número total e duração (em segundos) de outros comportamentos (imobilidade, grooming, caminhada, etc) e o total de tempo gasto pelos animais experimentais em cada compartimento do aparato (considerando quando a cabeça e 4 patas estão dentro do compartimento).

Após o término de T1, o animais foram removidos do aparato e o mesmo esterilizado com álcool 70% e hipoclorito de sódio 20% afim de neutralizar odores que podem interferir no teste. A seguir teve início o Teste 2, ou Teste de Preferência por Novidade Social, no qual o animal controle utilizado no teste anterior e que estava no CA, foi utilizado como animal familiar no T2, e dessa vez posicionado em CC para evitar interações por preferência de local. Um animal controle 2, não familiar, foi posicionado em CA e em CC o animal familiar. O animal experimental foi posto em CB, sendo em seguida liberados os compartimentos para livre exploração, filmando-se por 10 min todo o teste.

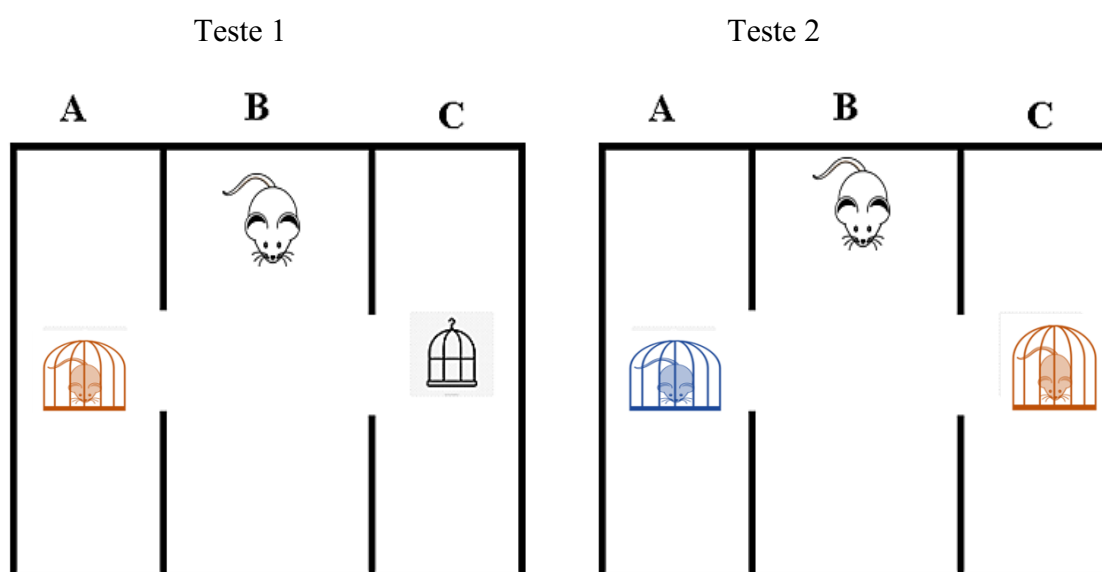


Figura 6 – Esquema do aparato utilizado no Teste de Interação Social, mostrando os compartimentos A, B, e C do aparato. No teste 1, mostrando o animal experimental no compartimento B e o animal não-familiar no compartimento A. Já no teste 2, o animal que estava no compartimento A em T1 passa a ficar no compartimento C sendo considerado o animal familiar, e um novo animal (em azul) é colocado no compartimento A. Fonte: O autor, 2019.

4.4 Eutanásia dos animais

O procedimento de eutanásia dos animais foi realizado por meio de anestesia com cetamina 80mg/Kg e xilazina 10mg/Kg, seguido de deslocamento cervical, segundo proposto pelo guia de práticas e manuseio de animais de laboratório (Washington, EUA, 2011).

As mães e filhotes fêmeas foram eutanasiadas logo após o desmame, procedimento adotado visando minimizar os danos e sofrimento desnecessário aos animais. Os filhotes machos foram eutanasiados após os testes comportamentais.

4.5 Análise estatística

Os comportamentos foram analisados e os dados obtidos submetidos à análise estatística utilizando o GraphPad Prism 5, por meio do Two-Way ANOVA, com valores de $p \leq 0,05$ considerados significativos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Quando significativo a análise foi seguida pelo teste *pos hoc* de Bonferroni.

5. RESULTADOS

5.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

A figura 7 mostra a porcentagem de tempo nos braços abertos dos animais de cada grupo experimental submetidos ao LCE. Os animais do grupo G2 apresentaram diferença significativa quanto ao tempo de exploração dos braços abertos ($107,02 \pm 12,27$, $p \leq 0,05$), quando comparados aos animais dos grupos G3 ($179,75 \pm 6,93$) e G4 ($170,7 \pm 8,46$). Não houve diferença significativa, quanto a esse parâmetro, entre o grupo G1 e demais grupos.

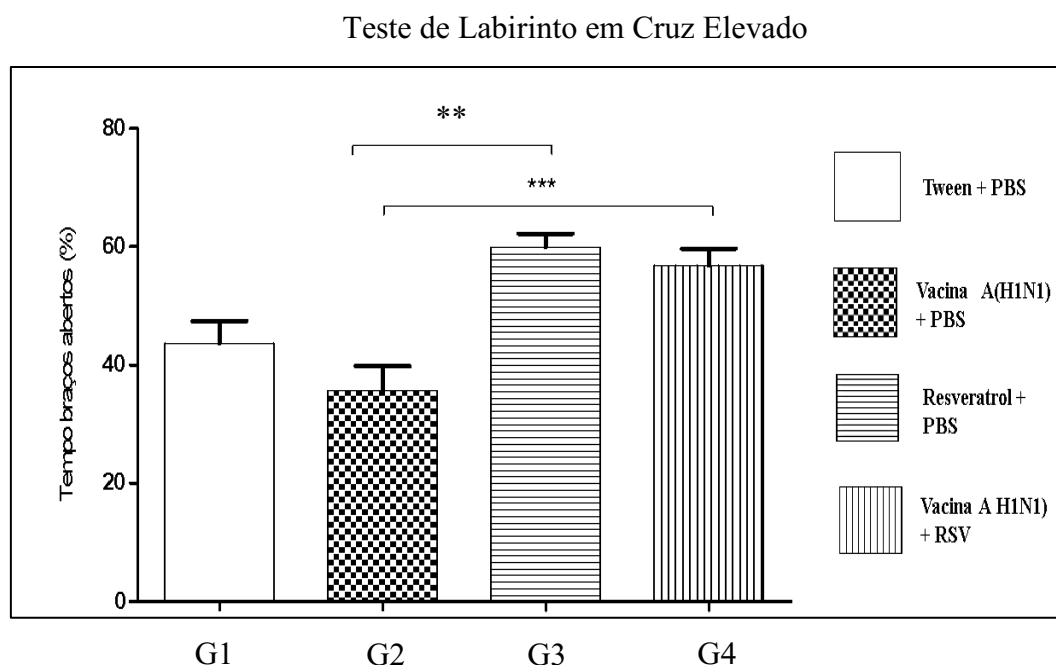


Figura 7 - Tempo de permanência em porcentagem dos animais dos quatro grupos experimentais no Teste do Labirinto em Cruz Elevado. ** diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao tempo de permanência nos braços abertos entre o G2 e o G3. *** diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao tempo de permanência nos braços abertos entre o G2 e o G4. Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ EPM.

5.1.1 Parâmetros complementares

A figura 8, mostra a frequência do comportamento de avaliação de risco “esticar” (SAP, do inglês, *stretched-attend posture*), nos braços fechados e abertos (SAP total), dos animais de cada grupo experimental submetidos ao LCE. Os animais do grupo G2 ($3,5 \pm 0,93$) apresentaram uma frequência do comportamento de avaliação de risco significativamente maior em relação aos grupos G1, G3 e G4 ($1 \pm 0,37$; $1,25 \pm 0,36$; $1,4 \pm 0,4$).

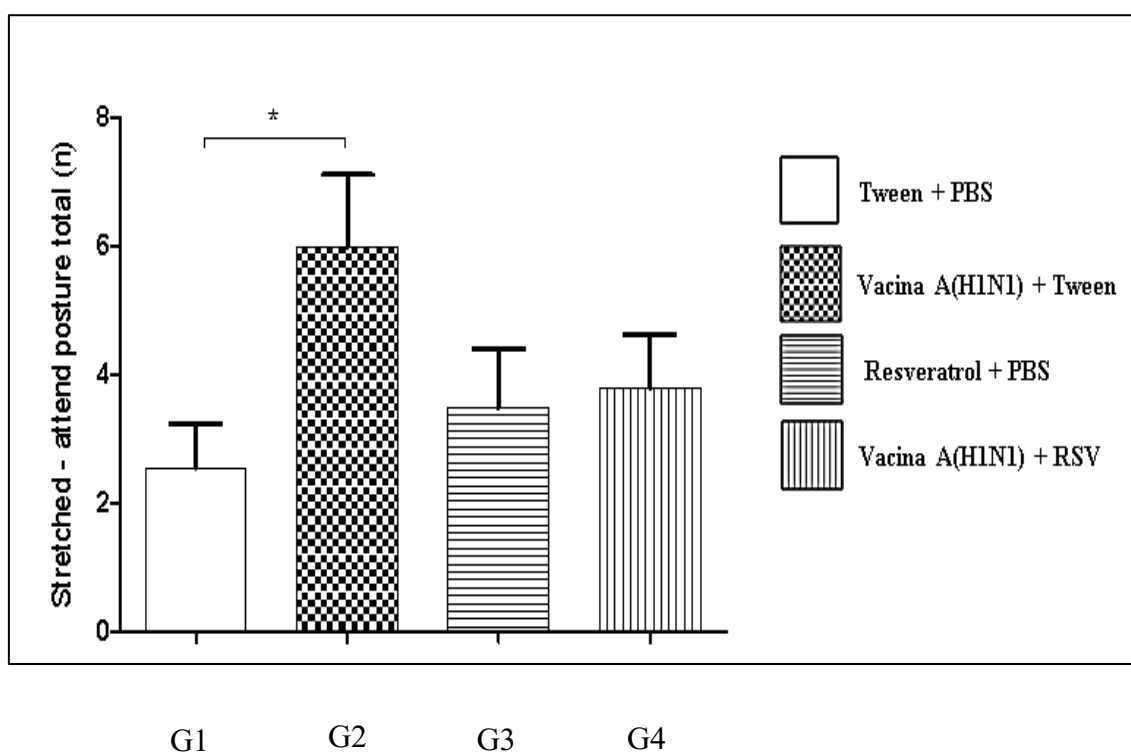


Figura 8 - Frequência do comportamento de *Stretched-attend posture* dos quatro grupos experimentais no Teste do Labirinto em Cruz Elevado. * diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao número de SAPt entre o G1 e G2. Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ EPM.

A figura 9, mostra o numero de eventos de *Head dipping* total, sendo considerado os eventos de HD protegido e desprotegido. A imersão de cabeça (HD) é um padrão comportamental considerado de avaliação de risco ou um papel exploratório e é usado como um parâmetro complementar para avaliar a ansiedade em animais experimentais. A figura mostra a diferença significativa entre o G1 e o G2, sendo que o G2 ($11,7 \pm 1,66$) apresentou eventos de HDt significativamente maior que o grupo controle ($5,77 \pm 1,27$).

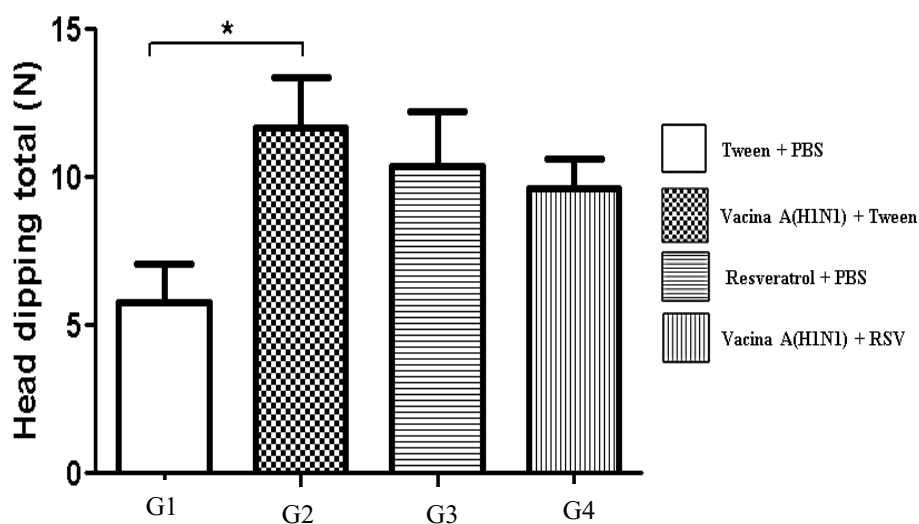


Figura 9 - A figura 9 representa os parâmetros referentes à avaliação de risco no LCE: *Head dipping* total. Os valores foram expressos como média $\pm$ EPM (Erro padrão da média), sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$. * diferença significativa quanto ao comportamento HD entre os animais dos grupos G1 e G2.

5.2 Teste do Nado Forçado

Analisou-se o tempo de imobilidade dos animais durante o teste. Os animais do grupo G2 apresentaram maior tempo de imobilidade ($179,2 \pm 13,84$, $p \leq 0,05$) em relação aos animais do grupo G1 ($81,9 \pm 11,86$), tendo sido a diferença significativa. Houve diferença significativa também entre os animais dos grupos G2 e G4 ($85,2 \pm 18,32$). Não houve diferença significativa entre os grupos G3 e G4.

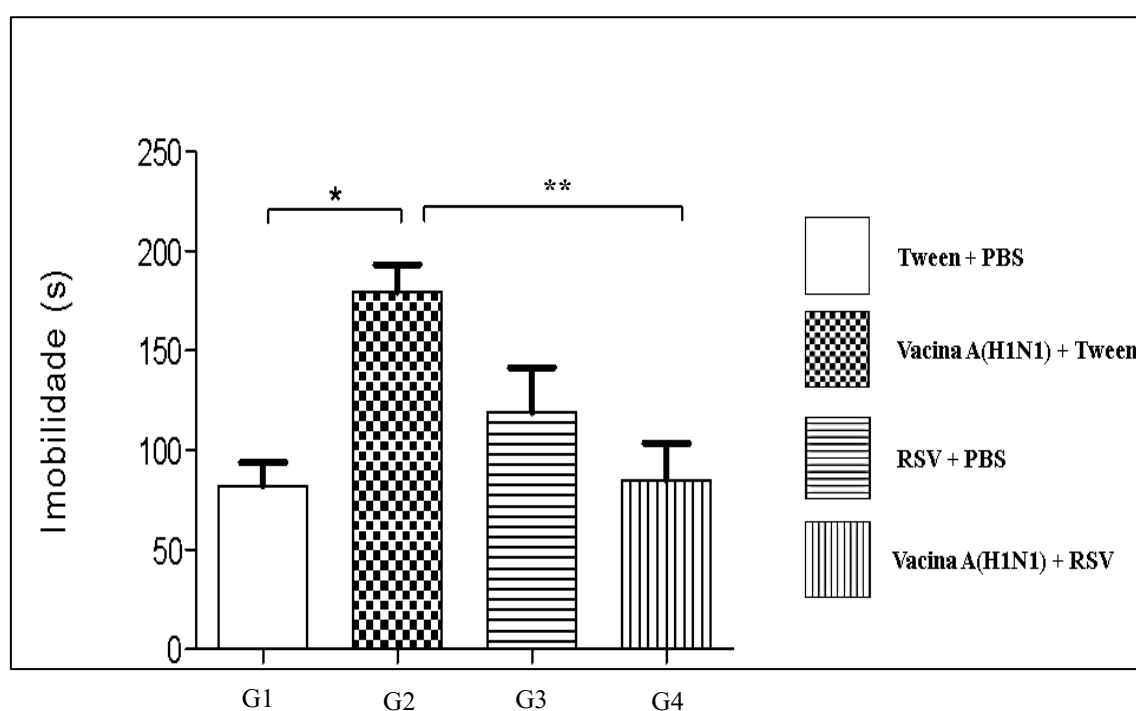


Figura 10 - Tempo de imobilidade em segundos dos animais dos 4 grupos experimentais no Teste do Nado Forçado. * diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao tempo de imobilidade no teste de nado forçado, entre o G1 e o G2. ** diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o G2 e o G4. Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ EPM.

5.3 Teste de Reconhecimento de Objetos

A figura 11, ilustra os tempos de interação dos camundongos com o objeto familiar (OF) e com o objeto novo (ON). Os animais dos grupos G1, G3 e G4 interagiram significativamente ($p \leq 0,05$) mais tempo com o ON ($23 \pm 8,43$; $13,25 \pm 2,64$; $20,83 \pm 3,27$ respectivamente) que com o OF ($13 \pm 2,93$; $3,5 \pm 1,29$; $11,33 \pm 1,60$). Já em G2, a diferença não foi significativa, ou seja, os camundongos passaram tempos similares interagindo com o objeto novo ($19,8 \pm 3,23$) e com o objeto familiar ($20,6 \pm 3,71$).

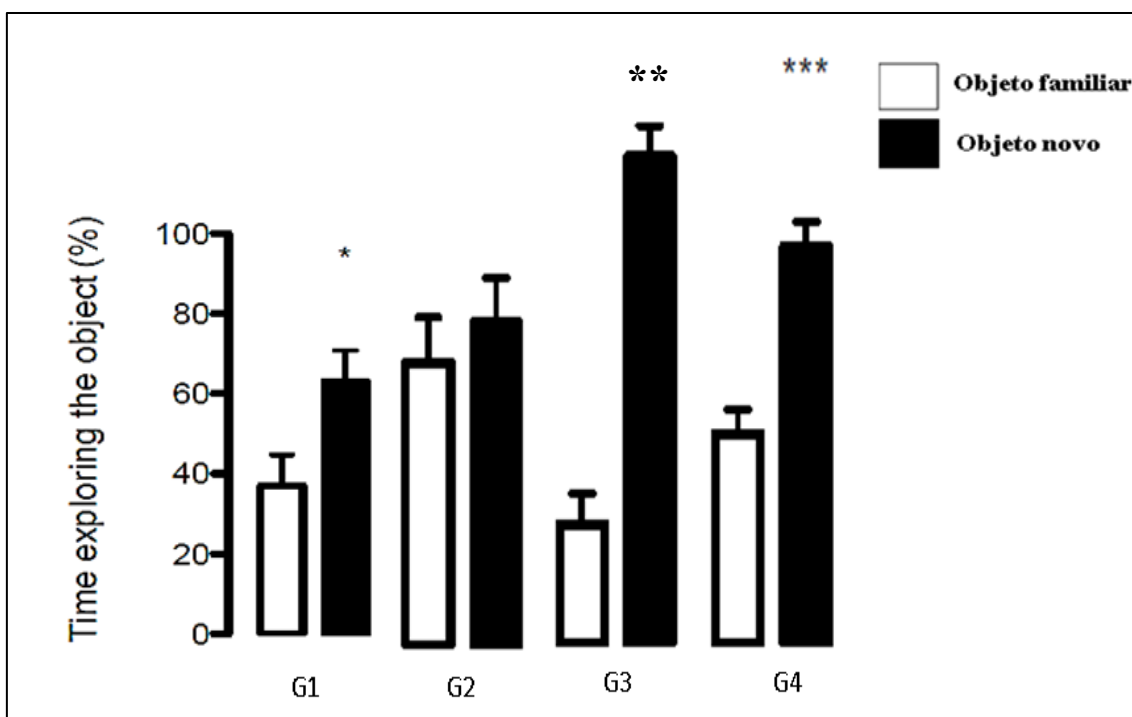


Figura 11 - Tempo de exploração dos objetos novos (ON) e familiares (OF), em segundos, pelos animais dos quatro grupos experimentais no Teste de Reconhecimento de Objeto. * diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao tempo de Reconhecimento de Objetos, entre o ON e OF do G1. ** diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao tempo de Reconhecimento de Objetos, entre o ON e OF do G3. *** diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao tempo de Reconhecimento de Objetos, entre o ON e OF do G4.

5.4 Teste de Interação Social

5.4.1 Parte 1: Sociabilidade

Os resultados, representados na figura 12, se referem ao Teste 1 e apresenta o tempo de interação com o animal desconhecido e a gaiola vazia. Os grupos G1, G3 e G4 apresentaram um tempo de interação maior com o animal não familiar ($31,22 \pm 6,74$; $36,14 \pm 14,14$; $43,4 \pm 6,73$ respectivamente) comparado com a gaiola vazia ($15,55 \pm 3,48$; $16,33 \pm 3,62$; $18,3 \pm 3,58$), sendo essa diferença significativa.

Em relação ao grupo G2, os animais passaram tempo similares interagindo com o animal não familiar ($89,6 \pm 17,13$) comparado com a gaiola vazia ($97,2 \pm 7,79$).

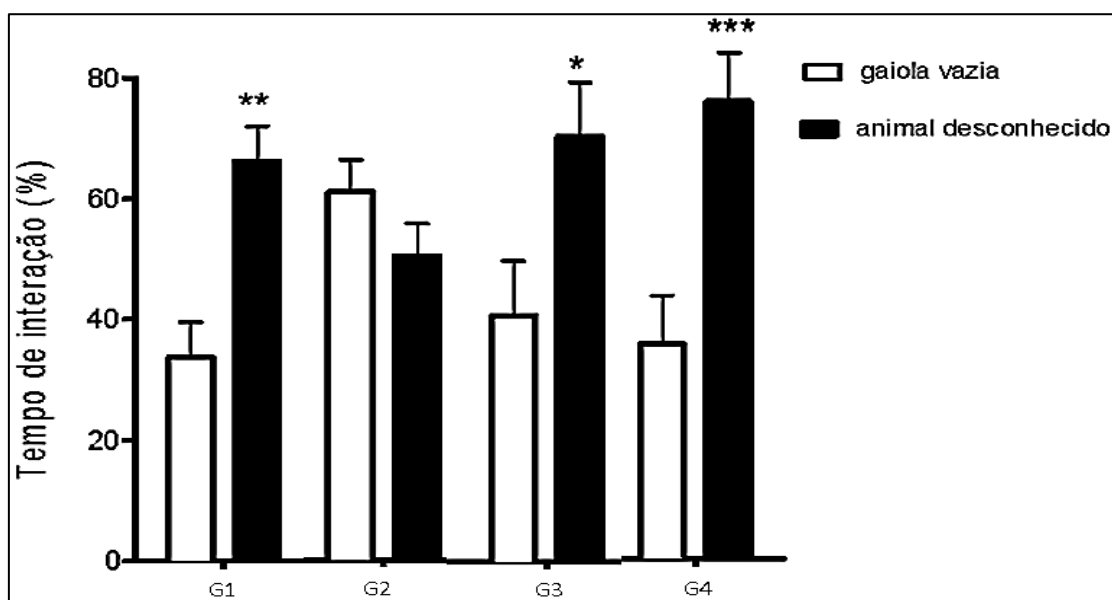


Figura 12 – Tempo de interação em porcentagem dos animais dos quatro grupos experimentais na primeira parte do Teste de Interação Social. * diferença significativa menor ou igual a 0,05 entre o tempo de interação com o animal não familiar e a gaiola vazia do G3. ** diferença significativa menor ou igual a 0,05 entre o tempo de interação com o animal não familiar e a gaiola vazia do G1. *** diferença significativa menor ou igual a 0,05 entre o tempo de interação com o animal não familiar e a gaiola vazia do G4. Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ EPM.

5.4.2 Parte II: Preferencia por novidade social

Na preferencia pela novidade social (Fig. 13), os animais dos grupos G1, G2 e G4 apresentaram um tempo de exploração similar com o camundongo familiar e com o animal desconhecido ou não familiar (familiar: $15 \pm 3,62$; $60,4 \pm 16,49$; $37,7 \pm 8,73$; animal desconhecido: $27,55 \pm 7,92$; $70,7 \pm 15,75$; $44,1 \pm 6,68$; nessa ordem). Nesse sentido apenas o tratamento com o Resveratrol (G3) causou uma diferença significativa no tempo de interação com o animal familiar ($26,75 \pm 11,18$) comparado com o animal não familiar ou desconhecido ($45,62 \pm 22,88$).

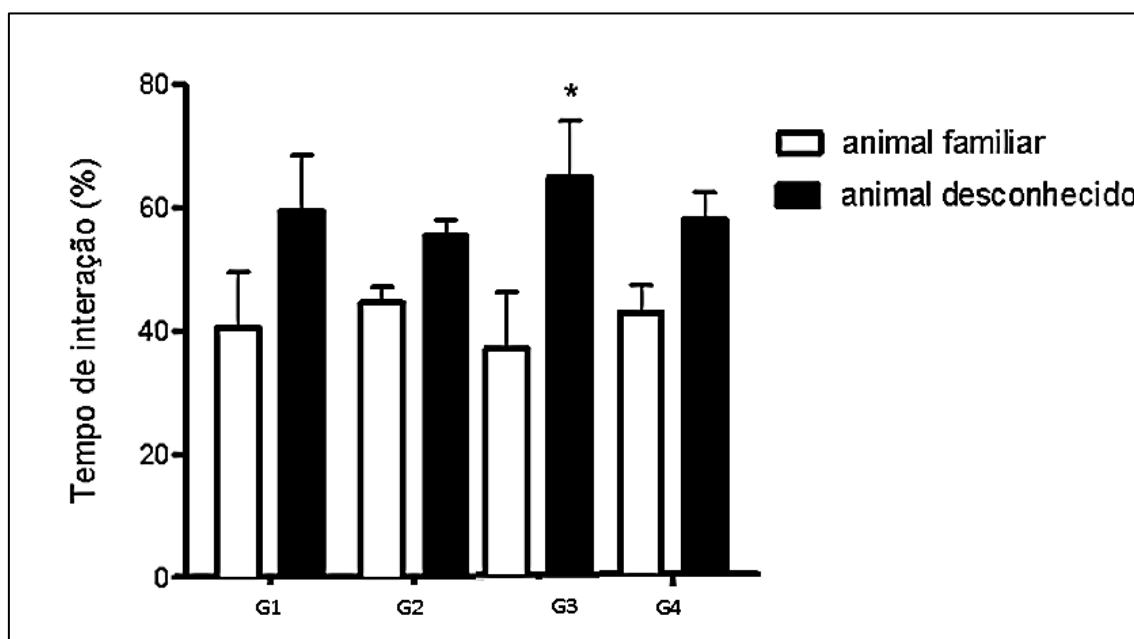


Figura 13 – Tempo de interação em porcentagem dos animais dos quatro grupos experimentais na segunda parte do Teste de Interação Social. * diferença significativa menor ou igual a 0,05 entre o tempo de interação com o animal familiar comparado com o animal não familiar.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho os camundongos foram submetidos a quatro modelos comportamentais que normalmente são utilizados para avaliar a ansiedade (Labirinto em Cruz Elevado), depressão (Teste do Nado Forçado), sociabilidade e preferência por novidade social (Teste de paradigma de três câmaras/Crawley), e memória (Reconhecimento de objetos), permitindo avaliar se a administração da vacina influenza trivalente no período pré-natal (E16) é capaz de gerar alterações comportamentais na prole em idade adulta, pelo fato da vacina ser composta de proteínas imunogênicas (vírus fragmentado e inativado) provocando uma resposta do sistema imune materno e, além disso, investigar o efeito da administração de resveratrol durante a gestação sobre esses comportamentos.

O Teste de Labirinto em Cruz Elevado foi criado há mais de 50 anos, passando por diversas modificações para se criar padronizações e conhecimentos suficientes para interpretar seus dados, até chegar na forma sistematizada que se é usada hoje. No teste, ocorre um típico evento chamado de “*approach-avoid conflict*” ou, conflito de aproximação e esquiva do animal experimental diante de um ambiente que ele não conhece, somado à tendência natural de se esquivar das regiões abertas que podem ser interpretadas como perigosas, resultando em respostas incondicionadas no animal (SILVA; FRUSSA-FILHO, 2000).

No atual estudo, observou-se que no teste de LCE, a prole adulta (camundongos machos) cujas mães receberam a vacina A (H1N1) no período pré-natal apresentaram uma diminuição significativa no tempo de permanência nos braços abertos. Apesar da premissa inicial associando a aversão dos braços abertos à altura, observou-se posteriormente que a tigmotaxia; tendência de o animal permanecer com o corpo próximo a ou em contato com superfícies verticais; é um importante fator para a aversão gerada pelos braços abertos no Labirinto em Cruz Elevado (TREIT et al., 1993), sendo que esse grupo apresentou um conflito maior de permanecer nas áreas abertas consideradas desprotegidas, denotando um comportamento do tipo ansioso quando comparado com os outros grupos.

Efeito semelhante já foi relatado por Pellow e colaboradores (1985) e por Cruz e colaboradores (1994), interpretado pelos autores como um aumento nos níveis de ansiedade dos animais. Achados parecidos são encontrados na literatura, onde foram

utilizados outros agentes estressores, como no estudo de Yee et al. (2011) em que observou-se que a administração de PolyI: C durante a gestação foi capaz de induzir um comportamento do tipo ansioso em ratos adultos. Já os estudos de Depino (2015) e Hsueh et al. (2017), mostraram que a administração de LPS no período gestacional foi capaz de reduzir o tempo de exploração dos braços abertos no LCE, e que o estresse imunogênico provocado por superantígenos bacterianos estafilococos em diferentes períodos da gestação também ocasionou na redução do tempo de exploração nos braços abertos. Já estudo realizado por Babri et al. (2014), o qual avaliou o efeito da infecção materna por LPS no comportamento tipo ansioso-depressivo em duas linhagens de camundongos (NMRI e C57BL/6), constatou que a AIM aumentou os níveis de comportamentos de ansiedade e depressão na prole de camundongos NMRI, conforme os Testes Labirinto em Cruz Elevado e Nado Forçado, respectivamente, porém não alterou o comportamento em camundongos C57BL/6.

Segundo Weinstock (2007), a presença de um agente estressor no período gestacional é capaz de comprometer o desenvolvimento do sistema límbico e do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) fetal, resultando em comportamentos do tipo ansiosos e tipo depressivos, além de déficits de aprendizagem e atenção na vida da prole. No entanto, ressalta que tais características variam conforme gênero (sexo), intensidade e momento em que a mãe sofre o estresse pré-natal, bem como depende dos comportamentos avaliados.

Em relação aos parâmetros de avaliação de risco (*riskassessment*), os animais que passaram pela AIM exibiram um aumento nos eventos de espreitas totais (*stretchedattend-postures*) e de *headpings* desprotegidos. Tais dados apontam para a importância da chamada avaliação de risco, através da análise de parâmetros complementares, que segundo (CRUZ et al., 1994) tais medidas etológicas indicam padrões de comportamento de precaução e cautela, representando informações mais sensíveis para estudos farmacológicos da ansiedade. Sendo assim, a AIM sozinha (G2) pareceu contribuir para o desenvolvimento de comportamentos do tipo ansioso na prole adulta, quando comparados com os demais grupos.

O tratamento com resveratrol administrado por seis dias consecutivos (de E14 a E19) produziu uma melhora nos efeitos ansiogênicos da AIM, como evidenciado pelo fato de que o RSV aumentou significativamente a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos no LCE e reduziu, embora não de forma significativa,

os eventos de avaliação de risco como SAPt e HDt, denotando diminuição de comportamentos do tipo ansiosos.

Li e colaboradores (2018) demonstraram melhora nos comportamentos de ansiedade em roedores num modelo de estresse pós traumático, sendo observado que o tratamento com RSV durante quatro dias foi capaz de reverter anormalidades no eixo límbico (L-HHA), no aumento da atividade da glândula supra-renal e dos níveis do fator de liberação de corticotropina (CRF), além de diminuir a expressão diferencial do receptor de glicocorticóide (GR) no hipotálamo, hipocampo e amígdala, tendo uma ação ansiolítica.

O efeito da AIM por vacina A (H1N1) foi responsável também por aumentar o tempo de imobilidade da prole no NF, sendo que o tempo de imobilidade pode ser usado como indicativo de um comportamento do tipo depressivo. Tal resultado corrobora com os achados de Lin e Wang (2014), que ao inocular LPS em ratas grávidas observou que a prole gerada do grupo inoculado apresentou um maior tempo de imobilidade em relação ao grupo controle. Nesse experimento, o tratamento com o RSV reduziu o tempo de imobilidade significativamente, ficando muito próximo do grupo controle, ou seja, é possível deduzir que o G4 não apresentou comportamentos do tipo depressivo pelo fato do tratamento com o RSV ter impedido ou reparado os efeitos da AIM. Testes complementares, como o consumo de sacarose e os níveis de auto-limpeza, devem ser realizados para se ter um melhor entendimento do processo.

Segundo Khan et al.(2014), a AIM possui um papel importante como fator de risco ambiental que contribui para os distúrbios emocionais relacionados à depressão na vida tardia, sendo encontrados estados anedônicos aumentados; onde ocorre uma falta de prazer aos estímulos recompensadores naturais, em roedores normalmente é verificada pela diminuição do consumo e da preferência por água com sacarose; juntamente com um aumento no desespero comportamental na prole, termo utilizado por Porsolt e colaboradores em 1977, sendo uma possível explicação deste padrão comportamental é que após o período inicial de “luta” os animais “percebem” que não tem rota de fuga do cilindro e “desistem” de tentar escapar. Além disso, no seu trabalho é mostrada a relação de alterações na neurogênese hipocampal ocasionando disfunções comportamentais e cognitivas relacionadas à depressão, onde as habilidades cognitivas como habilidades motoras, memória, atenção e percepção dependentes do hipocampo são deficientes em descendentes da AIM.

Memória é a capacidade de gerar aquisição, formação, conservação e a evocação de informações (IZQUIERDO, 2002; SQUIRE; KANDEL, 2003). A aquisição representa a aprendizagem; a formação e a conservação são processos complexos e dependem do tipo de memória; e, a evocação é a recordação, a lembrança daquilo que foi aprendido anteriormente (SQUIRE, 2004), sendo muito comum em desordens neuropsiquiátricas alterações nesses processos. Em um estudo, Brown e colaboradores (2009) mostraram que pacientes com esquizofrenia, cujas mães tinham confirmado infecções virais durante a gravidez, tiveram um desempenho pior no teste tipo *set-shifting*, um teste cognitivo que envolve a capacidade de inconscientemente mudar a atenção entre uma tarefa e outra sendo que a alternância de tarefas permite que uma pessoa se adapte rápida e eficientemente a diferentes situações, déficits nesse teste são comumente encontrados em pacientes com doença de Parkinson e espectro autista. Esses achados levantam a possibilidade que a AIM pode ser particularmente prejudicial para processos cognitivos de ordem superior, como a percepção e memória.

O Teste de Reconhecimento de Objetos baseia-se no fato de que roedores possuem uma tendência natural em gastar mais tempo explorando novos objetos que objetos conhecidos, sendo este um comportamento esperado em animais normais. A preferência pela novidade indica que o roedor possui uma memória do objeto familiar, e com isso consegue distinguir entre o novo e o conhecido, o que de fato é muito importante para a sua sobrevivência (ENNACEUR; DELACOUR, 1988).

Em nossos experimentos os animais do grupo controle (G1) e que receberam resveratrol (G3) passaram maior período de tempo interagindo com o objeto novo do que com o objeto familiar, demonstrando aquisição de memória. Já os animais do grupo G2 (receberam vacina) interagiram tempos similares com o ON e OF, demonstrando que tiveram prejuízo em algum processo relacionado à formação, conservação ou evocação da memória, não recordando do seu contato anterior com o objeto familiar. Outros trabalhos também demonstraram uma associação entre a ativação imunológica maternal provocada por diferentes agentes imunogênicos com o surgimento de déficits no aprendizado e memória da prole adulta, corroborando com os resultados do presente trabalho (GIOVANOLI et al., 2015; JIANG et al., 2013; MEYER et al., 2009; OZAWA et al., 2016).

É possível sugerir duas hipóteses que expliquem porque os indivíduos cujas mães receberam vacina A(H1N1), não foram capazes de distinguir entre o objeto novo e o familiar. Sabe-se que as memórias de curta e longa duração são consolidadas por células especializadas do hipocampo e das áreas do córtex com as quais ele se conecta. A memória de curta duração mantém a informação disponível enquanto a de longa duração está sendo formada (UNSWORTH; ENGLE, 2007), é como se a informação ficasse temporariamente em uma moradia já que a memória de trabalho dura poucos segundos e a de longa duração demora horas para se formar definitivamente (RICHARDSON, 2007; IZQUIERDO, 2004). A memória de curta duração necessita das mesmas estruturas nervosas que a de longa duração, mas envolve mecanismos próprios e distintos, como a síntese protéica. As memórias de longa duração duram muitos meses ou anos (IZQUIERDO, 2002; MONCADA; VIOLA, 2007).

Sendo assim, como já comentado anteriormente o estresse pré-natal tem sido estreitamente ligado à supressão da neurogênese hipocampal, região considerada sede da memória e importante constituinte do sistema límbico, e estão envolvidas na memória e depressão (JOCA, 2003). Mesmo apresentando a propriedade de neurogênese pós-natal (ECKENHOFF, 1988), eventos estressores oferecem uma forte influência nesse processo no indivíduo adulto. Debassio et al, 1996, demonstraram que a desnutrição pré-natal, produzida por privação protéica, altera significativamente o perfil da neurogênese pós-natal na região do giro dentado em animais de laboratório e que esse processo persiste mesmo com a reabilitação nutricional após o nascimento.

Além disso, é possível que o tratamento com a vacina A (H1N1) tenha gerado alguma alteração nas funções olfativas da prole. Liu et al. (2013) verificou uma discriminação olfatória comprometida na prole adulta de mães expostas à AIM por PolyI: C. Ainda, Baharnoori et al. (2012) observou em ratos neonatos, cujas mães foram expostas à AIM por LPS, uma deficiência no comportamento olfatório na busca de um novo ambiente e na aprendizagem associativa ao odor.

Sabe-se que a capacidade olfatória esta intimamente envolvida com a memória, principalmente em roedores, pois é vital pra estabelecer interações entre os indivíduos, sendo que o reconhecimento de um indivíduo como integrante de um dado grupo social é fundamental para o funcionamento do grupo, e na sobrevivência dos mesmos (MOURA; XAVIER, 2010). Diferentes grupos de animais fazem uso de pistas distintas para o processo de reconhecimento. Humanos e primatas não humanos fazem uso

preferencial de pistas visuais e auditivas para distinguir e identificar co-específicos; já roedores parecem basear-se principalmente em informações de natureza olfatória.

No momento do teste de RO, na habituação são colocados dois objetos idênticos e deixado que o animal interaja com os mesmos durante 15 minutos. No dia seguinte, é feito o T1 (aquisição) onde os mesmos objetos são colocados no aparato junto com o animal durante 10 minutos, na segunda etapa é substituído um dos objetos (sendo esse considerado novo) e mantido o outro objeto (familiar). O contato que os animais fazem com os objetos no aparato podem acabar deixando rastros de cheiros nos próprios objetos durante a habituação e o T1, sendo que o aparato é limpo com álcool 70 % e hipoclorito 20%, porém o objeto familiar se mantém o mesmo, o que pode influenciar na identificação pelos animais de como sendo o objeto familiar, pelo reconhecimento do seu possível feromônio que possa ter sido deixado no objeto, pois sabe-se que roedores exibem “assinaturas olfatórias” (CARR; YEE; GABLE; MARASCO, 1976) que seriam cruciais para a formação de grupos sociais, e também na demarcação de territórios. Nesse caso, considerando-se essa hipótese, os animais dos grupos G1 e G3 teriam conseguido identificar que o objeto conhecido possuía um cheiro familiar, não apresentando risco ou perigo e assim não necessitando de tanta atenção. Mas nos animais que passaram pela AIM (G2), segundo os dados da literatura descritos, se ocorreram prejuízos na capacidade olfatória dos animais eles não possuiriam essa mesma percepção, interagindo com ambos os objetos indistintamente. O tratamento com o RSV aumentou significativamente o tempo de interação com o objeto novo, demonstrando que ele foi capaz de melhorar a capacidade de reconhecimento dos animais que passaram pela AIM.

E um padrão de comportamento parecido foi visualizado no Teste de Interação Social, com relação à primeira etapa que avalia a sociabilidade. Um animal normal, considerado saudável, tem preferência por permanecer mais tempo no compartimento que possui um animal coespecífico e isso logo implica que ele possuirá também uma interação maior com o mesmo (SCHNEIDER, T; PRZEWTOCKI, 2005). O G1 passou um tempo significativamente maior interagindo com o animal desconhecido, sendo não familiar pra ele do que com a gaiola vazia, confirmando o que o controle desse grupo e o (T1) foi realizado de forma adequada. Analisando esses resultados sob a ótica de que os animais que passaram pela AIM tiveram um prejuízo olfatório, pode-se inferir que o

grupo controle interagiu mais com o animal desconhecido pela capacidade de captar os odores emanados pelo seu coespecífico gerando uma predileção a interagir mais com ele. O reconhecimento do indivíduo por meio dessas substâncias parece possibilitar a formação de pares, reconhecimento de familiares e o estabelecimento de dominâncias hierárquicas (YOUNG, 2002).

O (G2), similarmente como visto no teste de reconhecimento de objetos interagiram de modo similar entre a gaiola vazia e a gaiola contendo um animal desconhecido, confirmando que a prole originada das mães que sofreram imunoativação materna, apresenta prejuízo na aprendizagem, memória e reconhecimento podendo ser tanto de objetos e formas como também no reconhecimento de um animal coespecífico. Esse comportamento é observado como não convencional a esse grupo, devido a todos os outros grupos apresentarem um comportamento característico ao serem apresentados ao aparato; já anteriormente habituados; o interesse em investigar o animal desconhecido, ou em outras palavras, o odor desconhecido.

Tais prejuízos comportamentais apresentados por esse grupo foram revertidos pelo tratamento com o RSV durante E14-E19 da gestação. Resultado parecido foi encontrado nos testes de Xie et al., 2018, onde constatou que o resveratrol melhorou o comportamento semelhante ao autismo induzido por exposição pré-natal à progestina através da ativação de $Er\beta$, possuindo efeito neuroprotetor através de efeitos epigenéticos ao realizar desmetilação do DNA e histonas do promotor $Er\beta$, além disso, minimizou o estresse oxidativo induzido pela progestina, bem como melhorou disfunções na mitocôndria e no metabolismo lipídico do cérebro. Um ponto interessante que deve ser levado em consideração para análises posteriores é o fato de que animais que não apresentam disfunções olfatórias são identificados uma redução no comportamento exploratório deles no final do teste, como constatado por Halpin em 1974, como forma de habituação ao odor, sendo interpretado pelo animal experimental que o coespecífico desconhecido não oferece nenhum risco á ele. Paralelamente, o (G3) que recebeu Resveratrol durante a gestação apresentou um nível de sociabilidade parecido com a do controle (G1), interagindo mais com o animal do que com a gaiola vazia.

Em relação ao Teste 2, preferência pela novidade social os tratamentos parecem não ter causado diferença significativa entre os grupos G1, G2 e G4, sendo que todos interagiram de forma semelhante com o animal conhecido e o animal desconhecido, exceto no grupo vindo de mães que foram tratadas com o RSV (G3). Possivelmente houve alguma interferência, sendo que o animal normal tende a se recordar do contato previo com o camundongo na primeira etapa, tendendo a passar mais tempo interagindo com o camundongo não familiar (KAIDANOVICH-BEILIN et al., 2011).

Uma vez que estudos epidemiológicos e pré-clínicos vem sugerindo que a ativação do sistema imunológico materno, independentemente da causa específica dessa ativação, pode ser responsável pelas alterações comportamentais na prole (KNUESEL ET AL., 2014), e uma vez que os animais filhos de mães tratadas com resveratrol tiveram efeitos positivos na redução dos prejuízos comportamentais, acredita-se que isso pode ter ocorrido pela inibição de alguns fatores relacionados à resposta imunológica materna.

A resposta inata pró-inflamatória pode ser inibida por diferentes fatores: inibição da síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios; modificação da síntese de eicosanoides; inibição da ativação de células imunes, inibição do óxido nítrico sintetase indutível (iNOS) e COX-2, via inibição de NF- κ B e AP-1. O fator de transcrição NF- κ B controla a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (ex. IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 e TNF- α), quimiocinas (ex. IL-8, MIP-1 α , MCP1), moléculas de adesão, enzimas induzíveis (ex. COX-2 e iNOS), fatores de crescimento e alguns receptores (PERVAIZ; HOLME; AGGARWAL, 2009). Por outro lado, a habilidade do LPS em ativar vias pró-inflamatórias pode ser revertida em parte pelo resveratrol, através da inibição de NF- κ B e síntese de NO (TSAI; LIN-SHIAU; LIN, 1999) (CHO; KOO; CHUNG, 2002) (FENG; ZOU; LI, 2002).

A supressão da concentração-dependente da produção de citocinas inflamatórias (TNF- α and IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-6) por células do sangue *ex vivo* (rato) após o tratamento com *trans*-resveratrol reforça a hipótese de que o efeito imunomodulatório do resveratrol pode ter um papel importante em diversas doenças que envolvem produção exacerbada de citocinas inflamatórias (MARIER; CHEN; PRINCE, 2005), como na hipótese de que a AIM aumenta a concentração de citocinas no ambiente materno ocasionando os efeitos negativos no comportamento.

Entretanto, apesar do papel inibitório do resveratrol sobre o fator de transcrição NF- κ B em diversas células, foi demonstrado o efeito ativador nas concentrações entre 25-50 μ M em dois modelos de células epiteliais de intestino (HT-29 e CACO-2). Após as células serem tratadas com estímulos inflamatórios, o resveratrol e agênisteína foram as únicas substâncias a estimular NF- κ B e a produção de IL-8 (quimiotaxia) (JEONG; KIM; HU, 2004) (ROMIER; VAN DE WALLE; DURING, 2008), demonstrando que a dose é muito importante para se obter o benefício pretendido.

7. CONCLUSÃO

É possível concluir com os resultados desse estudo que o tratamento das matrizes com a vacina influenza A (H1N1) em E16 foi capaz de afetar o comportamento da prole em idade adulta (P60) e que o Resveratrol administrado durante E14-E19 da gestação foi capaz de reverter os prejuízos comportamentais na prole imunoativada.

8. REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Resveratrol in health and disease. Florida: crc press, 2006.

ALLSWEDE DM, BUKA SL, YOLKEN RH, TORREY EF, CANNON TD (2016). Elevated maternal cytokine levels at birth and risk for psychosis in adult offspring. *Schizophr res* 172:41–45.

ARANGO DUQUE G, DESCOTEAUX A (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front immunol* 5 : 491.

ATANASOVA B, GRAUX J, EL HAGE W, HOMMET C, CAMUS V, BELZUNG C. Olfaction: a potential cognitive marker of psychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev* 2008; 32 (7), 1315–1325.

BANKS WA. Blood-brain barrier as a regulatory interface. *Forum nutr.* 2010;63:102-10. Review

BANKS WA, ERICKSON MA. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol dis.* 2010;37(1):26-32

BERTELLI AA, DAS DK. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. *J cardiovasc pharmacol* 2009;54:468-76.

BATH KG, MANDAIRON N, JING D, RAJAGOPAL R, KAPOOR R, CHEN ZY, KHAN T, PROENCA CC, KRAEMER R, CLELAND TA, HEMPSTEAD BL, CHAO MV, LEE FS. Variant brain-derived neurotrophic factor (val66met) alters adult olfactory bulb neurogenesis and spontaneous olfactory discrimination. *J. Neurosci* 2008; 28 (10), 2383–2393.

BHAT, K.P.L.; KOSMEDER II, J.W.; PEZZUTO, J.M. biological effects of resveratrol. *Antioxidants & redox signaling*, v.3, n. 6, p.1041-1064, 2001.

BOULANGER-BERTOLUS J, PANCARO C AND MASHOUR GA (2018). Increasing. Role of maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. *Front. Behav. Neurosci.* 12:230.

BONNEY EA. Immune regulation in pregnancy: a matter of perspective? *Obstet gynecol clin north am.* 2016;43(4):679-98

BOKSA P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain behav immun* 2010; 24: 881–897.

BRENT RL. Risks and benefits of immunizing pregnant women: the risk of doing nothing. *Reproductive toxicol* 2006;21:383-9.

BROWN AS, HOOTON J, SCHAEFER CA, ZHANG H, PETKOVA E, BABULAS V, PERRIN M, GORMAN JM, SUSSER ES (2004). Elevated maternal interleukin-8 levels and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am j psychiatry* 161:889–895.

CARR, E. J., YEE, L., GABLE, D., & MARASCO, M. (1976). Olfactory recognition of conspecifics by domestic norway rats. *Journal of comparative & physiological psychology*, 90, 821-828.

CHEN, C.Y., JANG, J.H., LI, M.H., SURH, Y.J., 2005. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of nf-e2-related factor 2 in pc12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 993-1000.

CHO, D.-I.KOO, N.-Y.CHUNG, W. J. et al. Effects of resveratrol-related hydroxystilbenes on the nitric oxide production in macrophage cells: structural requirements and mechanism of action. *Life sciences*, v. 71, n. 17, p. 2071- 2082, 2002.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F.S. a detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2001; 25: 235-260.

CRAMPTON SJ, COLLINS LM, TOULOUSE A, NOLAN YM, O'KEEFFE GW (2012). Exposure of fetal neural progenitor cells to il-1b impairs their proliferation and alters their differentiation – a role for maternal inflammation *j neurochem* 120:964–973.

CRUZ, A. P. M., FREI, F., GRAEFF, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 49, 171-176.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in pharmacological sciences*, v. 23, n. 5, p. 238–45, 2002.

CSISZAR, A. Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease. *Nih public access.*, v. 1215, p. 117-122. 2011.

DAS, S., CORDIS, G.A., MAULIK, N., DAS, D.K. pharmacological preconditioning with resveratrol: role of creb-dependent bcl-2 signaling via adenosine a3 receptor activation. *Am j physiol* 288: h328–h335, 2005a.

DAS, S., TOSAKI, A., BAGCHI, D., MAULIK, N., DAS, D.K. resveratrol-mediated activation of camp response element-binding protein through adenosine a3 receptor by akt-dependent and -independent pathways. *J pharmacol exp ther* 314: 762–769, 2005b.

DAS, S., FRAGA, C.G., DAS, D.K. cardioprotective effect of resveratrol via ho-1 expression involves p38 map kinase and pi-3-kinase signaling, but does not involve nf-kappab. *Free radic res* 40: 1066–1075, 2006a.

DAS, S., TOSAKI, A., BAGCHI, D., MAULIK, N., DAS, D.K. potentiation of a survival signal in the ischemic heart by resveratrol through p38 mitogen-activated protein kinase/mitogen- and stress-activated protein kinase 1/camp response element-binding protein signaling. *J pharmacol exp ther* 317: 980–988, 2006b

DAVIES G, WELHAM J, CHANT D, TORREY EF, MCGRATH J. A systematic review and meta-analysis of northern hemisphere season of birth studies in schizophrenia. *Schizophr bull.* 2003;29(3):587-93.

DEBASSIO WA, KEMPER TL, TONKISS J, GALLER JR. Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus. *Brain res bull.* 1996;41(6):379-83.

DEL ZOPPO G, GINIS I, HALLENBECK JM, IADECOLA C, WANG X, FEUERSTEIN GZ. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and inos in brain response to ischemia. *Brain pathol.* 2000;10(1):95-112.

DEPINO, A. M. Early prenatal exposure to lps results in anxiety- and depression-related behaviors in adulthood. *Neuroscience*. Volume 299, 23 july 2015, 56-65.

DINARELLO CA. INTERLEUKIN-1BETA. *CRIT CARE MED.* 2005;33(12 SUPPL):S460-2.

DOMINGUES CM, DE OLIVEIRA WK. Uptake of pandemic influenza (h1n1)-2009 vaccines in brazil, 2010. *Vaccine.* 2012 jul 6;30(32):4744-51.

ECKENHOFF MF, RAKIC P. Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. *J neurosci.* 1988;8(8):2729-47.

ENNACEUR A, DELACOUR J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I: behavioral data. *Behavioural brain research* 1988; 31(1):47-59.

FENG, Y. H.ZHOU, W. L.WU, Q. L. et al. Low dose of resveratrol enhanced immune response of mice. *Acta pharmacol sin*, v. 23, n. 10, p. 893-7, 2002.

FUJIOKA A, FUJIOKA T, ISHIDA Y, MAEKAWA T, NAKAMURA S. Differential effects of prenatal stress on the morphological maturation of hippocampal neurons. *Neuroscience* 2006; 141: 907–915.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. *Life sci.*, v.66, p. 663-673, 2000.

GARAY PA, HSIAO EY, PATTERSON PH, MCALLISTER AK. Maternal immune activation causes age- and region-specific changes in brain cytokines in offspring throughout development. *Brain behav immun* 2013; 31, 54–68.

GIOVANOLI, SANDRA et al. Late prenatal immune activation causes hippocampal deficits in the absence of persistent inflammation across aging. *Journal of neuroinflammation*, v. 12, n. 1, p. 221, 2015.

HAXBY, J. V., E. A. HOFFMAN, *et al.* Human neural systems for face recognition and social communication. *Biol Psychiatry*, v.51, n.1, Jan 1, p.59-67. 2002.

HUNG, L.M., SU, M.J., CHEN, J.K. Resveratrol protects myocardial ischemia–reperfusion injury through both no-dependent and no-independent mechanisms. *free radic biol med* 36: 774–781, 2004.

HUNSAKER, M. R., J. L. ROGERS, *et al.* Behavioral characterization of a transection of dorsal CA3 subcortical efferents: comparison with scopolamine and physostigmine infusions into dorsal CA3. *Neurobiol Learn Mem*, v.88, n.1, Jul, p.127-36. 2007.

JAUNEIKAITE E, JEFFERIES JM, HIBBERD ML, CLARKE SC. Prevalence of streptococcus pneumoniae serotypes causing invasive and non-invasive disease in south east asia: a review. *Vaccine*. 2012;30(24):3503-14.

JEONG, W. S.KIM, I. W.HU, R. *et al.* Modulatory properties of various natural chemopreventive agents on the activation of nf-kappab signaling pathway. *Pharm res*, v. 21, n. 4, p. 661-70, 2004.

JIANG HY, XU LL, SHAO L, XIA RM, YU ZH, LING ZX, YANG F, DENG M, RUAN B. Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Brain behav immun*. 2016;58:165-72

JOCA SRL, PADOVAN CM, GUIMARÃES FS. Estresse, depressão e hipocampo. *Rev bras psiquiatr*. 2003;25(supl 2i):46-51.

JURGENS, H.A., AMANCHERLA, K., JOHNSON, R.W. influenza infection induces neuroinflammation, alters hippocampal neuron morphology, and impairs cognition in adult mice. *J. Neurosci* 2012; 32, 3958–3968.

KHAN, ET AL. Long-term effects of maternal immune activation on depression-like behavior in the mouse. *Transl. Psychiatry*, 4 (2014), p. E363

KNUESEL I, CHICHA L, BRITSCHGI M, SCHOBEL SA, BODMER M, HELLINGS JA, TOOVEY S, PRINSSEN EP (2014). Maternal immune activation and abnormal brain development across cns disorders. *Nat rev neurol* 10:643–660.

KONRATH L, BECKIUS D, TRAN US. Season of birth and population schizotypy: results from a large sample of the adult general population. *Psychiatry res*. 2016;242:245-50.

KWIEK JJ, MWAPASA V, MILNER DA, JR., ALKER AP, MILLER WC, TADESSE E, MOLYNEUX ME, ROGERSON SJ, MESHNICK SR. Maternal-fetal microtransfusions and hiv-1 mother-to-child transmission in malawi. *Plos med*. 2006;3(1):22.

KYLE, U. G.; PICHARD, C. The dutch famine of 1944–1945: a pathophysiological model of long-term consequences of wasting disease. *Curr opin clin nutr metab care*, v. 9, n. 4, p. 388-394, 2006.

LEMAIRE V, KOEHL M, LEMOAL M, ABROUS DN. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Pnas* 2000; 97: 11032–11037.

LI, G., WANG, G., SHI, J., XIE, X., FEI, N., CHEN, L., LIU, N., YANG, M., PAN, J., HUANG, W., XU, Y. Trans-resveratrol ameliorates anxiety-like behaviors and fear memory deficits in a rat model of post-traumatic stress disorder, *neuropharmacology* (2018).

LIU YH, LAI WS, TSAY HJ, WANG TW, YU JY. Effects of maternal immune activation on adult neurogenesis in the subventricular zone-olfactory bulb pathway and olfactory discrimination. *Schizophr res* 2013;151(1-3):1-11.

LIU, H.-Y., HUNG, Y.-F., LIN, H.-R., YEN, T.-L., AND HSUEH, Y.-P.* (2017). Tlr7 deletion selectively ameliorates spatial learning but does not influence aβ deposition and inflammatory response in an alzheimer's disease mouse model. *Neuropsychiatry* 7:509-521

MARIER, J. F. CHEN, K. PRINCE, P. *ET AL*. Production of ex vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-α, interleukin-1β, and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependent manner. *Can j vet res*, v. 69, n. 2, p. 151-4, 2005.

MARTNER A, DAHLGREN C, PATON JC, WOLD AE. Pneumolysin released during streptococcus pneumoniae autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. *Infect immun*. 2008;76(9):4079-87.

MCMILLAN M, PORRITT K, KRALIK D, COSTI L, MARSHALL H. Influenza vaccination during pregnancy: a systematic review of fetal death, spontaneous abortion, and congenital malformation safety outcomes m. *Vaccine*. 2015; 27;33(18):2108-17

MEYER U (2014). Prenatal poly(i:c) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biol psychiatry* 75:307–315.

MEZADRI, T. J.; BATISTA, G. M.; PORTES, A C.; MARINO-NETO, J.; LINO-DEOLIVEIRA, C. Repeated rat-forced swim test: reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. *Journal of neuroscience methods*, v. 195, n. 2, p. 200–5, 2011. Elsevier b.v.

MILLER AH, RAISON CL (2016). The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat rev immunol* 16:22–34.

MISHRA MK, DUTTA K, SAHEB SK, BASU A. Understanding the molecular mechanism of blood-brain barrier damage in an experimental model of japanese encephalitis: correlation with minocycline administration as a therapeutic agent. *Neurochem int.* 2009;55(8):717-23.

MISHIMA, K., K. IWASAKI, et al. The scopolamine-induced impairment of spatial cognition parallels the acetylcholine release in the ventral hippocampus in rats. *Jpn J Pharmacol*, v.84, n.2, Oct, p.163-73. 2000.

MOURA, P.J.; XAVIER, G.F. memória de reconhecimento social em ratos. *Pscicol.*, v.21, p.355-389, 2010

MORRIS, M.E. movement disorders in people with parkinson disease: a model for physical therapy. *Phys ther.*, v.80, n.6, p.578-597, 2000.

NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. The first influenza pandemic of the new millennium. *Influenza other respir viruses.* 2011 may;5(3):157-66.

NUNES MC, MADHI SA. Review on the effects of influenza vaccination during pregnancy on preterm births. *Hum vaccin immunother* 2015; 11(11):2538-48.

OVESNA, Z., KOZICS, K., BADER, Y., SAIKO, P., HANDLER, N., ERKER, T., SZEKERES, T. Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-trans-stilbene in three leukemia cell lines. *Oncol rep* 16: 617-624, 2006.

OZAWA, K. ET AL. Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Biological psychiatry*, v. 59, n. 6, p. 546-554, 2006.

P. H. PATTERSON, *behav. Brain res.* 204, 313–321 (2009).

PAINTER, R. C.; ROSEBOOM, T. J.; BLEKER, O. P. Prenatal exposure to the dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod toxicol*, v. 20, n. 3, p. 345-352, 2005.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S. E., & BRILEY, M. (1985). Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 14, 149-167.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European journal of pharmacology*, v. 47, n. 4, p. 379–391, 1978.

PLOEGER A, RAIJMAKERS ME, VAN DER MAAS HL, GALIS F. The association between autism and errors in early embryogenesis: what is the causal mechanism? *Biol psychiatry*. 2010;67(7):602-7.

REICHE EM, NUNES SO, MORIMOTO HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet oncol.* 2004;5(10):617-25.

RICHARDSON JT. 2007. Measures of short-term memory: a historical review. *Cortex* 43: 635-650.

RIDPATH, J. F.; FLORES, E. F. *Virologia veterinária*. 1.ed. Santa maria: editora da ufsm, 2007, p.563.

ROGERS, J. L. E R. P. KESNER. Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval of tone/shock-induced fear conditioning. *Learn Mem*, v.11, n.1, Jan-Feb, p.102-7. 2004.

ROMIER, B.VAN DE WALLE, J.DURING, A. et al. modulation of signalling nuclear factor-kappaB activation pathway by polyphenols in human intestinal caco-2 cells. **br j nutr**, v. 100, n. 3, p. 542-51, 2008.

S. REISINGER ET AL., *pharmacol. ther.* 149, 213–226 (2015).

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

SCHMATZ, R., MAZZANTI, C.M., SPANEVELLO, R., STEFANELLO, N., GUTIERRES, J., CORRÊA, M., DA ROSA, M.M., RUBIN, M.A., CHITOLINA SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur j pharmacol.*, v.610, n 1-3, p.42-48, 2009.

SCHNEIDER T, PRZEWTOCKI R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacol*, 30: 80-89, 2005

SELYE, H. (1959). *Stress, a tensão da vida*. São paulo: ibrasa - instituição brasileira de difusão cultural.

SINGH K.C., KUMAR A., LAVOIE A.L., DI PIPETTE D.J., SINGH U.S. diabetic complications in pregnancy: is resveratrol a solution? *Exp. Biol. Med.* 2013, pp. 1-9

SINGH, N.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E. Advances in the treatment of parkinson's disease. *Progress in neurobiology.*, V. 81, P. 29–44, 2007.

SILVA, REGINA & FRUSSA-FILHO, R. (2000). The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. *Journal of neuroscience methods*. 102. 117-25.

SOGC: CLINICAL PRACTICE GUIDELINES. Immunization in pregnancy. Intl j gynecol obstetr 2009;15:187-191.

SOKOLOWSKI, M. B. Social interactions in "simple" model systems. Neuron, v.65, n.6, Mar 25, p.780- 94. 2010.

SOLEAS, G.J; DIAMANDIS, E.P; GOLDBERG, D.M. resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? Clinical biochemistry., v.30, p.91-113, 1997.

SQUIRE LR, KANDEL ER. 2003. Memória: da mente às moléculas. Artmed: porto alegre/rs.

SQUIRE LR. 2004. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. Neurobiol learn mem 82: 171-177.

TANG, Y., M. MISHKIN, ET AL. Effects of muscarinic blockade in perirhinal cortex during visual recognition. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.23, Nov 11, p.12667-9. 1997.

TAVARES MV, RAMOS VN, TAVARES M, MOURA P. Vaccines and pregnancy. Acta med port 2011; 24suppl 41063–1068

TIZARD, I. R. Imunologia veterinária: uma introdução. 8 ed. São paulo: roca, 2008, 532 p.

TORREY EF, RAWLINGS RR, ENNIS JM, MERRILL DD, FLORES DS. Birth seasonality in bipolar disorder, schizophrenia, schizoaffective disorder and stillbirths. schizophr res. 1996;21(3):141-9.

TURCHI, J., R. C. SAUNDERS, et al. Effects of cholinergic deafferentation of the rhinal cortex on visual recognition memory in monkeys. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.6, Feb 8, p.2158-61. 2005.

TREIT D, MENARD J, ROYAN C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze, pharmacol. Biochem. Behav. 1993; 44: 463-469.

UNSWORTH N, ENGLE RW. 2007. On the division of short-term and working memory: an examination of simples and complex span and their relation to higher order abilities. Psychol bull 133: 1038-1066.

URAKUBO A, JARSKOG LF, LIEBERMAN JA, GILMORE JH (2001). Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. Schizophr res 47:27–36.

VAN GAALEN MM, STECKLER T. Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. Behav Brain Res. 2000 Oct;115(1):95-106.

VEIGA-JUNIOR VF, MELLOJCP 2008. As monografias sobre plantas medicinais. *Rev bras farmacogn* 18: 464-471.

XIE, WEIGUO et al. Resveratrol ameliorates prenatal progestin exposure-induced autism-like behavior through ER β activation. *Molecular Autism*, [s.l.], v. 9, n. 1, p.9-43, 2 ago. 2018.

WEINSTOCK M. Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behaviour. *Neurochem res.* 2007; 32:1730–40.

WINTERS, B. D. E T. J. BUSSEY. Removal of cholinergic input to perirhinal cortex disrupts object recognition but not spatial working memory in the rat. *Eur J Neurosci*, v.21, n.8, Apr, p.2263-70. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Human infection with new influenza A (H1N1) virus: clinical observations from Mexico and other affected countries, May 2009. *Wkly epidemiol rec.* 2009 May 22;84(21):185-9. (b)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Human infection with pandemic A (H1N1) 2009 influenza virus: clinical observations in hospitalized patients, Americas, July 2009 - update. *Wkly epidemiol rec.* 2009 Jul 24;84(30):305-8. (a)

YEE N, RIBIC A, DE ROO CC, FUCHS E. Differential effects of maternal immune activation and juvenile stress on anxiety-like behaviour and physiology in adult rats: no evidence for the "double-hit hypothesis". *Behav brain res.* 2011; 10;224(1):180-8.

YOUNG, L. J. The neurobiology of social recognition, approach, and avoidance. *Bio Psychiatry*, v. 51, p. 18-26, 2002.

ZERBO O, IOSIF AM, DELWICHE L, WALKER C, HERTZ-PICCIOTTO I. Month of conception and risk of autism. *Epidemiology.* 2011;22(4):469-75