

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Influência do desafio imunogênico em camundongos por vacina influenza A (H1N1) durante
a gestação sobre comportamentos relacionados à memória e sociabilidade
na prole em idade adulta

Ana Flávia Fernandes Ferreira

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG

Julho – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Influência do desafio imunogênico em camundongos por vacina influenza A (H1N1) durante
a gestação sobre comportamentos relacionados à memória e sociabilidade
na prole em idade adulta

Ana Flávia Fernandes Ferreira

Orientadora: Profa. Dra. Erika Renata Barbosa Neiro

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG

Julho – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Influência do desafio imunogênico em camundongos por vacina influenza A (H1N1) durante
a gestação sobre comportamentos relacionados à memória e sociabilidade
na prole em idade adulta

Ana Flávia Fernandes Ferreira

Orientadora: Profa. Dra. Erika Renata Barbosa Neiro
Instituto de Ciências Biomédicas/Departamento de Fisiologia

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em __/__/__.

Celine de Melo

Uberlândia – MG

Julho – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Influência do desafio imunogênico em camundongos por vacina influenza A (H1N1) durante
a gestação sobre comportamentos relacionados à memória e sociabilidade
na prole em idade adulta

Ana Flávia Fernandes Ferreira

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, por ter me fornecido várias oportunidades dentro do âmbito universitário, com atividades nos pilares de ensino, pesquisa e extensão, contribuindo para meu crescimento profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de MG (FAPEMIG), pelo apoio e incentivo à pesquisa por meio do programa de Iniciação Científica.

À minha orientadora Erika Renata Barbosa Neiro, exemplo de pesquisadora e professora, por toda dedicação, aprendizado e amparo proporcionados durante toda minha trajetória acadêmica.

Aos colaboradores Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini e Frederico Rogério Ferreira, sem os quais não seria possível a conclusão desse trabalho.

Aos meus pais, Luzmar de Ávila Fernandes e Márcio Alexandre Ferreira, meu irmão Gabriel Fernandes Ferreira e meu namorado Rodolfo Otávio dos Santos, os quais me incentivaram e apoiaram sempre.

RESUMO

Desordens neuropsiquiátricas estão entre as doenças que mais afetam a população mundial. Estudos demonstram a influência de fatores genéticos e ambientais no desencadeamento dessas desordens. Destaca-se, dentro dos aspectos ambientais, o estresse pré-natal por agentes infecciosos, responsável pela ativação do sistema imunológico e produção de citocinas, moléculas capazes de atravessar a barreira placentária e alcançar o feto, podendo prejudicar seu neurodesenvolvimento. A vacinação tem sido uma ferramenta importante contra epidemias, sendo recomendada para gestantes. Visto que a vacinação também altera os níveis de citocinas pró-inflamatórias, é importante investigar melhor o efeito dessa prática na prole dessas gestantes. Logo, esse trabalho busca avaliar o efeito da vacinação no comportamento relacionado à memória e sociabilidade da prole adulta e investigar se o período em que a infecção ocorre influencia nessas alterações. Para isso, camundongos da linhagem Balb C prenhas receberam injeções de vacina influenza A (H1N1) ou salina, no sexto (E6) ou décimo sexto (E16) dia de gestação. A prole adulta passou pelos testes de Interação Social (IS), que avalia a sociabilidade e a preferência por novidade social, e Reconhecimento de Objeto (RO), que avalia o aprendizado e a memória. Os resultados para RO mostraram alterações no aprendizado e memória da prole cujas matrizes foram tratadas com vacina influenza A (H1N1) em E16, mas não em E6, indicando que o período da exposição ao agente infeccioso influencia nas modificações encontradas para a memória. Para IS os grupos controles não apresentaram o comportamento esperado para animais normais, indicando possível falha no método utilizado.

Palavras chave: Vacina influenza A (H1N1). Ativação imunológica maternal. Memória e sociabilidade.

ABSTRACT

Neuropsychiatric disorders are among the diseases that most affect world population. Studies demonstrate the influence of genetic and environmental factors in triggering these disorders. An important environmental aspect is prenatal stress due to infectious agents, which leads to activation of the immune system and production of cytokines, molecules capable of crossing placental barrier and reaching fetus, what may impair its neurodevelopment. Vaccination has been an important tool against epidemics, being recommended during pregnancy. Since vaccination also alters levels of proinflammatory cytokines, it is important to investigate the effect of this practice on offspring of pregnant women. Therefore, this work aims to evaluate the effect of vaccination on behavior related to memory and sociability of adult offspring and to investigate if the period of infection plays a role in these changes. For this, Balb C pregnant mice received injections of influenza A (H1N1) or saline vaccine on sixth (E6) or sixteenth (E16) day of gestation. Adult offspring was submitted in Social Interaction Task (SI), which evaluates sociability and preference for social novelty, and Object Recognition Task (OR), which evaluates learning and memory. Results for OR showed changes in learning and memory of offspring whose mothers were treated with influenza A (H1N1) vaccine at E16, but not at E6, indicating that the time of maternal immune challenge determines the patterns of behavioral abnormalities displayed by the offspring at adult age. For SI, control groups did not exhibit expected behavior for normal animals, indicating a possible failure in the method.

Key words: Influenza A (H1N1) vaccine. Immunological maternal activation. Memory and sociability.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1 Animais	12
2.2 Delineamento experimental	12
2.3 Testes comportamentais	13
<i>2.3.1 Reconhecimento de Objeto (RO)</i>	14
<i>2.3.2 Interação Social (IS)</i>	15
2.4 Eutanásia e remoção de encéfalos	18
2.5 Análise estatística	18
3 RESULTADOS	19
3.1 Teste de Reconhecimento de Objeto	19
3.2 Teste de Interação Social	20
<i>3.2.1 Parte I: Sociabilidade</i>	20
<i>3.2.2 Parte II: Preferência por novidade social</i>	21
4 DISCUSSÃO	22
5 CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ANEXO 1	35

LISTA ABREVIATURAS

E0 – dia zero da gestação

E16 – decimo sexto dia gestacional

E6 – sexto dia gestacional

IL – interleucina

INF – interferon

IS – Teste de Interação Social

LPS – lipopolisacarídeos

MHCI – complexo principal de histocompatibilidade tipo I

P60 – sessenta dias de idade

PBS – tampão fosfato salina

RNA – ácido ribonucleico

RO – Teste de Reconhecimento de Objeto

TDAH – transtorno de déficit de atenção/hiperatividade

TNF – fator de necrose tumoral

1 INTRODUÇÃO

Registros mostram que os transtornos mentais estão presentes na sociedade desde a antiguidade, quando eram considerados sinais de profetas ou castigos divinos. Os doentes eram tidos como loucos e, por isso, marginalizados. Ainda no Iluminismo, onde as explicações sobrenaturais foram substituídas pela racionalidade, os doentes continuaram sendo excluídos pela sociedade. Com o avanço da ciência foi possível compreender que havia uma razão psicopatológica por trás dos sintomas apresentados, e que esses se tratavam de manifestações de doenças, porém muito ainda precisava ser elucidado (SPADINI; SOUZA, 2006). Em 1952, profissionais na área da saúde mental estabeleceram critérios para classificação e diagnóstico dos transtornos mentais e criaram o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM), porém os distúrbios ainda não têm sua etiologia totalmente esclarecida (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION - APS, 2013).

De acordo com o DSM-5, transtorno mental ou desordem neuropsiquiátrica é uma síndrome caracterizada por alterações na cognição, nas emoções ou no comportamento de um indivíduo devido às modificações psicológicas, biológicas ou de desenvolvimento. Nesse sentido, se enquadram: transtorno do espectro autista, transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH), esquizofrenia, transtorno bipolar, transtorno depressivo, transtorno de ansiedade, transtorno obsessivo compulsivo, transtornos relacionados a trauma e a estressores, entre outros (APS, 2013).

As desordens neuropsiquiátricas estão entre as doenças que mais afetam a população mundial. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a depressão é a principal causa de incapacidade no mundo, com cerca de 322 milhões de afetados, sendo as mulheres mais acometidas que os homens. O total de pessoas vivendo com ansiedade é em torno de 264 milhões. O número de casos de transtorno bipolar é de aproximadamente 60 milhões de pessoas. Por volta de 21 milhões de indivíduos são afetados por esquizofrenia, dos

quais 12 milhões são homens e 9 milhões são mulheres (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS, 2017).

No Brasil, segundo relatório da OMS divulgado em 2017, 5,8% da população sofre com depressão, fato que o coloca com o segundo país com maior prevalência da doença nas Américas e o primeiro na América Latina. Com relação à ansiedade, o Brasil apresenta prevalência de 9,3%, a maior em toda América. Todos esses dados evidenciam a necessidade de se compreender melhor sobre os transtornos neuropsiquiátricos, principalmente suas causas, possibilitando novas abordagens de tratamento (OMS, 2017).

A influência genética nos distúrbios neuropsiquiátricos foi mostrada em diversos estudos. Resultados do Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium evidenciaram uma alta taxa de herdabilidade para a esquizofrenia, o transtorno bipolar, o TDAH, o transtorno depressivo e o transtorno do espectro autista. O mesmo grupo encontrou uma sobreposição genética entre essas doenças (CROSS-DISORDER GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM, 2013). Outros estudos realizados na Suécia avaliaram o histórico familiar de doentes com transtornos psiquiátricos e concluíram que há uma maior incidência de casos entre gêmeos e entre indivíduos com pais portadores de doenças mentais (LI; SUNDQUIST, J.; SUNDQUIST, K., 2007; LI et al., 2009).

Diversos polimorfismos foram identificados em genes de indivíduos com transtornos neuropsiquiátricos. Mutações em cinco regiões cromossômicas foram encontradas em pacientes com desordem bipolar, sendo duas dessas nunca antes descritas (MÜHLEISEN et al., 2013). Foram identificados dois *loci* no cromossomo 10 que contribuem para o risco de depressão (CONVERGE CONSORTIUM, 2015), 108 *loci* associados a esquizofrenia (SCHIZOPHRENIA WORKING GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS

CONSORTIUM, 2014) e uma variação no gene neurexin-1 relacionada ao autismo e também à esquizofrenia (VOINESKOS et al., 2011).

Pesquisas nesse âmbito são constantemente exploradas, visto que a relação entre a genética e os distúrbios se mostra bem complexa, podendo mutações em um único gene ou em uma mesma região gênica estarem relacionadas a diversas desordens neuropsiquiátricas (ZHU et al., 2014). Apesar das inúmeras evidências da presença de um fator genético envolvido, não se pode ignorar o fator ambiental, que sem dúvidas tem relação com o surgimento ou agravamento das doenças.

Diferentes influências do ambiente são fatores estressantes, como urbanização, migração, status social, abuso infantil e complicações no parto, podendo induzir transtornos mentais. Estresse é definido como o conjunto de reações que o indivíduo apresenta quando submetido a situações que exigem esforço adaptativo (SEYLE, 1959), sendo essas reações possivelmente responsáveis por alterações fisiológicas que podem desencadear doenças. Por exemplo, áreas mais urbanizadas são mais expostas a fatores de risco, como poluição, infecções e alimentação industrializada. Desse modo, indivíduos que vivem em áreas com maior taxa de urbanização possuem maior risco de desenvolverem esquizofrenia do que pessoas que vivem na área rural (PEDERSEN; MORTENSEN, 2001).

Uma maior incidência de doenças mentais entre imigrantes, que persiste inclusive na geração seguinte, pode estar relacionada a eventos ocorridos após a migração como a discriminação pelo fato de esse grupo representar uma minoria no novo local, além do estresse pela adaptação à nova cultura e ambiente (BOURQUE; VAN DER VEN; MALLA, 2011). Isso não se restringe aos imigrantes, outras minorias também são afetadas pela discriminação e exclusão social, resultando em um sentimento de inferioridade, fatores que aumentam sintomas de psicoses (VAN OS; KENIS; RUTTEN, 2010).

Eventos estressantes nas fases iniciais da vida, como o abuso emocional infantil, estão associados com o aumento de transtornos depressivos na idade adulta. Adultos que sofreram abuso infantil desenvolvem uma imagem negativa de si próprios e estão em constante estado de defesa, com isso, eventos estressantes cotidianos da vida adulta são interpretados de maneira negativa, podendo levar mais facilmente a depressão (SHAPERO et al., 2014). Outros traumas na infância, como abuso sexual e físico, negligência, *bullying* e perda dos pais, também estão associados com maior risco de aparecimento de doenças psiquiátricas (VARESE et al., 2012).

Episódios que ocorrem quando o feto ainda se encontra no útero materno, durante o parto ou no início do período neonatal também foram estudados e relacionados com os transtornos mentais. Dentre eles podem-se citar complicações obstétricas, como pré-eclâmpsia, sangramento, asfixia e redução da circunferência craniana do feto (SCHMITT et al., 2014). Eventos estressantes vivenciados pela mãe durante a gravidez, como fome, desastres naturais e guerras, luto, gravidez indesejada e infecções também estão relacionados (MARKHAM; KOENING, 2011; SPAUWEN et al., 2004; SUSSER; LIN, 1992).

Estudos que indicam a infecção maternal como causa das doenças neuropsiquiátricas são recentes. As primeiras evidências mostram casos de anormalidades nas funções do sistema nervoso central encontradas em fetos de mães que contraíram rubéola durante uma grande epidemia ocorrida em 1964 (SOUTH; SEVER, 1985). Outra pesquisa que foi importante para o estabelecimento dessa teoria encontrou uma tendência maior de casos de esquizofrenia em indivíduos que nasceram na estação do inverno (BRADBURY; MILLER, 1985), o que pode ser explicado pela maior incidência de infecções nessa estação do ano (BROWN; SUSSER, 2002).

Desde então diversos estudos apontaram ligações entre casos de infecções maternas por diferentes agentes patológicos e o desenvolvimento de doenças mentais. Mednick e colaboradores (1988) encontraram um aumento do número de diagnósticos de esquizofrenia dentre indivíduos que estavam em seu segundo trimestre de desenvolvimento fetal durante a epidemia de influenza A2 em 1957. Os transtornos do espectro autista também foram relacionados a hospitalizações por infecções bacterianas durante o segundo trimestre e por infecções virais durante o primeiro trimestre da gravidez (ATLADÓTTIR et al., 2010).

Uma diversidade de doenças, como sarampo, gripe, herpes, poliomielite, toxoplasmose, infecções genitais e reprodutivas (REISINGER et al., 2015), causadas por diferentes patógenos (vírus, bactérias e protozoários), levam ao aumento do risco de desenvolvimento de várias doenças neuropsiquiátricas. O fato de diferentes agentes patogênicos estarem relacionados às desordens mentais indica que deve existir um fator comum entre eles. Para se compreender essa semelhança entre os diferentes agentes infecciosos é preciso entender alguns dos processos que ocorrem durante o período gestacional e as alterações provocadas pelos patógenos no desenvolvimento fetal (ESTES; MCALLISTER, 2016).

A formação do sistema neural se inicia com eventos complexos e delicados durante o desenvolvimento do embrião. Esse processo começa, mais precisamente, no fim da gastrulação, com a geração da neuroectoderme e posterior formação da placa neural, que precede o tubo neural, o qual se prolifera e se remodela para formar o sistema nervoso central. Alguns dos principais eventos do neurodesenvolvimento são: neurogênese, migração neuronal, estabelecimento de sinapses, diferenciação celular e mielinização (MARKHAM; KOENING, 2011; SALIHAGIC-KADIC et al., 2005).

A neurogênese começa durante a embriogênese, na quarta semana após a concepção, tem seu período de maior intensidade no início do período fetal, entre oitava e decima segunda semana, e termina por volta da vigésima semana. A migração tem seu período de maior atividade no segundo trimestre da gestação. A formação das sinapses se inicia entre a sexta e oitava semana, mas termina apenas quando o indivíduo já está na puberdade. Processos de diferenciação celular e mielinização ocorrem principalmente no terceiro trimestre e no período pós-natal. É importante destacar que o crescimento e amadurecimento do sistema nervoso perdura por todos os períodos da gestação, sendo que alguns só cessam na idade adulta (SALIHAGIC-KADIC et al., 2005).

Todo o desenvolvimento gestacional é protegido por um órgão fundamental, a placenta, que representa a ligação entre a mãe e o feto. Essa estrutura é necessária para suprir as necessidades do bebê em seus primeiros meses de vida, sendo responsável pela troca gasosa, nutrição, defesa e produção de hormônios. A placenta forma uma barreira regulando a entrada e saída de substâncias entre o ambiente materno e o fetal. Entretanto, a seletividade da barreira apresenta falhas, possibilitando a passagem de drogas e agentes patogênicos, o que pode levar a alterações no desenvolvimento fetal (DÍAZ-LUJÁN et al, 2016; GOASDOUÉ et al., 2016; GRIFFITHS; CAMPBELL, 2015).

A complexidade dos processos que permeiam a neurontogenia faz com que haja a necessidade de um ambiente intrauterino adequado, garantindo as condições ideais para o desenvolvimento fetal. Influências do ambiente externo, como a infecção maternal, podem promover consequências danosas que refletem no funcionamento adequado do sistema neural (SALIHAGIC-KADIC et al., 2005). Por exemplo, pesquisadores encontraram alterações na memória de curto prazo de mulheres adultas, cujas mães passaram por estresse pré-natal

(ENTRINGER et al., 2009), assim como no comprimento do septo pelúcido, área cerebral que também se mostra alterada em indivíduos esquizofrênicos (BROWN et al., 2009).

Além das alterações comportamentais e anatômicas, diversos estudos constataram modificações na resposta imunológica. Dentre esses destacam-se o aumento dos níveis de citocinas inflamatórias, interleucinas (como IL-4, IL-5 e IL-10), fatores de necrose tumoral (como TNF- α e TNF- β) e interferons (como IFN- γ), quando analisado o fluido amniótico de mães com doenças autoimunes e/ou que passaram por infecções durante a gravidez e tiveram filhos com doenças do espectro autista (ABDALLAH et al., 2013; GOINES et al., 2011). A alta expressão de IL-6, TNF, IL-8 e proteína C reativa durante a gravidez foi associada ao risco de esquizofrenia na prole (BUKA et al., 2001; CANETTA et al., 2014). Outros pesquisadores injetaram citocinas inflamatórias, como por exemplo IL-6, IL-1 β , IFN- γ e TNF- α , em modelos animais e concluíram que a administração das citocinas foi suficiente para provocar alterações comportamentais e patológicas na prole (MEYER et al., 2014).

Esse desequilíbrio nos níveis de citocinas pode afetar o desenvolvimento fetal e prejudicar as funções cerebrais, visto que regulam diversos processos fisiológicos, como o desenvolvimento, a plasticidade e as funções cerebrais (DEVERMAN; PATTERSON, 2009). Como exemplo, em níveis normais a IL-1 atua controlando a proliferação e diferenciação celular durante a formação da medula espinal em embriões (DE LA MANO et al., 2007) e também auxilia na formação de sinapses e na adesão celular (YOSHIDA et al., 2012), e o TNF modula a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência neuronal (BERNARDINO et al., 2008).

Além das citocinas, outras moléculas imunológicas são alteradas pela infecção maternal, como o complexo principal de histocompatibilidade tipo I (MHCI). O MHCI está presente nos neurônios e regula a formação, densidade e plasticidade de sinapses durante o

neurodesenvolvimento. Os níveis de MHCI se mostraram elevados na prole de mães que passaram por infecção maternal. Esse desequilíbrio foi relacionado com o decréscimo da densidade de sinapses glutamatérgicas observadas nos neurônios corticais da prole, o que pode ser crítico para o desenvolvimento das doenças neuropsiquiátricas (ELMER et al., 2013).

Todos os dados levantados até então indicam que as modificações comportamentais são atribuídas à resposta imunológica maternal, e não ao patógeno em si. Mas ainda assim, estudos permitem inferir que o tipo de resposta imunológica, o momento e a intensidade da infecção podem variar, interferindo no tipo de mudança comportamental e neuropatológica apresentada pelos adultos (MEYER et al., 2006; KNUESEL et al., 2014).

Pesquisas nesse âmbito são fundamentais, mas avaliações em humanos podem trazer certas controvérsias, visto que não é possível isolar as influências do meio externo para um resultado mais preciso, utilizar de métodos invasivos, nem acompanhar todo o processo gestacional. Assim, para realização desses estudos são utilizados modelos animais, os quais mimetizam uma doença conhecida, devem apresentar sintomas semelhantes aos vistos no ser humano e podem ser utilizados para verificação da eficácia de tratamentos (ESTES; MCALLISTER, 2016).

Os lipopolisacarídeos (LPS), moléculas encontradas na membrana de bactérias gram-negativas, e o vírus mimético poly I:C, molécula sintética que possui estrutura similar a um RNA de fita dupla, são capazes de desencadear uma potente resposta imunológica, sendo, portanto, utilizados em experimentações para causar o estresse maternal (MARKHAM; KOENIG, 2011). Resultados mostraram elevadas taxas de citocinas inflamatórias, redução do comportamento social e exploratório de ratos juvenis e adultos (OSKVIG et al., 2012), além do aumento de comportamento do tipo depressivo e ansioso quando utilizado LPS

(ENAYATI et al., 2012). Déficits na interação social e na memória de trabalho e atraso na mielinização do hipocampo foram observados em modelos animais de poly I:C (PATTERSON, 2009).

Outro modelo animal com o qual pesquisadores têm encontrado muitos resultados utiliza o vírus da influenza. Déficits na memória foram observados em camundongos infectados com influenza A em pesquisa realizada pela pesquisadora Linnéa Asp e colaboradores (2009). Shi e colaboradores (2003) também encontraram alterações no comportamento social e exploratório de camundongos. Encéfalos de camundongos infectados com influenza se mostraram alterados nas regiões do hipocampo e córtex cerebral (FATEMI et al, 1999). Estudo com macacos rhesus nascidos de mães infectadas com influenza revelou redução na substância cinzenta cortical e substância branca do córtex parietal (SHORT et al., 2010).

O vírus *Myxovirus influenzae*, conhecido como vírus influenza é formado por RNA e se divide em três subgrupos, A, B e C, sendo que apenas A e B tem relevância para humanos. O microrganismo apresenta alta variabilidade, principalmente o subtipo A, ou seja, novas variantes para as quais a população não possui imunidade surgem frequentemente (FORLEO-NETO et al, 2003). Segundo o informe epidemiológico do Ministério da Saúde, entre início de janeiro e fim de outubro de 2016, 21,7% das amostras processadas apresentaram resultado positivo para vírus respiratório, das quais 72,3% foram positivas para influenza, com destaque para influenza A (H1N1).

Devido à pandemia de influenza em 2009, na qual a Organização Mundial da Saúde decretou nível de alerta máximo (GIRARD et al., 2010), e a contínua circulação do vírus no mundo a vacinação tem se mostrado uma das medidas mais eficazes contra a doença (FORLEO-NETO et al, 2003). Desde 2004 a vacina contra influenza é recomendada para

mulheres grávidas, por representarem um grupo de risco, visto que hospitalizações relacionadas a doença são maiores em gestantes do que em mulheres não grávidas (SCHANZER; LANGLEY; TAM, 2007).

A vacina da influenza é trivalente, ou seja, tem em sua composição três cepas, duas do subtipo A e uma do subtipo B. Há também a vacina quadrivalente, que apresenta mais uma cepa do subtipo B. A cada ano são formuladas novas vacinas para garantir a proteção contra as novas cepas que entram em circulação no mundo. Os vírus são inativados e purificados para comporem a vacina. (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2016). Ainda assim, ocorre uma resposta imunológica a vacina, com alteração dos níveis de moléculas inflamatórias, como o aumento de proteínas C reativas, TNF- α , IL-6 e redução de IL-8 (CHRISTIAN et al., 2011, 2013).

Tendo em vista que alterações nos níveis de citocinas foram encontradas tanto no indivíduo que foi submetido à infecção pré-natal quanto no que foi vacinado, surgem hipóteses de que a vacinação também poderia estar relacionada ao risco de doenças psiquiátricas. Existem estudos controversos e inconsistentes, alguns sugerem que o risco existe, enquanto outros sugerem um efeito protetor da vacina (NUNES; MADHI, 2015). Xia e colaboradores (2014) propõem que o estado imunológico materno alterado pela vacinação tem um efeito neuroprotetor, contribuindo para neurogênese e para a melhoria de comportamentos cognitivos em camundongos. Entretanto, Zerbo e colaboradores (2016) sugerem um aumento no risco de doenças do espectro autista entre crianças cujas mães foram vacinadas contra influenza.

Diante da falta e da incerteza das informações encontradas, a hipótese de que a vacinação durante a gestação pode levar à prejuízos no desenvolvimento do sistema nervoso não pode ser descartada, pelo contrário, mais pesquisas precisam ser realizadas no intuito de

prevenir efeitos indesejados da vacinação. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivos investigar os efeitos do desafio imunogênico com a vacina influenza A (H1N1) no comportamento relacionado à memória e sociabilidade da prole adulta e avaliar se o período em que a infecção ocorre influencia nas alterações observadas em idade adulta.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Balb C (*Mus musculus*), fornecidos pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia. Camundongos são frequentemente escolhidos como modelos experimentais por apresentarem um período reprodutivo curto, uma prole numerosa, além de serem pequenos e de fácil manipulação (SANTOS, 2002). A utilização dos animais foi aprovada pelo protocolo experimental da Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU) número 164/13 (Anexo 1). Os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada ($23^{\circ} \pm 2^{\circ}$), com ciclo de luz 12h luz/ 12h escuro e com livre acesso a água e alimento.

2.2 Delineamento experimental

Machos e fêmeas adultos capacitados para reprodução foram separados em caixas de acrílico contendo duas fêmeas para cada macho. As matrizes foram acompanhadas diariamente para visualização do tampão ou plugue vaginal, estrutura formada por uma mistura de secreções vaginais e sêmen, que marca o dia zero da gestação (E0). As fêmeas prenhas foram separadas em cinco grupos, as quais receberam tratamentos específicos.

As fêmeas gestantes receberam injeções de vacina influenza A (H1N1) trivalente (15 mcg/cepa/0,5mL) na dose 1 μ L/g, ou salina na dose 5 μ L/g, 6 (E6) ou 16 (E16) dias, a depender do grupo, após a visualização do tampão vaginal. O uso de dois períodos gestacionais se deu devido a constatações de que o momento da infecção maternal pode influenciar nos padrões de comportamento da prole adulta, podendo ocorrer diferentes tipos

de alterações neuropsiquiátricas em função do período da infecção (MEYER et al., 2006). Um grupo de matrizes não recebeu nenhum tratamento, isso foi feito para avaliar se o estresse provocado pelo ato de injetar qualquer substância no animal poderia ser a causa dos resultados encontrados.

A gestação teve um período entre 19 e 21 dias e os filhotes foram desmamados quando completaram 21 dias de idade. Os filhotes do sexo feminino não foram utilizados devido à presença de flutuações hormonais relacionadas ao ciclo estral que poderiam levar a alterações comportamentais e inconfiabilidade dos dados obtidos (MEZIANE, 2006). Os machos da prole, quando atingiram sessenta dias de idade (P60), passaram por testes comportamentais.

Os grupos experimentais (cerca de dez filhotes machos por grupo, n=10) são descritos abaixo:

Grupo 1: machos de matrizes que não receberam tratamento (naïve).

Grupo 2: machos de matrizes que receberam injeção de salina PBS, dose única, em E6.

Grupo 3: machos de matrizes que receberam injeção de salina PBS, dose única, em E16.

Grupo 4: machos de matrizes que receberam injeção de vacina influenza A (H1N1), dose única, em E6.

Grupo 5: machos de matrizes que receberam injeção de vacina influenza A (H1N1), dose única, em E16.

2.3 Testes comportamentais

Os filhotes machos adultos em P60 passaram por dois testes comportamentais: interação social e reconhecimento de objeto. Os experimentos comportamentais foram realizados no Laboratório de Testes Comportamentais da ARFIS-UFU e filmados para posterior análise. Os testes comportamentais são detalhados abaixo:

2.3.1 Reconhecimento de Objeto (RO)

Quando o roedor é exposto a um objeto familiar e um objeto novo, o esperado é que ele passe mais tempo em contato com o objeto novo, indicando a presença de aprendizado e memória (ENNACEUR, 2010). Assim, o Reconhecimento de Objeto é um teste utilizado em roedores para avaliar sua memória e aprendizado, que se apresentam alterados em transtornos neuropsiquiátricos.

Uma caixa de plástico com 37 cm de comprimento, 33 cm de largura e 16 cm de altura, mostrada na Figura 1, foi utilizada. Uma linha foi traçada no meio do aparato, essa marcação foi necessária durante as análises dos testes gravados em vídeo. Dois cilindros brancos e um frasco de vidro de vacina foram combinados, dependendo da etapa do teste, e dispostos em duas das extremidades da caixa. É importante a utilização de objetos que sejam diferentes quanto a cor e formato, facilitando a distinção dos mesmo pelo animal.

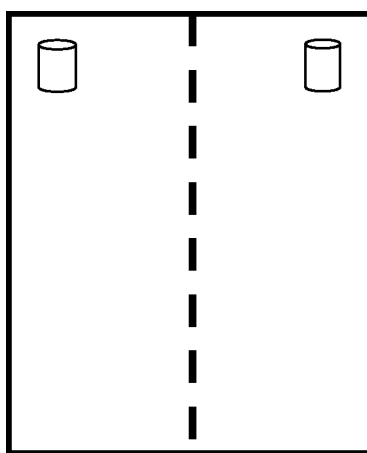


Figura 1 - Esquema do aparato utilizado no teste de Reconhecimento de Objeto.

Fonte: A autora (2017).

O teste consiste de duas etapas, na primeira etapa o camundongo experimental é colocado na caixa com dois objetos iguais (os cilindros) por 10 minutos. Na segunda fase, uma hora após a primeira, o animal é exposto a um objeto familiar, um daqueles utilizados na

etapa anterior, e um objeto novo (o frasco de vacina), nesse momento o camundongo explora o aparato por 5 minutos. Apenas a segunda etapa é gravada em vídeo e analisada. É importante salientar que é necessária uma ambientação 24 horas antes da realização do primeiro teste para que a inspeção do ambiente pelo animal não prejudique os resultados obtidos.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: porcentagem de tempo gasto em contato com objeto familiar, porcentagem de tempo gasto em contato com o objeto novo, latência (tempo decorrido para o primeiro contato com um dos objetos), número de contatos com o objeto familiar, número de contatos com o objeto novo, número de *rearing* (levantamento - apoio do animal sobre as patas traseiras e deslocamento do corpo e das patas dianteiras para cima) e número de vezes que o animal atravessa a linha que divide o aparato. Foi considerado interação o direcionamento da face do animal ao objeto até uma distância aproximada de 2 cm enquanto o observa, cheira ou toca.

Os animais experimentais foram manuseados por pelo menos um minuto nos três dias que antecederam os testes, a fim de minimizar o estresse que a manipulação do experimentador poderia causar. Além disso, os camundongos foram levados à sala de testes com pelo menos 30 minutos de antecedência para se ambientarem. A cada animal experimental o aparato foi limpo com álcool 20% para eliminação de odores, urina e fezes. Todo o teste foi gravado em vídeo para posterior análise, assim o experimentador não ficou na sala durante o teste.

2.3.2 *Interação Social (IS)*

Algumas doenças neuropsiquiátricas como esquizofrenia, autismo, desordem bipolar e desordem obsessivo-compulsiva estão relacionadas a distúrbios no comportamento social

(KAIDANOVICH-BEILIN et al., 2011). Os roedores são animais muito sociáveis e exibem comportamentos que podem ser quantificados (WILSON; KOENIG, 2015), sendo o teste de Interação Social utilizado como modelo experimental para avaliar algumas alterações comportamentais em animais relacionadas a desordens psiquiátricas características de humanos.

Para realização do teste foi utilizada uma caixa de vidro com 45 cm de largura, 45 cm de comprimento e 36 cm de altura. O aparato é dividido em três compartimentos, A, B e C, conforme mostra a Figura 2, sendo que existem comportas removíveis que possibilitam a livre circulação do animal entre os três compartimentos durante parte do experimento. Além do animal que será submetido ao teste, outros dois animais coespecíficos, machos e com idade próxima a P60, e um camundongo de brinquedo são necessários. Há um recipiente de plástico com furos colocado em A e um em C, de modo a armazenar o objeto e os animais coespecíficos que serão utilizados.

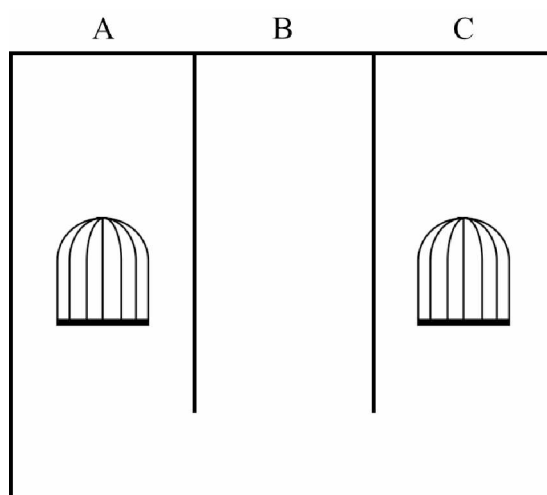


Figura 2 - Esquema do aparato utilizado no teste de Interação Social
Fonte: A autora (2017).

O teste consiste de duas etapas, sendo que a primeira avalia a sociabilidade, tendência do animal interagir mais com o animal coespecífico do que com o inanimado, e a segunda etapa avalia a preferência por novidade social, tendência do animal interagir mais com o

animal desconhecido do que com o animal familiar da etapa anterior. Na primeira etapa, um animal coespecífico é colocado dentro do recipiente do compartimento A e o camundongo de brinquedo é colocado no recipiente do compartimento C. Em um primeiro momento o animal experimental é posicionado no compartimento B com as comportas fechadas e tem 5 minutos para se ambientar. Após esse período, as comportas são retiradas e o camundongo teste tem 10 minutos para explorar o aparato. Na segunda etapa, o animal de brinquedo é retirado do recipiente do compartimento C e o outro animal coespecífico é colocado em seu lugar. Os momentos de ambientação, com as comportas fechadas por 5 minutos, e exploração, com as comportas abertas por 10 minutos, são repetidos.

Durante a análise dos vídeos, foram avaliados os seguintes parâmetros para cada etapa do teste: tempo gasto em cada compartimento, número de entradas em cada compartimento, número de entradas entre compartimentos, porcentagem de tempo gasto interagindo com o animal do compartimento A, porcentagem tempo gasto interagindo com o animal de brinquedo ou com o animal do compartimento C, quantidade de *sniffing* (cheirar ativamente o ambiente), quantidade de *nose-to-nose* (contato nariz com nariz), quantidade de *nose-to-anogenital sniffing* (cheirar a genitália e ânus).

Os animais experimentais foram manuseados por pelo menos um minuto nos três dias que antecederam os testes, a fim de minimizar o estresse que a manipulação do experimentador poderia causar. Além disso, os camundongos foram levados à sala de testes com pelo menos 30 minutos de antecedência para se ambientarem. A cada animal experimental o aparato foi limpo com álcool 20% para eliminação de odores, urina e fezes. Todo o teste foi gravado em vídeo para posterior análise, assim o experimentador não fica na sala durante o teste.

2.4 Eutanásia e remoção dos encéfalos

Uma semana após finalização de cada teste comportamental os animais foram sacrificados, de acordo com o código de ética animal, utilizando anestesia com quetamina 80mg/Kg e xilazina 10mg/Kg e deslocamento cervical para retirada das áreas cerebrais possivelmente relacionadas com as alterações comportamentais, como o córtex pré-frontal e o hipocampo. O material retirado foi armazenado a -70°C e enviado para FIOCRUZ/RJ, onde serão realizadas análises bioquímicas e imuno-histológicas para detecção de citocinas pró-inflamatórias. Os machos utilizados para acasalamento e as fêmeas, também foram sacrificados, evitando o prolongamento desnecessário de suas vidas.

2.5 Análise estatística

Os comportamentos foram analisados e os dados obtidos submetidos a análise estatística por Two-Way ANOVA, com valores de $p \leq 0,05$ considerados significativos. No teste de Interação Social foram considerados como fator novidade o animal coespecífico (animal coespecífico x animal inanimado), para primeira etapa do teste, e o camundongo não familiar (camundongo não familiar x camundongo familiar), para segunda etapa do teste. Para o teste de Reconhecimento de Objeto o objeto novo (objeto novo x objeto antigo) foi o fator novidade. Além disso, também foi considerado o fator tratamento que varia segundo o grupo. Quando significativo a análise foi seguida pelo teste post hoc Bonferroni, para identificar em quais grupos a diferença foi encontrada. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

3 RESULTADOS

3.1 Teste de Reconhecimento de Objeto

A figura 3 ilustra os tempos de interação de camundongos com objeto familiar e com o objeto novo. Os animais dos grupos controle naíve, salina E6 e salina E16 interagiram significativamente mais com o objeto novo ($63,07 \pm 12,05$; $52,78 \pm 8,87$; $36,29 \pm 6,94$; respectivamente) quando comparado com o objeto familiar ($30,57 \pm 3,15$; $19 \pm 2,06$; $19,53 \pm 3,69$; respectivamente). O mesmo aconteceu para o grupo H1N1 E6 (objeto novo: $40 \pm 8,83$; objeto familiar: $19,31 \pm 3,14$).

Em relação ao grupo H1N1 E16 a diferença não foi significativa, ou seja, os camundongos passaram tempos similares em contato com o objeto novo ($37,9 \pm 6,23$) e com o objeto familiar ($26,8 \pm 6,99$).

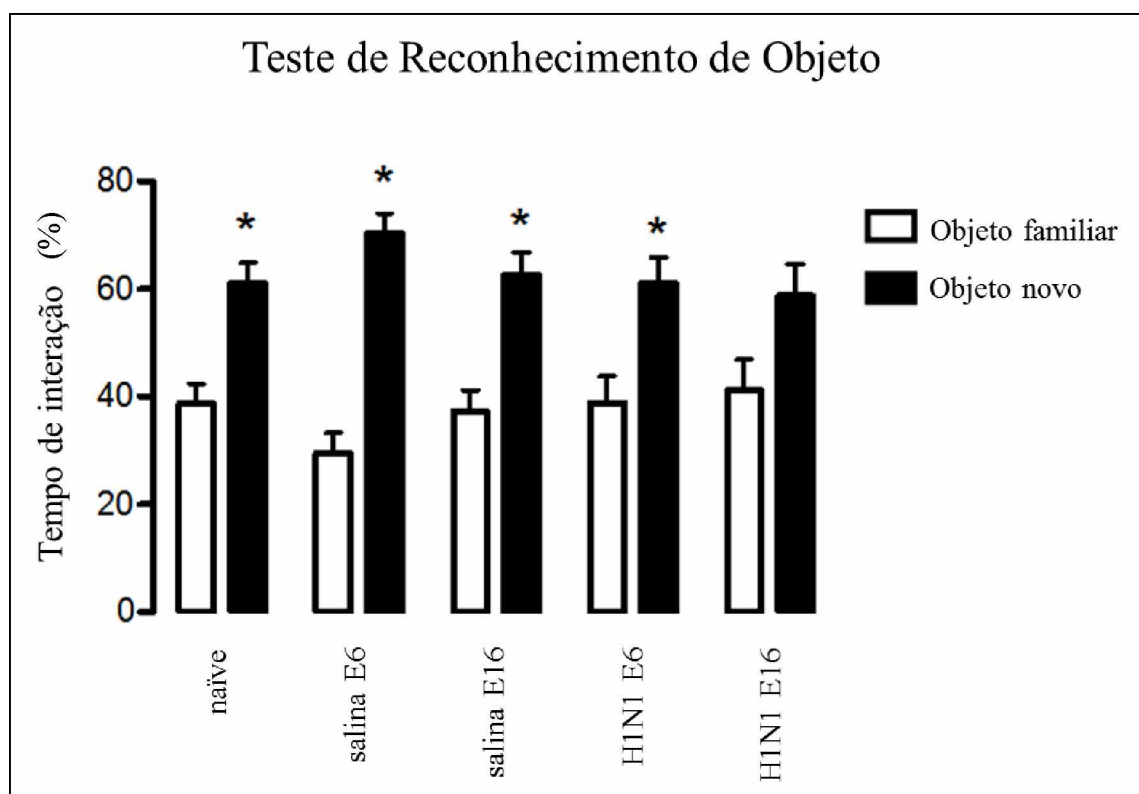


Figura 3 - Tempo de interação em segundos dos animais dos cinco grupos experimentais no Teste de Reconhecimento de Objeto. * diferença significativa menor ou igual à 0,05 entre tempo de interação com objeto familiar e com objeto novo nos grupos naíve, salina E6, salina E16 e H1N1 E6. Os resultados foram expressos na forma de média ± EPM.

3.2 Teste de Interação Social

3.2.1 Parte I: Sociabilidade

Os resultados, representados na figura 4, indicam que os animais do grupo naïve apresentaram diferença significativa quando comparado o tempo de interação com o camundongo de brinquedo ($107 \pm 11,86$) e com o camundongo não familiar ($97,54 \pm 18,24$), passando mais tempo com o brinquedo.

Os grupos salina E6, salina E16 e H1N1 E6 não tiveram resultados significativos tendo permanecido o mesmo tempo interagindo com o animal de brinquedo ($76,28 \pm 9,48$; $90 \pm 11,57$; $126,67 \pm 20,82$, respectivamente) e com o animal não familiar ($126,28 \pm 17,08$; $106,35 \pm 13,13$; $106,33 \pm 20,76$, respectivamente).

Em relação ao grupo H1N1 E16, os animais passaram um tempo maior interagindo com o camundongo não familiar ($216,5 \pm 54,42$) quando comparado a sua interação com o animal de brinquedo ($82,3 \pm 16,16$).

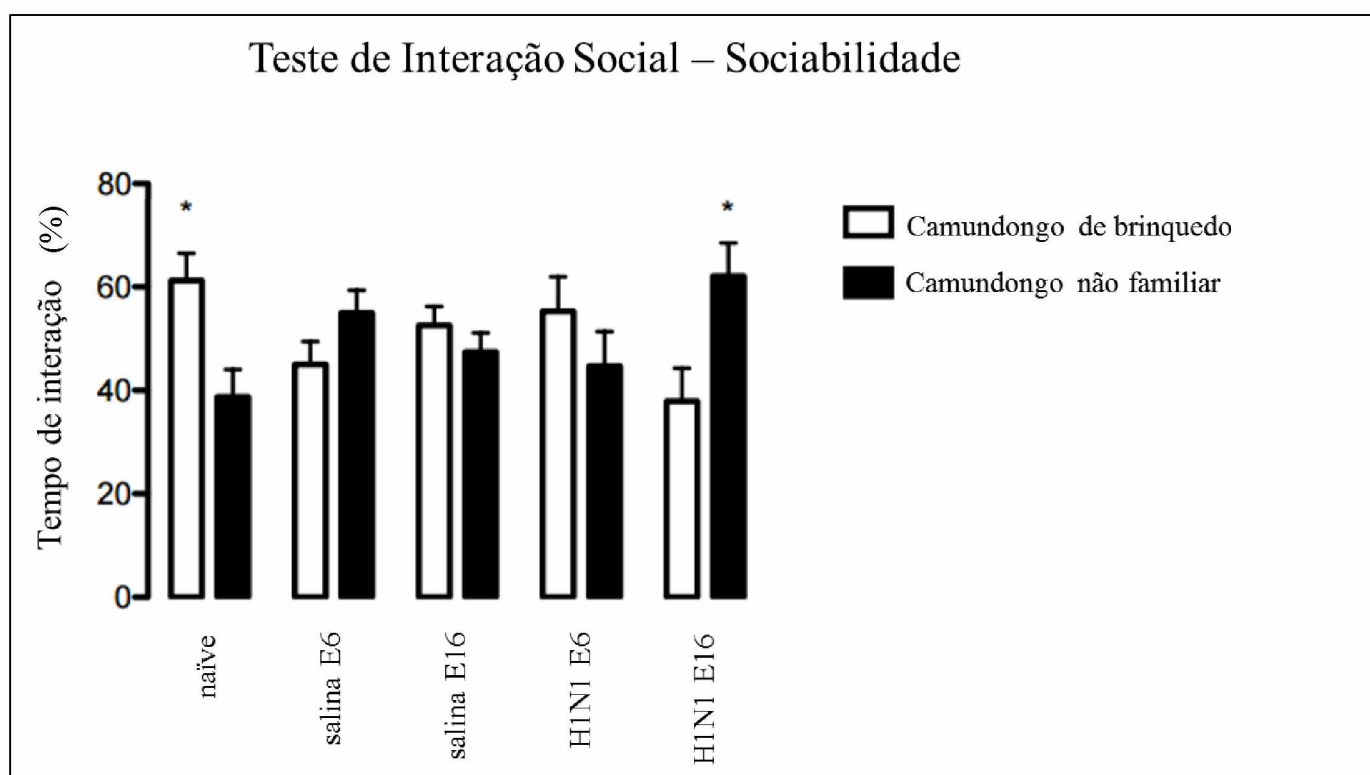


Figura 4 - Tempo de interação em segundos dos animais dos cinco grupos experimentais na primeira parte do Teste de Interação Social. * diferença significativa menor ou igual à 0,05 entre tempo de interação com camundongo de brinquedo e com camundongo não familiar nos grupos naïve e H1N1 E16. Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ EPM.

3.2.2 Parte II: Preferência por novidade social

Na preferência por novidade social (Figura 5), os animais dos grupos naíve e salina E6 apresentaram um tempo de exploração similar com o camundongo familiar e com o não familiar (familiar: $116,67 \pm 22,59$; $66,46 \pm 20,21$; não familiar: $123,5 \pm 24,88$; $103,15 \pm 17,55$; nessa ordem).

Os animais dos grupos salina E16 e H1N1 E6 interagiram significativamente mais com o camundongo não familiar ($105,12 \pm 24,55$; $142,27 \pm 30,10$, respectivamente) do que com o familiar ($55,41 \pm 14,41$; $82,09 \pm 12,81$, respectivamente). Da mesma forma, os animais do grupo H1N1 E16, apesar de resultados não significativos, apresentaram uma tendência a interagirem mais com o animal não familiar ($135,8 \pm 22,56$) do que com o familiar ($73,5 \pm 16,17$).

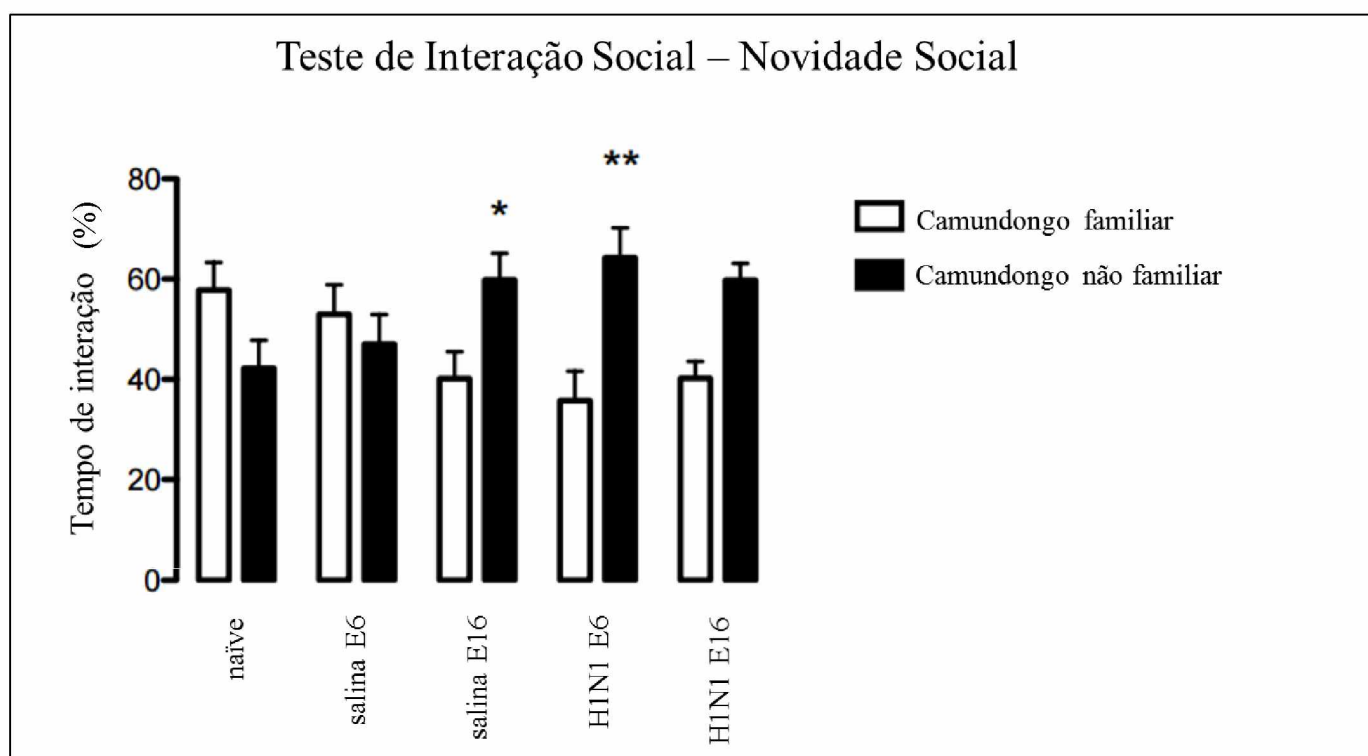


Figura 5 - Tempo de interação em segundos dos animais dos cinco grupos experimentais na segunda parte do Teste de Interação Social. * diferença significativa menor ou igual à 0,05 entre tempo de interação com camundongo familiar e com camundongo não familiar no grupo salina E16. ** diferença significativa menor ou igual à 0,01 entre tempo de interação com camundongo familiar e não familiar no grupo H1N1 E6. Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ EPM.

4 DISCUSSÃO

Com relação ao teste de Reconhecimento de Objeto, os animais dos grupos naïve, salina E6 e salina E16 passaram maior período de tempo em interação com o objeto novo quando comparado com o objeto familiar. Essa tendência de passar mais tempo explorando um objeto novo é algo natural nos roedores, sendo, portanto, observada em animais normais. A preferência por novidade indica que o roedor tem a memória do objeto familiar e com isso consegue distingui-lo do objeto novo (ENNACEUR; DELACOUR, 1988; ENNACEUR, 2010). Assim, os grupos controle apresentaram comportamento esperado, o que valida o teste utilizado.

Os resultados para o grupo H1N1 E6 mostraram que o aprendizado e a memória dos camundongos não foram alterados, pois o tempo de contato com o objeto novo foi maior do que com o objeto familiar, o que é esperado para roedores. Com isso, tem-se que o tratamento com a vacina no sexto dia de gestação não alterou a memória dos animais. Estudos que também fizeram a ativação imune maternal em períodos iniciais da gestação obtiveram resultados similares. Fatemi et al. (2012) realizaram estresse maternal com o vírus influenza em E7 e concluíram que a administração do patógeno nesse período gestacional causa um menor impacto na morfologia cerebral quando comparado com injeções em E16 e E18. Já Xia et al. (2014) não encontraram nenhum prejuízo na memória quando utilizado E2,5 como dia de infecção.

Em relação ao grupo H1N1 E16, os animais interagiram tempos similares tanto com o objeto familiar quanto com o objeto novo, ou seja, o roedor não recordou seu contato anterior com o objeto familiar, possivelmente devido ao prejuízo de sua memória, e assim interagiu com os dois objetos igualmente. Outros trabalhos também demonstraram uma associação entre a infecção imune maternal por diferentes patógenos, como o poly I:C e a bactéria *Escherichia*

coli, e déficits no aprendizado e memória de animais cujas mães foram expostas em períodos semelhantes ao utilizado no presente estudo, variando do décimo quinto ao décimo sétimo dia de gestação. Essas pesquisas utilizaram diversos testes comportamentais, como labirinto em Y, labirinto aquático de Morris e reconhecimento de objeto, corroborando os resultados do presente trabalho (GIOVANOLI et al., 2015; JIANG et al., 2013; MEYER et al., 2009; OZAWA et al., 2006).

Com os resultados obtidos foi possível evidenciar que a prole dos animais tratados com vacina influenza A (H1N1) teve alteração no aprendizado e memória apenas quando o desafio imunológico ocorreu em E16, indicando que o período da exposição ao agente infeccioso influencia nas modificações encontradas. Meyer et al. (2006) tratou camundongos com poly I:C no nono e décimo sétimo dia de gestação e observou diferenças comportamentais e patológicas, com expressões gênicas e níveis de citocinas distintos, quando comparado os dois tratamentos. De fato, o tempo de gestação parece estar relacionado com o tipo e a gravidade das patologias que surgem em idade adulta. Além disso, o desafio imunológico nas fases finais da gestação parece estar relacionado com o maior número de alterações cerebrais na prole, sendo essas também mais severas do que as associadas às fases iniciais da gestação (FATEMI et al., 2012; GIOVANOLI et al., 2015).

Ao compreender o desenvolvimento embrionário do camundongo é possível sugerir hipóteses que expliquem porque os indivíduos cujas matrizes foram infectadas no início da gestação mostram nenhuma ou poucas alterações comportamentais enquanto aqueles que tiveram seu neurodesenvolvimento afetado no final da gestação apresentam mais modificações. Nos camundongos, o desenvolvimento da placa neural ocorre por volta do sétimo dia de gestação e os primeiros neurônios surgem um pouco antes do fechamento do tubo neural, que se dá entre E9 e E10. O desenvolvimento do córtex cerebral se dá entre E12 e

E18. No hipocampo, a neurogênese se inicia em E11, mas o pico da produção de células ocorre em E16 (RODIER, 1980; HILL, 2017). Desse modo, a infecção em E6 é anterior aos períodos mais críticos do neurodesenvolvimento, enquanto que em E16 o sistema neural do animal está em pleno desenvolvimento, podendo a ativação imune maternal afetá-lo.

De fato, pesquisas com modelos de ativação imune maternal encontraram alterações em várias regiões cerebrais, entre essas o cerebelo, com migração anormal de células durante o neurodesenvolvimento e redução no número de neurônios no cerebelo do camundongo adulto (SHI et al., 2009); no córtex pré-frontal, com maior ativação da micróglia (JUCKEL et al., 2011); e no hipocampo, com redução do diâmetro dos axônios, menor taxa de mielinização dos neurônios (MAKINODAN et al., 2008), redução da expressão de proteínas pré-sinápticas, disfunções na transmissão e plasticidade sináptica (OH-NISHI et al., 2010). É importante destacar as modificações encontradas do hipocampo e córtex pré-frontal, regiões que participam da formação, consolidação e evocação da memória (PRESTON; EICHENBAUM, 2013).

Com relação ao teste de Interação Social, na primeira etapa, que avalia a sociabilidade, um animal normal tem preferência pelo compartimento que contém um animal coespecífico em relação ao compartimento que possui o animal de brinquedo, logo o tempo gasto interagindo com o animal coespecífico é maior, indicando que o camundongo testado tem sociabilidade e motivação social normais. Já na segunda etapa, que avalia a preferência por novidade social, o animal normalmente recorda o contato prévio com o camundongo da primeira etapa, e assim tende a passar mais tempo interagindo com o camundongo não-familiar, indicando memória social inalterada e predileção pela novidade, características naturais de um roedor (KAIDANOVICH-BEILIN et al., 2011).

Entretanto, os resultados obtidos em nossos experimentos mostraram que na sessão sociabilidade os animais do grupo naïve interagiram mais com o brinquedo e os animais dos grupos salina E6 e salina E16 passaram tempos similares em contato com o brinquedo e com o animal coespecífico, quando era esperado que os grupos controle tivessem maior contato com o camundongo coespecífico. Na sessão preferência por novidade social, naïve e salina E6 interagiram igualmente com o animal familiar e com o não familiar, quando era esperado que esses grupos passassem maior tempo interagindo com o animal não familiar. Apesar do grupo salina E16 ter tido maior contato com o camundongo não familiar, conforme previsto para o controle, como todos os outros animais controles não apresentaram o comportamento predito, os resultados do teste não possuem legitimidade.

Diante disso, possivelmente houve uma falha no método utilizado para execução do teste de Interação Social. Para tentar explicar as possíveis causas desse erro foi levantada a hipótese de que o aparato experimental utilizado não estava adequado. O aparato empregado para realização do experimento deve ser grande o suficiente para permitir com que o animal consiga se mover com facilidade ao redor dos recipientes que armazenam o camundongo de brinquedo e o coespecífico, possibilitando as interações e reduzindo o estresse do animal experimental. Os recipientes que armazenam os camundongos e o brinquedo devem permitir a troca de ar entre o interior e o exterior e o contato entre os animais, apenas o suficiente de modo a evitar luta e comportamentos agressivos (KAIDANOVICH-BEILIN et al., 2011).

Ao analisar o teste comportamental foi percebido que o animal experimental teve dificuldades para se locomover ao redor dos recipientes, o que poderia tê-lo deixado estressado, levando a alteração de seu comportamento habitual. Além disso, o animal familiar e o não familiar estavam em recipientes pequenos, com limitação de movimentos, fazendo-os roer parte do recipiente, comportamento que pode significar sinal de estresse e/ou medo.

O animal armazenado no recipiente, ao se sentir aprisionado, possivelmente emite vocalizações nas faixas ultrassônicas, frequências inaudíveis aos seres humanos, que podem ter afetado o comportamento do camundongo experimental. As vocalizações ultrassônicas são um importante mecanismo de comunicação para os roedores por permitirem a transmissão de informações relevantes, como alertas e chamados. Faixas específicas são emitidas em situações aversivas e são comumente relacionadas a comportamentos ansiosos e defensivos (SEFFER; SCHWARTING; WÖHR, 2014). Com isso, possivelmente o camundongo aprisionado emitiu sons de alerta para que o camundongo experimental ficasse longe do perigo ou fosse ao seu encontro para ajudar.

Tendo em vista os problemas acima descritos, o método utilizado para os estudos de interação social no presente trabalho está sendo revisto para as futuras pesquisas do grupo. Após a elaboração de novo equipamento e procedimento experimental, o teste de Interação Social possivelmente será feito para os camundongos tratados com vacina influenza A em E6 e E16. E assim a hipótese levantada nesse estudo, de que a vacina influencia no comportamento social de camundongos, poderá ser respondida.

As regiões cerebrais coletadas dos animais experimentais após a realização dos testes comportamentais foram enviadas para a FIOCRUZ/RJ para realização dos estudos histológicos. Entretanto, as análises não foram finalizadas antes do término do presente trabalho. Nosso grupo de pesquisa aguarda os resultados e pretende somá-los às conclusões obtidas nesse estudo, de modo a complementar e possivelmente corroborar a hipótese levantada.

5 CONCLUSÕES

É possível concluir com os resultados desse estudo que o tratamento de matrizes com a vacina influenza A (H1N1) no décimo sexto dia de gestação afeta o aprendizado e a memória da prole adulta. Além disso, indo de acordo com outros trabalhos, o momento da infecção maternal é um fator relevante para determinar a intensidade das alterações observadas, sendo que os períodos mais tardios da gestação são os mais susceptíveis. Não foi possível determinar se o tratamento também interfere na sociabilidade e preferência por novidade social dos camundongos devido possivelmente a falhas no método utilizado. São necessários ajustes no aparato experimental, os quais estão sendo avaliados por nosso grupo de pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, M. W. et al. Amniotic fluid inflammatory cytokines: potential markers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. *The World Journal of Biological Psychiatry*, v. 14, p. 528-538, 2013.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais*. Tradução de Maria Inês Corrêa Nascimento. Porto Alegre: ARTMED, 2013. 948 p.
- ASP, L. et al. Neonatal infection with neurotropic influenza A virus affects working memory and expression of type III Nrg1 in adult mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 23, p. 733-741, 2009.
- ATLADÓTTIR, H. Ó. et al. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *Journal of autism and developmental disorders*, v. 40, n. 12, p. 1423-1430, 2010.
- BERNARDINO, L. et al. Tumor Necrosis Factor- α Modulates Survival, Proliferation, and Neuronal Differentiation in Neonatal Subventricular Zone Cell Cultures. *Stem cells*, v. 26, n. 9, p. 2361-2371, 2008.
- BOURQUE, F.; VAN DER VEN, E.; MALLA, A. A meta-analysis of the risk for psychotic disorders among first-and second-generation immigrants. *Psychological medicine*, v. 41, n. 05, p. 897-910, 2011.
- BRADBURY, T. N.; MILLER, G. A. Season of birth in schizophrenia: a review of evidence, methodology, and etiology. *Psychological bulletin*, v. 98, n. 3, p. 569-594, 1985.
- BROWN, A. S. et al. Prenatal infection and cavum septum pellucidum in adult schizophrenia. *Schizophrenia research*, v. 108, p. 285-287, 2009.
- BROWN, A. S.; SUSSER, E. S.; In utero infection and adult schizophrenia. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, v. 8, p. 51-57, 2002.
- BUKA, S. L. et al. Maternal cytokine levels during pregnancy and adult psychosis. *Brain, behavior, and immunity*, v. 15, n. 4, p. 411-420, 2001.
- CANETTA, S. et al. Elevated maternal C-reactive protein and increased risk of schizophrenia in a national birth cohort. *American Journal of Psychiatry*, v. 171, n. 9, p. 960-968, 2014.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *How Influenza (Flu) vaccines are made*. [S.l.: s.n.], 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/flu/protect/vaccine/how-fluvaccine-made.htm>>. Acesso em: 12 maio 2017.
- CHRISTIAN, L. M. et al. Inflammatory responses to trivalent influenza virus vaccine among pregnant women. *Vaccine*, v. 29, n. 48, p. 8982-8987, 2011.

CHRISTIAN, L. M. et al. Serum proinflammatory cytokine responses to influenza virus vaccine among women during pregnancy versus non-pregnancy. *American journal of reproductive immunology*, v. 70, n. 1, p. 45-53, 2013.

CONVERGE CONSORTIUM. Sparse whole-genome sequencing identifies two loci for major depressive disorder. *Nature*, v. 523, n. 7562, p. 588-591, 2015.

CROSS-DISORDER GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM. Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nature Genetics*, v. 45, n. 9, p. 984-994, 2013.

DE LA MANO, A. et al. Role of interleukin-1 β in the control of neuroepithelial proliferation and differentiation of the spinal cord during development. *Cytokine*, v. 37, n. 2, p. 128-137, 2007.

DEVERMAN, B. E.; PATTERSON, P. H. Cytokines and CNS development. *Neuron*, v. 64, n. 1, p. 61-78, 2009.

DÍAZ-LUJÁN, C. et al. Role of placental barrier integrity in infection by *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*, v. 164, p. 360-368, 2016.

ELMER, B. M. et al. MHCII requires MEF2 transcription factors to negatively regulate synapse density during development and in disease. *Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 34, p. 13791-13804, 2013.

ENAYATI, M. et al. Maternal infection during late pregnancy increases anxiety-and depression-like behaviors with increasing age in male offspring. *Brain research bulletin*, v. 87, n. 2, p. 295-302, 2012.

ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*, v. 215, p. 244-254, 2010.

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

ENTRINGER, S. et al. Prenatal psychosocial stress exposure is associated with subsequent working memory performance in young women. *Behavioral neuroscience*, v. 123, n. 4, p. 886-893, 2009.

ESTES, M. L.; MCALLISTER, A. K. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science*, v. 353, n. 6301, p. 772-777, 2016.

FATEMI, S. H. et al. Defective corticogenesis and reduction in Reelin immunoreactivity in cortex and hippocampus of prenatally infected neonatal mice. *Molecular Psychiatry*, v. 4, n. 2, p. 145-54, 1999.

- FATEMI, S. H. et al. The viral theory of schizophrenia revisited: abnormal placental gene expression and structural changes with lack of evidence for H1N1 viral presence in placentae of infected mice or brains of exposed offspring. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 3, p. 1290-1298, 2012.
- FORLEO-NETOI, E. et al. Influenza. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.36, n.2, 2003.
- 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.
- GIRARD, M. C. et al. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: a review. *Vaccine*, v. 28, n. 31, p. 4895-4902, jul. 2010.
- GOASDOUÉ, K. et al. The blood-brain barrier; protecting the developing fetal brain. *Placenta*, v. 54, p. 111-116, 2016.
- GOINES, P. E. et al. Increased midgestational IFN- γ , IL-4 and IL-5 in women bearing a child with autism: a case-control study. *Molecular autism*, v. 2, n. 13, 2011.
- GRIFFITHS, S. K.; CAMPBELL, J. P. Placental structure, function and drug transfer. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, v. 15, n. 2, p. 84-89, 2015.
- HILL, M.A. *Embryology Mouse Timeline*. 2017. Disponível em: <https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Mouse_Timeline>. Acesso em: 20 jun. 2017.
- JIANG, P. et al. The persistent effects of maternal infection on the offspring's cognitive performance and rates of hippocampal neurogenesis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 44, n. 1 p. 279-289, 2013.
- JUCKEL, G. et al. Microglial activation in a neuroinflammatory animal model of schizophrenia-a pilot study. *Schizophrenia research*, v. 131, n. 1, p. 96-100, 2011.
- KAIDANOVICH-BEILIN, O. et al. Assessment of social interaction behaviors. *Journal of Visualized Experiments*, n. 48, p. e2473-e2473, 2011. Disponível em: <<https://www.jove.com/video/2473/assessment-of-social-interaction-behaviors>>. Acesso em: 25 maio 2017.
- KNUESEL, I. et al. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nature Reviews Neurology*, v. 10, n. 11, p. 643-660, 2014.
- LI, X. et al. Familial Risks of Psychotic Disorders and Schizophrenia among Siblings Based on Hospitalizations in Sweden. *Psychiatry Research*, v. 166, p. 1-6, 2009.

LI, X.; SUNDQUIST, J.; SUNDQUIST, K. Age-specific familial risks of psychotic disorders and schizophrenia: A nation-wide epidemiological study from Sweden. *Schizophrenia Research*, v. 97, p. 43-50, 2007.

MAKINODAN, M. et al. Maternal immune activation in mice delays myelination and axonal development in the hippocampus of the offspring. *Journal of neuroscience research*, v. 86, n. 10, p. 2190-2200, 2008.

MARKHAM, J. A.; KOENIG, J. I. Prenatal stress: role in psychotic and depressive diseases. *Psychopharmacology*, v. 214, n. 1, p. 89-106, 2011.

MEDNICK, S. A. et al. Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic. *Archives of general psychiatry*, v. 45, n. 2, p. 189-192, 1988.

MEYER, U. et al. Chronic clozapine treatment improves prenatal infection-induced working memory deficits without influencing adult hippocampal neurogenesis. *Psychopharmacology*, v. 208, n. 4, p. 531-543, 2010.

MEYER, U. et al. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 18, p. 4752-4762, 2006.

MEYER, U. Prenatal poly (I: C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biological psychiatry*, v. 75, n. 4, p. 307-315, 2014.

MEZIANE, H. et al. Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. *Genes, Brain and Behavior*, v. 6, p. 192-200, 2007.

MÜHLEISEN, T. W. et al. Genome-wide association study reveals two new risk loci for bipolar disorder. *Nature Communications*, v. 5, 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ncomms4339>>. Acesso em: 28 abr. 2017.

NUNES, M. C.; MADHI, S. A. Review on the effects of influenza vaccination during pregnancy on preterm births. *Human vaccines & immunotherapeutics*, v. 11, n. 11, p. 2538-2548, 2015.

OH-NISHI, A. et al. Maternal immune activation by polyriboinosinic-polyribocytidilic acid injection produces synaptic dysfunction but not neuronal loss in the hippocampus of juvenile rat offspring. *Brain research*, v. 1363, p. 170-179, 2010.

OSKVIG, D. B. et al. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain, behavior, and immunity*, v. 26, n. 4, p. 623-634, 2012.

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.

PATTERSON, P. H. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behavioural brain research*, v. 204, n. 2, p. 313-321, 2009.

PEDERSEN, C. B.; MORTENSEN, P. B. Evidence of a dose-response relationship between urbanicity during upbringing and schizophrenia risk. *Archives of general psychiatry*, v. 58, n. 11, p. 1039-1046, 2001.

PRESTON, A. R.; EICHENBAUM, H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Current Biology*, v. 23, n. 17, p. R764-R773, 2013. Disponível e: <[http://www.cell.com/current-biology/abstract/S0960-9822\(13\)00636-2](http://www.cell.com/current-biology/abstract/S0960-9822(13)00636-2)>. Acesso em: 10 jun. 2017.

REISINGER, S. et al. The poly (I: C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacology & therapeutics*, v. 149, p. 213-226, 2015.

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

SALIHAGIC-KADIC, A. et al. New data about embryonic and fetal neurodevelopment and behavior obtained by 3D and 4D sonography. *Journal of perinatal medicine*, v. 33, n. 6, p. 478-490, 2005.

SANTOS, B.F. Camundongos mutantes mais utilizados. In: Andrade A.; Pinto S.C.; Oliveira R.S. *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. p.139-142.

SCHANZER, D. L.; LANGLEY, J. M.; TAM, T. W. S. Influenza-attributed hospitalization rates among pregnant women in Canada 1994–2000. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, v. 29, n. 8, p. 622-629, 2007.

SCHIZOPHRENIA WORKING GROUP OF THE PSYCHIATRIC GENOMICS CONSORTIUM. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, v. 511, n. 7510, p. 421-427, 2014.

SCHMITT, A. et al. The impact of environmental factors in severe psychiatric disorders. *Frontiers in neuroscience*, v. 8, n. 19, p. 1-10, 2014. Disponível em: <http://www.frontiersin.org/Journal/Abstract.aspx?s=1086&name=systems%20biology&ART_Doi=10.3389/fnins.2014.00019>. Acesso em: 27 abr. 2017.

SEFFER, D.; SCHWARTING, R. K. W.; WÖHR, M. Pro-social ultrasonic communication in rats: Insights from playback studies. *Journal of neuroscience methods*, v. 234, p. 73-81, 2014.

SELYE, H. *The stress of life*. New York: McGraw Hill, 1984 (publicado originalmente em 1956).

SHAPERO, B. G. et al. Stressful life events and depression symptoms: the effect of childhood emotional abuse on stress reactivity. *Journal of clinical psychology*, v. 70, n. 3, p. 209-223, 2014.

SHI, L. et al. Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 23, p. 116-123, 2009.

SHI, L. et al. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 1, p. 297-302, 2003.

SHORT, S. J. et al. Maternal influenza infection during pregnancy impacts postnatal brain development in the rhesus monkey. *Biological psychiatry*, v. 67, n. 10, p. 965-973, 2010.

SOUTH, M. A.; SEVER, J. L. Teratogen Update: the Congenital Rubella Syndrome. *Teratology*, v. 31, p. 297-307, 1985.

SPADINI, L. S.; SOUZA, M. C. B. M.; A doença mental sob o olhar de pacientes e familiares. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 40, n. 1, p. 123-127, 2006.

SPAUWEN, J. et al. Early maternal stress and health behaviours and offspring expression of psychosis in adolescence. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, v. 110, n. 5, p. 356-364, 2004.

SUSSER, E. S.; LIN, S. P. Schizophrenia after prenatal exposure to the Dutch Hunger Winter of 1944-1945. *Archives of general psychiatry*, v. 49, n. 12, p. 983-988, 1992.

VAN OS, J.; KENIS, G.; RUTTEN, B.P.F. The environment and schizophrenia. *Nature*, v. 468, n. 7321, p. 203-212, 2010.

VARESE, F. et al. Childhood adversities increase the risk of psychosis: a meta-analysis of patient-control, prospective-and cross-sectional cohort studies. *Schizophrenia bulletin*, v.38, n.4, p. 661-671, 2012.

VOINESKOS, A.N. et al. Neurexin-1 and frontal lobe white matter: an overlapping intermediate phenotype for schizophrenia and autism spectrum disorders. *PLoS One*, v.6, n.6, p. e20982, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0020982>>. Acesso em: 27 abr. 2017.

WILSON, A. C.; KOENIG, J. I. Social interaction and social withdrawal in rodents as readouts for investigating the negative symptoms of schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology*, v. 24, n. 5, p. 759-773, 2014.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION. *Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates*. Geneva: WHO Document Production Services. 2017. 24 p. Disponível

em:<http://www.who.int/mental_health/management/depression/prevalence_global_health_estimates/en/>. Acesso em: 10 abr. 2017.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION. *Fact sheet: Autism spectrum disorders*. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/autism-spectrum-disorders/en/>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION. *Fact sheet: Mental disorders*. 2017. Disponível em:<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs396/en/>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

XIA, Y. et al. Influenza vaccination during early pregnancy contributes to neurogenesis and behavioral function in offspring. *Brain, behavior, and immunity*, v. 42, p. 212-221, 2014.

YOSHIDA, T. et al. Interleukin-1 receptor accessory protein organizes neuronal synaptogenesis as a cell adhesion molecule. *Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 8, p. 2588-2600, 2012.

ZERBO, O. et al. Association Between Influenza Infection and Vaccination During Pregnancy and Risk of Autism Spectrum Disorder. *JAMA pediatrics*, v. 171, n. 1, p. e163609-e163609, 2017. Disponível em:<<http://jamanetwork.com/journals/jamapediatrics/article-abstract/2587559>>. Acesso em: 16 maio 2017.

ZHU, X. et al. One gene, many neuropsychiatric disorders: lessons from Mendelian diseases. *Nature neuroscience*, v. 17, n. 6, p. 773-781, 2014.

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 - Campus Umuarama - Uberlândia/MG -
CEP 38405-315; e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 071/14 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 164/13

Projeto Pesquisa: "Investigação de fatores neuromodulatórios na etiologia de distúrbios neuropsiquiátricos: a influência do estresse pré-natal por agentes imunogênicos sobre o comportamento de camundongos adultos"

Pesquisador Responsável: Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 01 de julho de 2014

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU