

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA/PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA
TESE DE DOUTORADO

ADROALDO LUNARDELLI

**Efeitos da inflamação no período neonatal sobre o
perfil inflamatório e oxidativo na sepse
experimental na vida adulta**

PORTO ALEGRE
2013

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
DOUTORADO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**Efeitos da inflamação no período neonatal sobre o perfil
inflamatório e oxidativo na sepse experimental na vida adulta**

Tese de doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande
do Sul para obtenção do grau de
Doutor em Medicina/Pediatria e
Saúde da Criança.

Adroaldo Lunardelli

Orientador: Márcio Vinícius Fagundes Donadio
Co-orientador: Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre, 2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO

L961e Lunardelli, Adroaldo

Efeitos da inflamação no período neonatal sobre o perfil inflamatório e oxidativo na sepse experimental na vida adulta / Adroaldo Lunardelli. Porto Alegre: PUCRS, 2013.

71 f.: il. tab.

Orientador: Márcio Vinícius Fagundes Donadio.

Co-orientador: Jarbas Rodrigues de Oliveira.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Pediatria e Saúde da Criança.

1. ESTRESSE NEONATAL. 2. LIPOPOLISSACARÍDEO. 3. COMPORTAMENTO. 4. COMPLEXOS MITOCONDRIAIS. 5. CITOCINAS INFLAMATÓRIAS. I. Donadio, Márcio Vinícius Fagundes. II. Jarbas Rodrigues de Oliveira. III. Título.

CDD 574.87
CDU 576 (043.2)
NLM QW 568

Isabel Merlo Crespo
Bibliotecária CRB 10/1201

*Este trabalho é
dedicado aos amigos
Leonardo Pedrazza e
Carolina Luft.*

RESUMO

A administração de lipopolissacarídeo (LPS) no período neonatal gera um estímulo imunológico estressante capaz de estimular a expressão de citocinas no sistema nervoso central e causar alterações cerebrais em certas regiões do hipocampo de ratos adultos, além de ativar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em neonatos. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos em longo prazo da inflamação no período neonatal sobre o perfil inflamatório e oxidativo na sepse experimental na vida adulta. No décimo dia após o nascimento, camundongos Balb/c receberam diferentes tratamentos: nLPS, recebeu 100 μ L de solução 100 μ g/Kg de LPS i.p. ou nSal em que foi administrado 100 μ L de solução salina i.p. Quando adultos, os animais foram submetidos à administração i.p. de solução salina ou LPS e, 12 horas após, foram coletados o soro para mensuração das citocinas inflamatórias e o fígado para determinação dos complexos mitocondriais e estresse oxidativo. Houve aumento do comportamento de medo/ansiedade no grupo nLPS. Os complexos II e II-III aumentaram nos machos nLPS-salina quando comparados ao controle. A administração de LPS nas fêmeas adultas provocou uma diminuição da atividade da enzima glutatona reduzida. Não houve diferenças em relação às citocinas inflamatórias. Os resultados indicam que a inflamação no período neonatal foi efetiva na indução do *programming*. O metabolismo da cadeia respiratória mitocondrial parece ser influenciado pela inflamação neonatal em animais machos. O estresse neonatal por LPS parece não alterar o perfil inflamatório das citocinas no modelo de sepse experimental.

Palavras-chave: estresse neonatal; lipopolissacarídeo; comportamento; complexos mitocondriais; citocinas inflamatórias.

ABSTRACT

During the neonatal period, the administration of lipopolysaccharide (LPS) generates a stressful immune stimulation resulting in the expression of cytokines in the central nervous system. As result, brain changes in certain regions of the hippocampus of adult rats, as well as activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) in neonates is observed. The objective of this study is to evaluate the long-term effects of neonatal inflammation on the oxidative and inflammatory status during experimental sepsis in adult life. On day ten after birth, Balb/c mice received different treatments: nLPS, received 100 μ L of a 100 μ g/kg i.p. LPS solution or nSal, received 100 μ L of i.p. saline solution. As adults, animals were submitted to i.p. administration of saline solution or LPS. After 12 hours, serum samples and liver were collected to measure inflammatory cytokines and to determine mitochondrial complexes and oxidative stress, respectively. There was an increase in the fear/anxiety behavior in the nLPS group. The complexes II and II-III increased in the nLPS saline group when compared to control. The LPS administration in the adult females induced a decrease of the glutathione enzyme activity. There were no differences in the inflammatory cytokines. The results indicate that the neonatal inflammation was effective in inducing programming. The mitochondrial respiratory chain metabolism seems to be influenced by the neonatal inflammation in males. LPS neonatal stress seems not to change the cytokine inflammatory profile in an experimental model of sepsis.

Keywords: neonatal stress; lipopolysaccharide; behavior; mitochondrial complexes; inflammatory cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Atividade dos complexos mitocondriais II, II-III e IV hepático nos grupos experimentais.....	62
Figura 2. Determinação de TBARS, SOD e GSH hepático nos grupos experimentais.....	63
Figura 3. Determinação de NO hepático e TGF- β 1 sérico nos grupos experimentais.....	64
Figura 4. Concentração sérica de TNF- α e IL-6 nos grupos experimentais.....	65
Figura 5. Concentração sérica de INF- γ e MCP-1 nos grupos experimentais.....	66

LISTA DE TABELAS

[Capítulo II] Tabela 1. Resumo dos principais estudos que fazem uso de LPS como indutor de <i>programming</i> experimental neonatal.....	35
[Capítulo III] Tabela 1. Avaliação comportamental dos grupos experimentais no aparato de cruz elevada.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: hormônio adenocorticotrópico

COX-2: ciclooxigenase 2

ERO: espécies reativas do oxigênio

GSH: glutathiona reduzida

HPA: hipotálamo-pituitária-adrenal

IL-1 β : interleucina 1 beta

IL-6: interleucina 6

IL-10: interleucina 10

INF- γ : interferon gama

LPS: lipopolissacarídeo

MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1

NO: óxido nítrico

PGE2: prostaglandina E2

SOD: superóxido dismutase

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGF- β 1: fator transformador de crescimento beta 1

TLR4: receptor de *toll-like* 4

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

Capítulo I

1. Introdução.....	12
2. Justificativa.....	16
3. Objetivos.....	17
3.1. Objetivos gerais.....	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
4. Referências Bibliográficas.....	18

Capítulo II

1. Introdução.....	25
2. Materiais e Métodos.....	27
3. Resultados e Discussão.....	28
4. Referências Bibliográficas.....	33

Capítulo III

1. Introdução.....	43
2. Materiais e Métodos.....	45
3. Resultados.....	50
4. Discussão.....	52
5. Referências Bibliográficas.....	59

Capítulo IV

Conclusão.....	71
----------------	-----------

Capítulo I

Apresentação

1. Introdução

A exposição de organismos a situações de perigo ou ameaça gera um estado de desarmonia na qual a homeostasia é colocada sob ameaça¹. Em contraposição aos estímulos estressantes, uma série de respostas adaptativas, físicas e mentais, é desencadeada, podendo resultar em alterações estáveis de diversos sistemas. O período neonatal representa uma fase crítica para o desenvolvimento neural. Processos vitais como migração, divisão, diferenciação, crescimento e morte celular ocorrem neste período². Assim, variações precoces do ambiente do animal afetam o desenvolvimento de importantes sistemas, dando origem a alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis^{3,4}. Diversos estudos têm demonstrado uma relação direta de diferentes estressores, como processos infecciosos ou inflamatórios, com alterações estáveis no desenvolvimento neural e um maior risco de alterações cognitivas e motoras em crianças⁵.

Diversos modelos experimentais têm sido utilizados para demonstrar que intervenções no início da vida, sejam elas pré ou neonatais, podem gerar alterações permanentes que perduram ao longo da vida. A manipulação no período neonatal é um desses modelos no qual diversas alterações foram descritas, incluindo diminuição do medo ao explorar ambientes novos⁶, resposta menos acentuada na secreção de glicocorticóides quando expostos a estímulos estressores^{7,8}, diminuição drástica da ovulação⁹, menor secreção de estradiol, hormônio luteinizante e prolactina no proestro¹⁰, redução do comportamento sexual em machos e fêmeas⁶, diminuição do número de células no locus coeruleus¹¹, redução da densidade de receptores de angiotensina II na área pré-óptica medial e no núcleo paraventricular¹² e importante redução na função renal e mecanismos de regulação do equilíbrio hidroeletrolítico¹³. De qualquer forma, independente do modelo utilizado, parece bem estabelecido que intervenções nestes períodos importantes provoquem o que tem sido chamado de "programming", ou seja, uma "marca" no desenvolvimento de diferentes sistemas que permanece ao longo da vida. O conceito de

programming tem sido desenvolvido para explicar o processo pelo qual um organismo se adapta aos eventos ambientais através da geração de alterações estáveis no fenótipo. Isto geralmente ocorre em períodos iniciais de desenvolvimento, fazendo com que a exposição a um ambiente adverso possa perturbar o processo de proliferação e diferenciação celular e tenha efeitos duradouros sobre a saúde do indivíduo¹⁴. Este parece também ser o caso de modelos que reproduzem situações de inflamação e/ou infecção durante o período neonatal e alteram a responsividade de importantes sistemas na vida adulta¹⁵. Um destes modelos é a administração de LPS (lipopolissacarídeo) no período neonatal. Este procedimento gera um estímulo imunológico estressante¹⁶ capaz de estimular a expressão de citocinas no sistema nervoso central e causar alterações cerebrais em certas regiões do hipocampo de ratos adultos¹⁷. Já é sabido que a injeção de LPS em ratos neonatos causa elevações nos níveis plasmáticos de corticosterona e aumenta a sensibilidade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) quando adultos, o que altera muitas respostas fisiológicas a estresses no adulto¹⁸.

Uma infecção bacteriana, tal como a mimetizada pela aplicação de LPS, manifesta a resposta central a um desafio imunológico. Patógenos (como o LPS) se ligam a receptores toll-like (por exemplo, o receptor de toll-like 4, TLR4) em monócitos, macrófagos e adipócitos. Esta ativação inicia uma cascata que contribui para a iniciação da resposta febril e libertação local de prostaglandina E2 (PGE2) a partir do fígado, que atua sobre o vago causando elevação inicial de glicocorticoides. Posteriormente, há fosforilação do inibidor I κ B, liberando o fator nuclear NF- κ B que é translocado para o núcleo, onde inicia a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), bem como as citocinas anti-inflamatórias como o antagonista do receptor de IL-1 e interleucina 10 (IL-10). As citocinas são liberadas para a corrente sanguínea e estimulam a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2), conversora de ácido araquidônico para PGE2. Esta cascata culmina com febre e ativação do eixo HPA na luta contra o patógeno invasor¹⁹. Além disso, a administração de LPS neonatal aliada a

uma exposição estressante quando adulto resulta em aumento significativo no comportamento de ansiedade²⁰.

Diferenças de sexo na fisiologia e função do sistema imune periférico de vertebrados já foram documentadas por décadas. As fêmeas de muitas espécies geralmente apresentam aumento da resposta imune e da resistência à infecção em comparação aos machos. Estas diferenças entre os sexos têm sido atribuídas, em grande parte, às ações imunomoduladoras de hormônios esteróides sexuais. Em geral, o estradiol exógeno tem efeitos estimulantes na imunidade humoral, mas pode aumentar ou suprimir a imunidade mediada por célula, dependendo da dose. A testosterona exógena geralmente deprime a imunidade tanto humoral como mediada por células, aumentando a susceptibilidade a infecções bacterianas e virais. Baseado na diferença entre o número de células gliais e os níveis de moléculas do sistema imune entre machos e fêmeas, é provável que haja efeitos sexo-dependentes na função do sistema neuroimune em resposta a um desafio imunológico na fase inicial da vida, fazendo com que machos e as fêmeas possam apresentar respostas diferentes à ativação neonatal do sistema imunológico²¹.

A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica à infecção²². Apesar do esforço dos profissionais da área da saúde, a sepse continua sendo uma das principais causas de mortalidade hospitalar, principalmente em unidades de terapia intensiva²³. A sepse causa lesão celular endotelial generalizada a partir da inflamação descontrolada e da falência de múltiplos órgãos²⁴ e, de acordo com estimativas, afeta mais de 18 milhões de pessoas no mundo, com estimativa de aumento na incidência de 1% ao ano, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento²⁵. Evidências sugerem uma reação inflamatória maciça resultante da liberação sistêmica de citocinas como caminho subjacente à sepse²². Frequentemente, a resposta inflamatória às lesões severas, erroneamente gera dano aos tecidos normais²⁶.

Desta forma, esta tese trata dos efeitos de uma inflamação no período neonatal sobre respostas inflamatórias e oxidativas de longo prazo e apresenta (i) um artigo de revisão demonstrando um modelo experimental

efetivo no estudo do *programming* e (ii) um artigo original que traz resultados para um melhor entendimento das repercussões do estresse neonatal na sepse experimental na vida adulta.

2. Justificativa

O entendimento das repercussões e mecanismos pelos quais variações no período neonatal podem gerar alterações estáveis que perduram ao longo da vida consiste em tema atual e de grande relevância. A alta prevalência de crianças que passam por situações adversas no período neonatal, incluindo processos inflamatórios, justificam a preocupação em conhecer os efeitos dessas intervenções sobre a resposta a situações adversas na vida adulta. Assim, este estudo pretende contribuir demonstrando - em modelo experimental - possíveis influências em longo prazo que alterações no período neonatal podem gerar sobre a resposta a situações de reconhecida morbidade como a sepse. O conhecimento desses mecanismos e das alterações provocadas por essas intervenções pode possibilitar um avanço na busca de ações preventivas ou terapêuticas que visem a diminuição de morbidades muito prevalentes em nosso meio.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos em longo prazo da inflamação no período neonatal sobre o perfil inflamatório e oxidativo na sepse experimental em camundongos na vida adulta.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da inflamação no período neonatal sobre o perfil comportamental em camundongos adultos;

- Avaliar os efeitos da inflamação no período neonatal sobre a resposta inflamatória na sepse experimental em camundongos na vida adulta;

- Avaliar os efeitos da inflamação no período neonatal sobre o estresse oxidativo e os complexos mitocondriais na sepse experimental em camundongos adultos;

- Avaliar possíveis diferenças sexuais nos efeitos em longo prazo da inflamação no período neonatal.

4. Referências Bibliográficas

1. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 1992;267(9):1244-1252.
2. Mistretta CM, Bradley RM. Effects of early sensory experience on brain and behavioral development. In: *Studies in the Development of Behavior and Nervous System*. New York: Academic Press, pp. 215-246; 1978.
3. Levine S. Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science* 1962;135:795-799.
4. Denenberg VH. Critical periods, stimulus input and emotional reactivity: a theory of infantile stimulation. *Psychological Review* 1964;71:335-351.
5. Adams-Chapman I, Stoll BJ. Neonatal infection and long-term neurodevelopmental outcome in the preterm infant. *Curr Opin Infect Dis* 2006;19(3):290-297.
6. Padoin MJ, Cadore LP, Gomes CM, Barros HMT, Lucion AB. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci* 2001;115:1332-1340.
7. Levine S. The psychoendocrinology of stress. *Ann. N. Y. Acad. of Science* 1993;697:61-69.
8. Meaney MJ, Seema B, LaRocque S, McCormick C, Shanks N, Sharma S, Smythe J, Viau V, Plotsky PM. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. *Ann. N. Y. Acad. Science* 1993;697:70-85.
9. Gomes CM, Frantz PJ, Sanvitto GL, Anselmo-Franci JA, Lucion AB. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:1239-1242.
10. Gomes CM, Raineki C, Paula PR, Severino GS, Helena CVV, Anselmo-Franci JA, Franci CR, Sanvitto GL, Lucion AB. Neonatal handling and reproductive function in female rats. *J Endocrinol* 2005;184:435-445.

11. Lucion AB, Pereira FM, Winkelmann EC, Sanvitto GL, Anselmo-Franci JA. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behavioral Neuroscience* 2003;117:894–903.
12. Gomes CM, Donadio MV, Franskoviaki I, Anselmo-Franci JA, Franci CR, Lucion AB, Sanvitto GL. Neonatal handling reduces angiotensin II receptor density in the medial preoptic area and paraventricular nucleus but not in arcuate nucleus and locus coeruleus of female rats. *Brain Research* 2006;1067(1):177-180.
13. Donadio MV, Jacobs S, Corezola KL, Melo DA, Dias HB, Reichel CL, Franci CR, Jeckel-Neto EA, Lulhier F, Lucion AB, Oliveira JR, Sanvitto GL. Neonatal handling reduces renal function in adult rats. *Kidney Blood Press Res* 2009;32(4):286-292.
14. Xiong F, Zhang L. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2013;34:27-46.
15. Karrow NA. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system during inflammation and altered programming of the neuroendocrine-immune axis during fetal and neonatal development: lessons learned from the model inflammagen, lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* 2006;20(2):144-158.
16. Li XF, Jones JSK, Knox AMI, Wu XQ, Tahsinsoy D, Brain SD, Lightman SL, O'Byrne KT. Neonatal lipopolysaccharide exposure exacerbates stress-induced suppression of luteinizing hormone pulse frequency in adulthood. *Endocrinology* 2007;148:5984-5990.
17. Jenkins TA, Harte MK, Stenson G, Reynolds GP. Neonatal lipopolysaccharide induces pathological changes in parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the rat. *Behavioural Brain Research* 2009;205:355-359.
18. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Kinouchi R, Ogata R, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Neonatal lipopolysaccharide exposure attenuates the homotypic stress-induced suppression of LH secretion in adulthood in male rat. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2009;27:345-349.

19. Spencer SJ, Galic MA, Pittman QJ. Neonatal programming of innate immune function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300:E11-E18.
20. Walker AK, Nakamura T, Byrne RJ, Naicker S, Tynan RJ, Hunter M, Hodgson DM. Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34:1515-1525.
21. Schwarz JM, Bilbo SD. Sex, glia, and development: interactions in health and disease. *Hormones and Behavior* 2012;62:243-253.
22. Nunes FB, Graziottin CM, Alves-Filho JCF, Lunardelli A, Caberlon E, Peres A, Oliveira JR. Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes. *International Immunopharmacology* 2003;3:267-272.
23. Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JCF, Lunardelli A, Pires MGS, Wächter PH, Oliveira JR. An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacological Research* 2003; 47(1):35-41.
24. Lin LC, Chen YY, Lee WT, Chen HL, Yang RC. Heat shock pretreatment attenuates sepsis-associated encephalopathy in LPS-induced septic rats. *Brain and Development* 2010;32:371-377.
25. Kumar V, Sharma A. Is neuroimmunomodulation a future therapeutic approach for sepsis? *International Immunopharmacology* 2010;10:9-17.
26. Santos RCV, Lunardelli A, Caberlon E, Bastos CMA, Nunes FB, Pires MGS, Biolchi V, Paul EL, Vieira FBC, Aquino ARC, Corseuil E, Oliveira JR. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of Ulomoides dermestoides on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. *Inflammation* 2010;33(3):173-179.

Capítulo II

Artigo de revisão

(Formatado de acordo com as normas da Revista Ciência & Saúde)

**Efeitos do estresse neonatal com lipopolissacarídeo na indução
experimental de *programming***

**Effects of neonatal stress using lipopolysaccharide on the induction
of experimental programming**

Adroaldo Lunardelli¹, Leonardo Pedrazza¹, Carolina Luft²,
Márcio Vinícius Fagundes Donadio³

¹Farmacêutico. Mestre em Biologia Celular e Molecular. Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brasil.

²Acadêmica em Ciências Biológicas. Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, PUCRS, Brasil.

³Fisioterapeuta. Doutor em Fisiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Professor do Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança e da Faculdade de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia, PUCRS, Brasil.

Endereço para correspondência: Prof. Márcio V. F. Donadio, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) – Centro Infant. Av. Ipiranga, 6690, 2º andar, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP 90610-000. Telefone/fax: +55 51 3320-3000 (ramal 2221). E-mail: mdonadio@pucrs.br

Número de palavras: 2106

Número de tabelas: 1

RESUMO

Introdução: Diversos modelos experimentais têm sido utilizados para demonstrar que intervenções no início da vida podem gerar alterações permanentes que perduram ao longo da vida. A administração de lipopolissacarídeo (LPS) no período neonatal gera um estímulo imunológico estressante capaz de alterar muitas respostas fisiológicas ao estresse na vida adulta.

Objetivo: Revisar a literatura acerca das influências, em longo prazo, que a administração de LPS no período neonatal pode gerar na vida adulta em modelos experimentais.

Materiais e métodos: O presente estudo consiste em uma revisão integrativa da literatura com base na busca de artigos científicos disponíveis nas bases de dados *Medline/PubMed* e *Science Direct*, utilizando os descritores *neonatal programming*, *neonatal stress*, *neonatal LPS* e *neonatal lipopolysaccharide*. Foram incluídas publicações cuja temática abordasse os resultados da utilização de LPS como estressor neonatal em protocolos experimentais, sem limite de data.

Resultados: Foram selecionados 15 artigos que mostram modelos experimentais em que a injeção de LPS em ratos neonatos causa modificações funcionais da resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) quando adultos, incluindo elevação nos níveis plasmáticos de corticosterona. Ainda, há diminuição das concentrações circulantes de citocinas pró-inflamatórias, hiperalgesia, aumento na sensibilidade ao estresse e aumento do comportamento de ansiedade e depressão.

Conclusão: Os resultados demonstram que a administração neonatal de LPS consiste em um modelo experimental efetivo de *programming*, provocando uma série de alterações imunológicas e comportamentais na vida adulta.

Palavras-chave: Recém-Nascido; Inflamação; Ansiedade.

ABSTRACT

Introduction: Several experimental models have been used to demonstrate that interventions early in life can lead to permanent changes that persist throughout life. In this context, the administration of lipopolysaccharide (LPS) in the neonatal period generates a stressful immune stimulation, which is able to change many physiological responses to stress in adulthood.

Objective: To review the literature about the long-term influences in the adult life of the LPS administration during the neonatal period in experimental models.

Materials and methods: This study consists of an integrative literature review based on the search scientific articles available in the Medline/Pubmed and Science Direct databases, using the following keywords: neonatal programming, neonatal stress, neonatal LPS and neonatal lipopolysaccharide. We have included manuscripts whose content included the use of LPS as a neonatal stressor in experimental protocols, without limits of date.

Results: We selected 15 articles demonstrating that experimental models injecting LPS in neonatal rats results in functional modifications of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis as adults, including increased levels of plasma corticosterone. Indeed, there are decreased inflammatory cytokine levels, hyperalgesia, increased sensitivity to stress and increased anxiety and depression behaviors.

Conclusion: The results demonstrate that the neonatal LPS administration consists of an effective experimental model of programming, leading to a series of immunological and behavioral changes in adulthood.

Keywords: Newborn, Inflammation, Anxiety.

INTRODUÇÃO

Diversos modelos experimentais têm sido utilizados para demonstrar que intervenções no início da vida, sejam elas pré ou neonatais, podem gerar alterações permanentes que perduram ao longo da vida. O conceito de *programming* tem sido desenvolvido para explicar o processo pelo qual um organismo se adapta aos eventos ambientais através da geração de alterações estáveis no fenótipo. Isto geralmente ocorre em períodos iniciais de desenvolvimento, fazendo com que a exposição a um ambiente adverso possa perturbar o processo de proliferação e diferenciação celular e tenha efeitos duradouros sobre a saúde do indivíduo¹.

O estresse imune pré-natal induzido por lipopolissacarídeo (LPS) ou citocinas, aumenta a ingestão de comida em ratos e leva à obesidade e a distúrbios associados à síndrome metabólica, como o aumento de leptina sérica e resistência à insulina no adulto². Também, modelos como a manipulação no período neonatal têm sido amplamente estudados com a descrição de inúmeras alterações, incluindo diminuição do medo ao explorar ambientes novos³, resposta menos acentuada na secreção de glicocorticóides^{4,5}, diminuição da função reprodutiva^{1,6,7}, diminuição do número de células no locus coeruleus⁸, redução da densidade de receptores de angiotensina II na área pré-óptica medial e no núcleo paraventricular⁹, além de importante redução na função renal e nos mecanismos de regulação do equilíbrio hidroeletrólítico¹⁰. De qualquer forma, independente do modelo utilizado, parece bem estabelecido que intervenções nestes períodos importantes provoquem este efeito de *programming*, ou seja, uma "marca" no desenvolvimento de diferentes sistemas que permanece ao longo da vida.

Este parece também ser o caso de modelos que reproduzem situações de inflamação e/ou infecção durante o período neonatal e alteram a responsividade de importantes sistemas na vida adulta¹¹. O período neonatal é um estágio muito importante no desenvolvimento neurológico¹², é um período caracterizado por grande plasticidade e reorganização¹³. A

administração de LPS no período neonatal gera um estímulo imunológico estressante¹⁴ capaz de estimular a expressão de citocinas e causar alterações cerebrais em certas regiões do hipocampo de ratos adultos¹⁵, além de ativar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em neonatos¹⁶. Já é sabido que a injeção de LPS em ratos neonatos causa elevações nos níveis plasmáticos de corticosterona e aumenta a sensibilidade do eixo HPA quando adultos, o que altera muitas respostas fisiológicas ao estresse no adulto¹⁷. Além disso, a administração de LPS neonatal aliado a uma exposição estressante quando adulto resulta em aumento significativo no comportamento de ansiedade¹⁶.

À parte das evidências em modelos experimentais, nos seres humanos, uma experiência adversa no início da vida, como negligência emocional, pode levar a um aumento da probabilidade do indivíduo desenvolver ansiedade, depressão, doença crônica ou mesmo vício em drogas na vida futura¹⁸. Achados semelhantes foram demonstrados em modelos de primatas com privação parental ou social durante o período neonatal, produzindo adultos socialmente desajustados, tímidos, deprimidos e com alterações na função neuroimune e no eixo HPA¹⁸. O período neonatal é uma fase importante do neurodesenvolvimento para a compreensão da etiologia e da trajetória do desenvolvimento de desordens neuropsiquiátricas na vida adulta, como a ansiedade e a depressão¹².

Assim, o entendimento das repercussões e mecanismos pelos quais variações no período neonatal podem gerar alterações estáveis que perduram ao longo da vida consiste em tema atual e de grande relevância. A alta prevalência de crianças que passam por situações adversas no período neonatal, incluindo processos inflamatórios, justificam a preocupação em conhecer os efeitos dessas intervenções sobre a resposta a situações adversas na vida adulta. Com base nisso, este estudo tem como objetivo revisar a literatura acerca das influências, em longo prazo, que a administração de LPS no período neonatal pode gerar na vida adulta em modelos experimentais.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo consiste em uma revisão integrativa da literatura com base na busca de artigos científicos disponíveis em diferentes bases de dados. A busca eletrônica nas bases de dados *Medline/PubMed* e *Science Direct*, que fornecem informação técnico-científica de reconhecida qualidade, foi realizada no mês de junho de 2013 utilizando os descritores/unitermos, em língua inglesa, *neonatal programming*, *neonatal stress*, *neonatal LPS* e *neonatal lipopolysaccharide*. Adotou-se como critérios de inclusão as publicações - sem limite de data - cuja temática abordasse os resultados da utilização de LPS como estressor neonatal em protocolos experimentais. Primeiramente, foram analisados títulos e resumos dos resultados das buscas, sendo aqueles estudos que contemplassem a temática proposta selecionados, incluídos e lidos de forma minuciosa. Foram excluídos da seleção estudos realizados em seres humanos e revisões de literatura. A análise minuciosa seguiu referencial teórico, incluindo a leitura exploratória, seletiva, analítica e interpretativa do material empírico¹⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através das buscas realizadas e de acordo com os critérios descritos anteriormente, foram selecionados e incluídos 15 artigos nesta revisão. Estes são tabulados na tabela 1, que apresenta os trabalhos que fazem uso de LPS como indutor de *programming* neonatal.

A endotoxina LPS é um componente pirogênico imunologicamente ativo da parede celular de bactérias gram negativas endêmica à maioria das espécies de mamíferos. Os vertebrados têm receptores específicos de LPS na superfície de macrófagos, sendo que a administração de LPS imita a resposta comportamental, neuroquímica e neuroendócrina produzida pelo sistema imune em resposta à infecção²⁰. Um único desafio com LPS tem influência em longo prazo na resposta imunológica²¹. Modelos experimentais de indução de *programming* fazem uso de uma aplicação de LPS no décimo^{2,17,21} ou décimo quarto²²⁻²⁴ dia de vida. Outros estudos fazem duas aplicações, nos dias 3 e 5^{16,25-31} ou nos dias 7 e 9³² após o nascimento. De maneira geral, os trabalhos fazem uso de ratos Wistar, Long-Evans, Fischer-344, Lister-hooded ou Sprague-Dawley.

Uma infecção bacteriana, tal como a mimetizada pela aplicação de LPS, manifesta a resposta central a um desafio imunológico. Patógenos (como o LPS) se ligam a receptores *toll-like* (por exemplo, o receptor de *toll-like* 4, TLR4) em monócitos, macrófagos e adipócitos. Esta ativação inicia uma cascata que contribui para a iniciação da resposta febril e liberação local de prostaglandina E2 (PGE2) a partir do fígado, que atua sobre o vago causando elevação inicial de glicocorticoides. Posteriormente, há fosforilação do inibidor I κ B, liberando o fator nuclear NF- κ B que é translocado para o núcleo, onde inicia a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), bem como as citocinas anti-inflamatórias como o antagonista do receptor de IL-1 e interleucina 10 (IL-10). As citocinas são liberadas para a corrente sanguínea e estimulam a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2), convertora de ácido araquidônico para

prostaglandina E2 (PGE2). Esta cascata culmina com febre e ativação do eixo HPA na luta contra o patógeno invasor³³.

Em relação ao estudo dos possíveis efeitos cumulativos de eventos perinatais, parece haver necessidade de uma abordagem mais integradora. Neste sentido, a utilização de estratégias como um "duplo estímulo" fornece uma plataforma a partir da qual se pode investigar a inter-relação dinâmica entre múltiplos mecanismos, postulando que um primeiro estímulo (genético ou ambiental) durante períodos críticos do desenvolvimento atrapalha a ontogenia dos sistemas neurais, que estabelece uma susceptibilidade a um segundo estímulo na vida adulta¹⁶. Animais adultos submetidos à administração de LPS têm concentrações circulantes das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , significativamente atenuadas quando tratados com LPS no período neonatal em comparação aos controles no qual foi aplicado salina no princípio da vida. Esta redução na produção de citocinas está associada à redução da fosforilação de I κ B no fígado e baço, levando à diminuição da formação de NF- κ B e consequente redução na ativação de prostaglandina E2 (catalisada pela COX-2) no cérebro. Esta linha de raciocínio conduz à possibilidade de que estas alterações possam ser devidas ao prejuízo no *feedback* negativo da corticosterona. Os glicocorticoides modificam a expressão de citocina, principalmente por suas ações sobre o NF- κ B e eixo HPA³³. Uma única aplicação de LPS durante o desenvolvimento impacta também no processamento sensorial e doloroso em indivíduos adultos, levando a diminuição dos limiares nociceptivos e aumento das respostas a estímulos dolorosos²⁴.

Uma resposta febril competente é parte crucial de defesa do hospedeiro contra infecções, sendo essencial para a sobrevivência. A febre tem um papel importante na potencialização das respostas imunológicas e na alteração da temperatura ótima para o crescimento patogênico (diminuindo sua proliferação). Por tal, diminuir a resposta febril após a infecção, como em casos de hipotermia na sepse, conduz à menor sobrevida. Spencer²² mostra que o desafio imunológico com a administração de LPS no período neonatal atenua a hipotermia e acentua a resposta febril

em animais adultos submetidos a doses sépticas de LPS, mostrando uma resposta positiva de adaptação. Este dado conflita com outros trabalhos, que mostram atenuação da febre na mesma situação³³.

Ainda, ao analisarem-se efeitos comportamentais, sabe-se que o período neonatal é um estágio muito importante na compreensão da etiologia e da trajetória do aparecimento de desordens neuropsiquiátricas na vida adulta, como a ansiedade e a depressão¹². Exposição neonatal de LPS em roedores está associada com o aumento do comportamento de ansiedade, independente da exposição estressora no adulto¹⁶. Ratos neonatos tratados com LPS mostram um marcado aumento na sensibilidade ao estresse quando adultos se comparados com controles tratados com salina, mostrando efeito de *programming* do eixo HPA em longo prazo como resposta ao estresse inicial. O mecanismo pelo qual o LPS desenvolve este efeito não é completamente entendido, embora a administração de LPS mimetize os eventos ocorridos durante o estresse infeccioso, incluindo resposta febril, aumento da produção de citocinas como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α pelo aumento na atividade da COX-2 e produção de PGE2²⁵. É bem estabelecido que o sistema imune é afetado pelo status neurológico do hospedeiro e também afeta a condição neurológica do indivíduo³⁴, ou seja, há uma estreita interação entre os sistemas neuroendócrino e neuroimune, havendo comunicação bidirecional entre eles²⁹. Um problema no estudo das consequências comportamentais da doença é a dificuldade de separar os efeitos do agente infeccioso em si dos efeitos da resposta imunológica a este agente²⁰.

De maneira geral, o estresse é uma resposta interna ao estímulo ou pressão que muda ou destrói a homeostasia do organismo em resposta a uma alteração ambiental¹. O eixo HPA desempenha papel primordial na regulação da função metabólica. Seu efeito constitutivo é importante componente na resposta ao estresse¹, de tal sorte que alterações neste eixo hormonal são frequentemente associadas a distúrbios de ansiedade e depressão, bem como à violência e agressão³⁵. Animais expostos à endotoxina durante a primeira semana de vida são mais responsivos ao estresse quando adultos, mostrando aumento de hormônio

adenocorticotrópico (ACTH) e corticosterona, além de diminuição de receptores de glicocorticoides no hipotálamo, córtex frontal e hipocampo²⁸. Os glicocorticoides são os primeiros mediadores no *programming* do eixo HPA, sendo assim, seus receptores (responsáveis por seus efeitos) exercem papel fundamental na resposta ao estresse. Em camundongos transgênicos, a redução de 30-50% nos níveis de receptores, resulta em significativa desordem neuroendócrina, metabólica e imunológica¹.

A doença comportamental é um estado de motivação desencadeada pela ativação do sistema imune inato periférico, caracterizada por redução na atividade locomotora nos comportamentos exploratórios³⁶. Vários modelos de estresse precoce em roedores, incluindo o estresse pré-natal e pós-natal, têm sido desenvolvidos para o estudo dos mecanismos neurobiológicos de distúrbios relacionados com ansiedade e depressão. Geralmente, o estresse precoce em animais aumenta o comportamento de ansiedade e depressão, e é acompanhado por alterações funcionais do eixo HPA³⁴. Quando adultos, ratos neonatais infectados com *E. coli* exibem certo número de alterações fisiológicas e comportamentais, incluindo a vulnerabilidade a deficiências cognitivas, redução da resposta da corticosterona ao estresse e diminuição das interações sociais³⁷, sendo este perfil particularmente aparente quando os animais são submetidos à um evento estressor agudo adicional quando adultos. Uma das observações mais consistentes é que a exposição ao LPS nos estágios iniciais de vida resulta em prole que, na idade adulta, demonstra aumento no comportamento de ansiedade e depressão. Ademais, evidência recente indica que estes resultados comportamentais não estão limitados aos animais expostos isoladamente, mas têm sido mostrados ao persistirem numa geração subsequente de descendentes, carregados por uma linha materna ou paterna dos animais previamente expostos ao LPS³⁰.

Com isso, esta revisão demonstra os efeitos gerados em longo prazo pela administração neonatal de LPS. Este procedimento vem sendo utilizado largamente na literatura como modelo experimental para estudo dos efeitos do *programming*. Ratos submetidos ao desafio com LPS no início da vida apresentam alterações imunológicas e comportamentais na vida adulta. O

“duplo desafio” imunológico sugere alterações funcionais do eixo HPA, o que propicia concentrações circulantes das citocinas pró inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α significativamente atenuadas, hiperalgesia, aumento na sensibilidade ao estresse e aumento do comportamento de ansiedade e depressão. Um melhor conhecimento deste modelo e seus efeitos, à luz da literatura atual, possibilita que se avance no entendimento dos mecanismos do *programming*, propiciando melhor manejo de seus efeitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Xiong F, Zhang L. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2013;34:27-46.
2. Iwasa T, Matsuzaki T, Kinouchi R, Fujisawa S, Murakami M, Kiyokawa M, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Neonatal LPS injection alters the body weight regulation systems of rats under non-stress and immune stress conditions. *Int J Dev Neurosci* 2010;28(1):119-124.
3. Padoin MJ, Cadore LP, Gomes CM, Barros HMT, Lucion AB. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci* 2001;115:1332-1340.
4. Levine S. The psychoendocrinology of stress. *Ann. N. Y. Acad. of Science* 1993;697:61-69.
5. Meaney MJ, Seema B, LaRocque S, McCormick C, Shanks N, Sharma S, Smythe J, Viau V, Plotsky PM. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. *Ann. N. Y. Acad. Science* 1993;697:70-85.
6. Gomes CM, Frantz PJ, Sanvitto GL, Anselmo-Franci JA, Lucion AB. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:1239-1242.
7. Gomes CM, Rainecki C, Paula PR, Severino GS, Helena CVV, Anselmo-Franci JA, Franci CR, Sanvitto GL, Lucion AB. Neonatal handling and reproductive function in female rats. *J Endocrinol* 2005;184:435-445.
8. Lucion AB, Pereira FM, Winkelmann EC, Sanvitto GL, Anselmo-Franci JA. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. *Behavioral Neuroscience* 2003;117:894-903.
9. Gomes CM, Donadio MV, Franskoviaki I, Anselmo-Franci JA, Franci CR, Lucion AB, Sanvitto GL. Neonatal handling reduces angiotensin II receptor density in the medial preoptic area and paraventricular nucleus but not in arcuate nucleus and locus coeruleus of female rats. *Brain Research* 2006;1067(1):177-180.

10. Donadio MV, Jacobs S, Corezola KL, Melo DA, Dias HB, Reichel CL, Franci CR, Jeckel-Neto EA, Lulhier F, Lucion AB, Oliveira JR, Sanvitto GL. Neonatal handling reduces renal function in adult rats. *Kidney Blood Press Res* 2009;32(4):286-292.
11. Karrow NA. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system during inflammation and altered programming of the neuroendocrine-immune axis during fetal and neonatal development: lessons learned from the model inflammagen, lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* 2006;20(2):144-158.
12. Amani M, Samadhi H, Doosti MH, Azarfarin M, Bakhtiari A, Zolbanin NM, Rahimi MM, Salari AA. Neonatal NMDA receptor blockade alters anxiety- and depression-related behaviors in a sex-dependent manner in mice. *Neuropharmacology* 2013;73:87-97.
13. Benatti C, Alboni S, Capone G, Corsini D, Caggia F, Brunello N, Tascetta F, Blom JM. Early neonatal inflammation affects adult pain reactivity and anxiety related traits in mice: genetic background counts. *Int J Dev Neurosci* 2009;27(7):661-668.
14. Li XF, Jones JSK, Knox AMI, Wu XQ, Tahsinsoy D, Brain SD, Lightman SL, O'Byrne KT. Neonatal lipopolysaccharide exposure exacerbates stress-induced suppression of luteinizing hormone pulse frequency in adulthood. *Endocrinology* 2007;148:5984-5990.
15. Jenkins TA, Harte MK, Stenson G, Reynolds GP. Neonatal lipopolysaccharide induces pathological changes in parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the rat. *Behavioural Brain Research* 2009;205:355-359.
16. Walker AK, Nakamura T, Byrne RJ, Naicker S, Tynan RJ, Hunter M, Hodgson DM. Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34(10):1515-1525.
17. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Kinouchi R, Ogata R, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Neonatal lipopolysaccharide exposure attenuates the

- homotypic stress-induced suppression of LH secretion in adulthood in male rat. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2009;27:345-349.
18. Gilmer WS, McKinney WT. Early experience and depressive disorders: human and non-human primate studies. *Journal of Affective Disorders* 2003;75:97-113.
19. Gil AC. Como elaborar projetos de pesquisa. 4ªed. São Paulo: Atlas; 2006.
20. Hood KE, Dreschel NA, Granger DA. Maternal behavior changes after immune challenge of neonates with developmental effects on adult social behavior. *Dev Psychobiol* 2003;42(1):17-34.
21. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Kinouchi R, Shimizu F, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Neonatal immune challenge affects the regulation of estrus cyclicity and feeding behavior in female rats. *Int J Dev Neurosci* 2009;27(1):111-114.
22. Spencer SJ, Field E, Pittman QJ. Neonatal programming by neuroimmune challenge: effects on responses and tolerance to septic doses of lipopolysaccharide in adult male and female rats. *J Neuroendocrinol* 2010;22(4):272-281.
23. Kentner AC, McLeod SA, Field EF, Pittman QJ. Sex-dependent effects of neonatal inflammation on adult inflammatory markers and behavior. *Neuroendocrinology* 2010;151:2689-2699.
24. Boissé L, Spencera SJ, Mouihatea A, Vergnolle N, Pittman QJ. Neonatal immune challenge alters nociception in the adult rat. *Pain* 2005;119:133-141.
25. Knox AM, Li XF, Kinsey-Jones JS, Wilkinson ES, Wu XQ, Cheng YS, Milligan SR, Lightman SL, O'Byrne KT. Neonatal lipopolysaccharide exposure delays puberty and alters hypothalamic Kiss1 and Kiss1r mRNA expression in the female rat. *J Neuroendocrinol* 2009;21(8):683-689.
26. Tenk CM, Foley KA, Kavaliers M, Ossenkopp KP. Neonatal immune system activation with lipopolysaccharide enhances behavioural sensitization to the dopamine agonist, quinpirole, in adult female but not male rats. *Brain Behav Immun* 2007;21(7):935-945.

27. Li XF, Kinsey-Jones JS, Knox AM, Wu XQ, Tahsinsoy D, Brain SD, Lightman SL, O'Byrne KT. Neonatal lipopolysaccharide exposure exacerbates stress-induced suppression of luteinizing hormone pulse frequency in adulthood. *Endocrinology* 2007;148(12):5984-5990.
28. Shanks N, Windle RJ, Perks PA, Harbuz MS, Jessop DS, Ingram CD, Lightman SL. Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(10):5645-5650.
29. Walker AK, Nakamura T, Hodgson DM. Neonatal lipopolysaccharide exposure alters central cytokine responses to stress in adulthood in Wistar rats. *Stress* 2010;13(6):506-515.
30. Sominski L, Fuller EA, Bondarenko E, Ong LK, Averell L, Nalivaiko E, Dunkley PR, Dickson PW, Hodgson DM. Functional programming of the autonomic nervous system by early life immune exposure: implications for anxiety. *Plos One* 2013;8(3):1-13.
31. Walker FR, Hodyl NA, Krivanek KM, Hodgson DM. Early life host-bacteria relations and development: long-term individual differences in neuroimmune function following neonatal endotoxin challenge. *Physiology & Behavior* 2006;87:126-134.
32. Jenkins TA, Harte MK, Stenson G, Reynolds GP. Neonatal lipopolysaccharide induces pathological changes in parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the rat. *Behav Brain Res* 2009;205(2):355-359.
33. Spencer SJ, Galic MA, Pittman QJ. Neonatal programming of innate immune function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300:E11-E18.
34. Kumar V, Sharma A. Is neuroimmunomodulation a future therapeutic approach for sepsis? *Int Immunopharmacol* 2010;10(1):9-17.
35. Neumann ID, Veenema AH, Beiderbeck DI. Aggression and anxiety: social context and neurobiological links. *Front Behav Neurosci* 2010;4:1-12.
36. Frolkis I, Klein Y, Locker C, Adi N, Dahan E, Uretzsky G, Shapira I, Sorkine P. *Vipera aspis* venom reduces lethality and down-regulates tumor necrosis factor-alpha in a rat model of LPS-induced sepsis. *Cytokine* 2010;49(3):319-324.

37. Bilbo SD, Schwarz JM. The immune system and developmental programming of brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2012;33:267–286.

TABELA 1 - Resumo dos principais estudos que fazem uso de LPS como indutor de *programming* experimental neonatal.

Autor	Ano	Animal	Idade (dias) aplicação LPS	LPS (tipo e concentração)	Principais achados
Iwasa et al. ²	2010	Sprague-Dawley	10	100 µg/Kg	Aumento no peso corporal, aumento na ingestão de alimento, diminuição de citocinas no hipotálamo e aumento de leptina sérica.
Iwasa et al. ¹⁷	2009	Sprague-Dawley	10	100 µg/Kg	Prevenção da supressão do hormônio luteinizante e atenuação do aumento de citocinas hipotalâmicas.
Iwasa et al. ²¹	2009	Sprague-Dawley	10	100 µg/Kg	Prolongamento do ciclo estral, aumento na expressão hipotalâmica de urocortina 2 e receptores de corticotropina.
Spencer et al. ²²	2010	Sprague-Dawley	14	<i>Escherichia coli</i> 100 µg/Kg	Redução da hipotermia e aumento da hipertermia.
Kentner et al. ²³	2010	Sprague-Dawley	14	<i>Escherichia coli</i> 100 µg/Kg	Diminuição de interleucina-6 sérica e da expressão hipotalâmica de COX-2.
Boissé et al. ²⁴	2005	Sprague-Dawley	14	<i>Escherichia coli</i> 100 µg/Kg	Redução da expressão de COX-2 da medula espinhal.
Walker et al. ¹⁶	2009	Wistar	3 e 5	<i>Salmonella enterica</i> 50 µg/Kg	Aumento no comportamento de ansiedade e de corticosterona.
Knox et al. ²⁵	2009	Sprague-Dawley	3 e 5	<i>Escherichia coli</i> 50 µg/Kg	Diminuição da kisspeptina hipotalâmica.
Tenk et al. ²⁶	2007	Long-Evans	3 e 5	<i>Escherichia coli</i> 50 µg/Kg	Potencialização da ação da atividade locomotora do quimipirole em fêmeas.
Li et al. ²⁷	2007	Sprague-Dawley	3 e 5	<i>Escherichia coli</i> 50 µg/Kg	Aumento do hormônio luteinizante sérico e do receptor de corticotropina pré-óptica.
Shanks et al. ²⁸	2000	Sprague-Dawley	3 e 5	<i>Salmonella enteritidis</i> 50 µg/Kg	Aumento de corticosterona plasmática, diminuição de corticotropina e aumento de arginina-vasopressina em núcleo paraventricular.
Walker et al. ²⁹	2010	Wistar	3 e 5	<i>Salmonella enterica</i> 50 µg/Kg	Aumento da corticosterona plasmática, de interleucina-1 e do fator de necrose tumoral-α no hipocampo quando estresse por contenção.
Sominsky et al. ³⁰	2013	Wistar	3 e 5	<i>Salmonella enterica</i> 50 µg/Kg	Aumento no comportamento de ansiedade, aumento da corticosterona. Aumento do receptor de glicocorticoide provavelmente por um estado de resistência ao glicocorticoide.
Walker et al. ³¹	2006	Fischer-344	3 e 5	<i>Salmonella enteritidis</i> 50 µg/Kg	Atenuação da resposta febril.
Jenkins et al. ³²	2009	Lister-hooded	7 e 9	<i>Escherichia coli</i> 500 µg/Kg	Diminuição da parvalbumina em cortex pré-frontal.

Capítulo III

Artigo original

(Formatado de acordo com as normas da Revista *Inflammation*)

**Efeitos da inflamação no período neonatal sobre o perfil
inflamatório e oxidativo na sepse experimental na vida adulta**

**Effects of the neonatal inflammation on the inflammatory and
oxidative profile in the adult experimental sepsis**

Adroaldo Lunardelli¹, Leonardo Pedrazza¹, Carolina Luft¹,
Jarbas Rodrigues de Oliveira¹, Márcio Vinícius Fagundes Donadio^{2*}

¹Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brasil.

²Centro Infant, Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB), Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL PUCRS), Brasil.

*Endereço para correspondência: Prof. Márcio V. F. Donadio, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) – Centro Infant. Av. Ipiranga, 6690, 2º andar, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP 90610-000. Telefone/fax: +55 51 3320-3000 (ramal 2221). E-mail: mdonadio@pucrs.br

RESUMO

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos em longo prazo da inflamação no período neonatal sobre o perfil inflamatório e oxidativo na sepse experimental na vida adulta. Aos 10 dias de vida, camundongos Balb/c receberam diferentes tratamentos: nLPS, injeção i.p. de LPS (100 µg/Kg) ou nSal, injeção i.p. de solução salina. Quando adultos, foi avaliado o comportamento de medo/ansiedade (labirinto em cruz elevada) e administrada solução salina ou LPS (i.p.). Após 12 horas, foram coletados o soro (citocinas inflamatórias) e o fígado (complexos mitocondriais e estresse oxidativo). Houve aumento do comportamento de medo/ansiedade no grupo nLPS. Os complexos II e II-III aumentaram nos machos nLPS-salina quando comparados ao controle. A administração de LPS nas fêmeas adultas provocou uma diminuição da atividade da enzima glutatona reduzida. Não houve diferenças em relação às citocinas inflamatórias. A inflamação no período neonatal foi efetiva na indução do *programming* e o metabolismo da cadeia respiratória mitocondrial parece sofrer alterações dependentes do sexo neste modelo.

Palavras-chave: estresse neonatal; lipopolissacarídeo, comportamento, complexos mitocondriais, citocinas.

ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate the long-term effects of neonatal inflammation on the oxidative and inflammatory status in the experimental sepsis in adult life. On the tenth day after birth, Balb/c mice received different treatments: nLPS, i.p. LPS injection (100 µg/kg) or nSal, i.p. saline injection. As adults, the fear/anxiety behavior was evaluated (elevated plus maze) and saline solution or LPS (i.p.) were administered. After 12 hours, the serum (inflammatory cytokines) and the liver (mitochondrial complexes and oxidative stress) were collected. There was an increase in the fear/anxiety behavior in the nLPS group. The complexes II and II-III increased in the nLPS-saline group when compared to the control. The LPS administration in the adult females induced a decrease in the glutathione enzyme activity. There were no differences in the inflammatory cytokines. The inflammation in the neonatal period was effective to induce programming and the metabolism of the mitochondrial respiratory chain seems to be influenced in a sex-dependent manner in this model.

Keywords: neonatal stress; lipopolysaccharide, behavior; mitochondrial complexes; inflammatory cytokines.

1. Introdução

O período neonatal é um estágio muito importante no desenvolvimento neurológico [1], é um período caracterizado por grande plasticidade e reorganização [2]. Parece bem estabelecido que intervenções nestes períodos importantes provoquem efeito de *programming*, ou seja, uma “marca” no desenvolvimento de diferentes sistemas que permanece ao longo da vida. O conceito de *programming* tem sido desenvolvido para explicar o processo pelo qual um organismo se adapta aos eventos ambientais através da geração de alterações estáveis no fenótipo. Isto geralmente ocorre em períodos iniciais de desenvolvimento, fazendo com que a exposição a um ambiente adverso possa perturbar o processo de proliferação e diferenciação celular e tenha efeitos duradouros sobre a saúde do indivíduo [3].

A administração de LPS no período neonatal gera um estímulo imunológico estressante [4] capaz de estimular a expressão de citocinas no sistema nervoso central e causar alterações cerebrais em certas regiões do hipocampo de ratos adultos [5]. Postula-se que um primeiro estímulo (genético ou ambiental) durante períodos críticos do desenvolvimento atrapalha a ontogenia dos sistemas neurais, o que estabelece uma susceptibilidade a um segundo estímulo na vida adulta [6]. Este “duplo desafio” imunológico induz alterações funcionais do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), o que propicia concentrações circulantes das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α significativamente atenuadas [7], hiperalgesia [8], aumento na sensibilidade ao estresse e aumento do comportamento de ansiedade e depressão [9].

Diferenças sexuais na fisiologia e função do sistema imune periférico de vertebrados foram documentadas por décadas. Fêmeas de muitas espécies geralmente apresentam aumento da resposta imune e da resistência à infecção em comparação com machos. Estas diferenças entre os sexos têm sido atribuídas, em grande parte, às ações imunomoduladoras de hormônios esteróides sexuais. Em geral, o estradiol exógeno tem efeitos

estimulantes na imunidade humoral, mas pode aumentar ou suprimir a imunidade mediada por célula, dependendo da dose. A testosterona exógena geralmente deprime a imunidade tanto humoral como mediada por células, aumentando a susceptibilidade a infecções bacterianas e virais. Baseado na diferença entre o número de células gliais e os níveis de moléculas do sistema imune entre machos e fêmeas, é provável que haja efeitos sexo-dependentes na função do sistema neuroimune em resposta a um desafio imunológico na fase inicial da vida, fazendo com que machos e as fêmeas possam apresentar respostas diferentes à ativação neonatal do sistema imunológico [10].

As mitocôndrias são a principal fonte de ATP celular sendo que sua estrutura e função são significativamente afetadas por processos fisiopatológicos associados com a resposta do hospedeiro a patógenos invasores. A disfunção orgânica que ocorre no curso da sepse tem sido considerada como a consequência da parca disponibilidade de oxigênio devido a distúrbios hemodinâmicos da macro e microcirculação. É amplamente aceito que o comprometimento da função mitocondrial contribui significativamente para a falência de órgãos em pacientes sépticos [11]. Além disso, a produção mitocondrial de espécies reativas do oxigênio (ERO) é aumentada durante a resposta inflamatória da sepse. Tem sido sugerido que as ERO mitocondriais podem regular os níveis de NF- κ B nas células imune, induzindo a resposta inflamatória [12].

Considerando as evidências de que processos inflamatórios no período neonatal podem gerar alterações estáveis, a alta prevalência de situações adversas no início da vida e de estados graves na vida adulta, como a sepse, justifica-se os esforços na busca de dados relevantes ao melhor entendimento e manejo dessas situações. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos em longo prazo da inflamação no período neonatal sobre o perfil inflamatório e oxidativo na sepse experimental na vida adulta. Para isso, foram avaliadas a atividade dos complexos mitocondriais, o estresse oxidativo, as citocinas inflamatórias, além do perfil comportamental e de diferenças sexuais em camundongos Balb/c.

2. Materiais e Métodos

O trabalho foi realizado com camundongos Balb/c de laboratório mantidos em ambiente de temperatura controlada ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas, humidade entre 55 e 65% e com livre acesso a água e alimento. Os animais foram manipulados conforme o *Guiding Principles in the Care and Use of Animals* do Conselho da Sociedade Americana de Fisiologia. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul sob o número 11/00233.

Para a realização de todos os experimentos em animais adultos, houve inicialmente a divisão em dois grupos conforme o tratamento do animal no período neonatal. No décimo dia após o nascimento, a ninhada foi padronizada entre 5 e 8 animais e separada de sua progenitora por cinco minutos. Neste tempo, igual número de filhotes recebeu diferentes tratamentos, os alocando em dois grupos: nLPS, recebeu 100 μL de solução 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de LPS (*Escherichia coli* sorotipo O111:B4 Sigma-Aldrich dissolvida em solução salina – NaCl 0,9% - estéril) intraperitonealmente ou nSal (controle) em que foi administrado 100 μL de solução salina estéril também intraperitonealmente. Após o procedimento, a ninhada retornou ao convívio de sua progenitora até o 21º dia de vida quando do desmame. Após o desmame, os animais foram separados por sexo em caixas contendo aproximadamente de 3 a 5 animais, e nenhuma intervenção foi realizada até o momento dos experimentos.

2.1. Peso

Aos 49 dias de vida os animais foram pesados e submetidos aos experimentos que seguem.

2.2. Cruz elevada

O aparato consiste em dois braços abertos (30 x 5 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm) unidos equidistantemente de forma a produzir um campo central em comum (5 x 5 cm). As paredes e a base foram produzidas em material não abrasivo de cor preta e dista 66 cm do solo. O animal foi colocado no campo central com a face voltada para um dos braços abertos e permaneceu no aparato por dez minutos. Foi avaliado a distância percorrida, o tempo dispendido em cada braço ou campo central e o tempo de latência entre o início do teste e o ingresso do animal no braço aberto. O teste foi registrado por gravação em vídeo e analisado através do *software* Any-Maze (Stoelting).

2.3. Sepsis por LPS

Uma semana após a análise comportamental, os animais foram submetidos à administração intraperitoneal de solução salina ou LPS (indução séptica de 20 mg/Kg [13]) em igual volume final, sendo estratificados em quatro grupos experimentais: (i) nSal-Salina, animais que receberam solução salina aos dez dias de vida e solução salina quando adultos; (ii) nSal-LPS, animais que receberam solução salina aos dez dias de vida e LPS quando adultos; (iii) nLPS-Sal, animais que receberam LPS aos dez dias de vida e solução salina quando adultos; e (iv) nLPS-LPS, animais que receberam LPS aos dez dias de vida e LPS quando adultos.

Após 12 horas, os animais foram eutanasiados por decapitação para coleta de sangue que se prestou para a mensuração sérica de interferon gama (INF- γ), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator transformador de crescimento beta 1 (TGF- β 1) e interleucina 6 (IL-6). Foi recolhido – por laparotomia – o fígado dos camundongos e rapidamente colocado em gelo. O órgão foi homogeneizado (1:20 p/v) com tampão SETH (sacarose 250 mM, EDTA 2,0 mM, Trizma base 10 mM e heparina 50 UI/mL) pH 7,4 e centrifugado a 750 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi acondicionado a -70°C até a

dosagem de avaliação do estresse oxidativo, mensurando as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a glutatona reduzida (GSH), a superóxido dismutase (SOD) e o óxido nítrico (NO). Ainda no fígado, foi mensurada a atividade dos complexos mitocondriais II, II-III e IV. Para tal, o tecido foi submetido a três ciclos de congelamento a fim de expor o sítio catalítico das enzimas mitocondriais.

2.3.1. Dosagem de TGF- β 1

A concentração de TGF- β 1 foi dosada em soro utilizando kit comercial de enzimoimunoensaio (R&D Systems, USA). O kit contém anticorpos específicos monoclonais sensibilizados em placas de 96 poços que ligam TGF- β 1. A coloração é detectada em 540/570 nm em leitora de placa. Os resultados obtidos através de uma curva de calibração são expressos em μ g/mL.

2.3.2. Dosagem das citocinas

Múltiplas citocinas circulantes séricas (IFN- γ , TNF- α , IL-6 e MCP-1) são determinadas simultaneamente por citometria de fluxo utilizando o *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit* (BD Biosciences) na automação *FACSCanto II* (BD Biosciences). Os resultados quantitativos serão gerados pelo programa *FCAP Array v1.0.1* (Soft Flow Inc.).

2.3.3. Dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A lipoperoxidação resultante de lesões na membrana celular causa formação de malondialdeído e outras substâncias que aquecidas na presença de ácido tiobarbitúrico formam um composto rosado medido espectrofotometricamente a 532 nm. Os reagentes utilizados são o ácido tiobarbitúrico 0,67%, ácido tricloroacético 10% e álcool butílico [14].

2.3.4. Glutatona reduzida (GSH)

O ácido metafosfórico é adicionado às amostras e depois de centrifugado, é adicionado tampão fosfato pH 8,0, EDTA 5 mM e o-

ftaldialdeído 1 mg/mL. A fluorescência é medida usando excitação e emissão nos comprimentos de onda de 350 nm e 420 nm, respectivamente [14].

2.3.5. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A técnica utilizada para determinar a atividade da SOD se baseia na inibição da reação do radical superóxido (O_2^-) com adrenalina, que é um composto que se auto-oxida com a variação de pH. Em meio básico, a auto-oxidação da adrenalina gera O_2^- . A SOD presente na amostra compete pelo radical O_2^- com o sistema de detecção. A oxidação da adrenalina leva a formação de um produto colorido, o adrenocromo, detectado espectrofotometricamente. A atividade da SOD é determinada medindo a velocidade de formação do adrenocromo, observada a 480 nm, em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM em pH 10,2) e adrenalina 60 mM [15].

2.3.6. Dosagem de NO

A dosagem de NO é mensurada através da reação de Griess. O reagente de Griess (uma mistura de N-(1-naftil) etilenodiamina dihidroclorato e sulfanilamida) resulta em um pigmento rosa que pode ser determinado em espectrofotômetro em 540 nm [15].

2.3.7. Atividade dos complexos mitocondriais

A atividade da succinato-2,6-dicloroindofenol (DCIP)-oxidoreductase (complexo II), succinato:citocromo c oxidoreductase (complexo II-III) e citocromo c oxidase (complexo IV) foram analisadas conforme técnicas previamente descritas [16].

2.5. Análise estatística

Os resultados são expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) ou em percentual sobre o controle. Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para averiguar normalidade dos dados. As amostras foram processadas

por análise de variância de uma via (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni. Para os parâmetros comportamentais utilizou-se o teste de t de Student. Em todos os casos, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 17.0.

3. Resultados

Quando adultos, os animais foram submetidos à pesagem. Nenhuma diferença foi encontrada na comparação entre os grupos dentro do mesmo sexo. Os machos pesaram em média $24,56 \pm 0,23$ g e $24,76 \pm 0,16$ g nos grupos nSal e nLPS, respectivamente. As fêmeas têm peso, em média, de $20,55 \pm 0,36$ g e $20,14 \pm 0,30$ g nos mesmos respectivos grupos.

A análise comportamental no aparato de cruz elevada é mostrada na tabela 1. Os machos submetidos ao *programming* apresentaram maior tempo no braço fechado ($p < 0,014$) e menor tempo no campo central ($p < 0,034$) quando comparados ao grupo nSal. As fêmeas, além destes mesmos achados ($p < 0,018$ no braço fechado e $p < 0,037$ no quadrante central), ainda permaneceram menor tempo no braço aberto ($p < 0,021$). Os parâmetros de distância total percorrida e latência para entrada no braço aberto não mostraram diferenças entre os grupos.

A figura 1 mostra os resultados obtidos na atividade hepática dos complexos mitocondriais II (machos em 1A e fêmeas em 1B), II-III (machos em 1C e fêmeas em 1D) e IV (machos em 1E e fêmeas em 1F) nos diferentes grupos experimentais. Houve aumento significativo dos complexos II ($p < 0,023$) e II-III ($p < 0,013$) nos animais desafiados com LPS no período neonatal que receberam solução salina quando adultos (grupo nLPS-Sal) quando comparados ao controle que recebeu solução salina aos 10 dias de vida e na vida adulta. Tal achado é evidenciado somente nos camundongos machos (figura 1A e 1C) e indica um efeito de longo prazo na administração de LPS neonatal.

Na análise do estresse oxidativo, não encontramos variação na determinação de TBARS hepático nos diferentes grupos analisados como mostrado na figura 2A e 2B. Há, contudo, aumento significativo ($p < 0,002$ em machos; $p < 0,001$ em fêmeas) de SOD nos animais submetidos à aplicação de LPS na vida adulta independente do tratamento neonatal (figura 2C e 2D) quando comparados aos grupos que receberam solução salina na idade adulta. A administração de LPS nos animais adultos provocou uma diminuição ($p < 0,001$) da atividade da enzima GSH nas

fêmeas. No entanto, este efeito não foi demonstrado em machos, indicando diferenças sexuais na regulação desta resposta.

A figura 3A e 3B mostra o aumento do NO nos camundongos desafiados com LPS na vida adulta quando comparados aos que receberam solução salina na fase adulta, mostrando a resposta inflamatória do organismo à endotoxemia tanto em machos ($p < 0,001$) quanto em fêmeas ($p < 0,001$). Os mesmos grupos supracitados demonstram diminuição estatística da citocina anti-inflamatória TGF- β 1 (figura 3C e 3D) em machos ($p < 0,001$) e em fêmeas ($p < 0,001$).

Os marcadores TNF- α (figura 4A $p < 0,001$; e 4B $p < 0,001$), IL-6 (figura 4C $p < 0,001$; e 4D $p < 0,001$), INF- γ (figura 5A $p < 0,001$; e 5B $p < 0,001$) e MCP-1 (figura 5C $p < 0,001$; e 5D $p < 0,001$) mostram aumento significativo nos grupos submetidos à ação do LPS na fase adulta em comparação aos animais que receberam solução salina estéril na mesma época da vida. Os achados ocorreram independente do tratamento neonatal ou do sexo.

4. Discussão

Este trabalho mostra pela primeira vez um modelo de *programming* neonatal por LPS em camundongos, através do efetivo emprego do estresse imunológico na fase inicial da vida como indutor de alterações comportamentais em animais adultos. Além disso, exploramos os seus efeitos no estresse oxidativo hepático e no perfil das citocinas sistêmicas nos animais submetidos a um segundo estímulo com LPS.

Nosso estudo mostra que a administração neonatal de LPS não afeta o peso corporal em camundongos adultos de ambos os sexos. Corroborando com nosso trabalho, Spencer [17] mostra não haver qualquer diferenciação de peso em ratos submetidos à solução de LPS 100 mg/Kg no período neonatal mesmo em três diferentes dias (3, 7 ou 14) de indução de *programming*. A literatura é contraditória sobre este aspecto. Iwasa et al [18] mostra aumento do peso corpóreo, da ingestão de alimento e da concentração de leptina sérica em ratos adultos submetidos à administração de LPS no período neonatal (décimo dia de vida). Indica, contudo, que o mecanismo pelo qual estes eventos acontecem permanece obscuro, e que é controverso também o modo como o estresse imune neonatal afeta a regulação de peso corporal no adulto.

Para avaliação comportamental dos animais expostos ao LPS no período neonatal, foi empregado o aparato da cruz elevada. Este teste é um dos mais utilizados testes de comportamento na pesquisa de medo e ansiedade, sendo baseado no conflito entre a exploração e a aversão natural que roedores têm a espaços abertos e elevados [19]. Um comportamento típico de ansiedade é o maior tempo de permanência nos braços fechados da cruz elevada [20]. Notadamente, os camundongos desafiados com endotoxina aos 10 dias de vida priorizam os espaços dos braços fechados em detrimento dos braços abertos ou do quadrante central, demonstrando a efetividade do modelo experimental de *programming* em camundongos Balb/c. Este tipo de roedor ainda não havia sido contemplado pela literatura neste sentido. É conveniente salientar que não encontramos

alteração na distância percorrida pelo animal no aparelho se comparado ao grupo controle, demonstrando não haver comprometimento locomotor ou diminuição de atividade exploratória. Uma das observações mais consistentes é que a exposição ao LPS nos estágios iniciais de vida resulta em prole que, na idade adulta, demonstra aumento no comportamento de ansiedade e depressão [20]. Animais expostos à endotoxina durante a primeira semana de vida são mais responsivos ao estresse quando adultos, mostrando aumento de hormônio adenocorticotrópico (ACTH) e corticosterona, além de diminuição de receptores de glicocorticoides no hipotálamo, córtex frontal e hipocampo [21]. O eixo HPA desempenha papel primordial na regulação da função metabólica, seu efeito constitutivo é importante componente na resposta ao estresse [3], de tal sorte que alterações neste eixo hormonal são frequentemente associadas a distúrbios de ansiedade e depressão, bem como à violência e agressão. Ademais, evidência recente indica que estes resultados comportamentais não estão limitados aos animais expostos isoladamente, mas têm sido mostrados ao persistirem numa geração subsequente de descendentes, carregados por uma linha materna ou paterna dos animais previamente expostos ao LPS [20].

A sepse e suas consequências são a causa mais comum de morte nas unidades de terapia intensiva [22] apesar do avanço no desenvolvimento de antibióticos potentes e no progresso do manejo e tratamento de pacientes nestas unidades [23]. A administração de LPS experimentalmente em animais é utilizada como um modelo para o choque séptico induzido por bactérias gram-negativas [24]. A sepse causa lesão celular endotelial generalizada a partir da inflamação descontrolada e da falência de múltiplos órgãos [22]. Evidências sugerem uma reação inflamatória maciça resultante da liberação sistêmica de citocinas como caminho subjacente à sepse [25]. Frequentemente, a resposta inflamatória às lesões severas acaba gerando dano aos tecidos normais [26]. Sabendo que as espécies reativas de oxigênio desempenham papel importante no desenvolvimento da falência múltipla dos órgãos e choque séptico [27], decidimos investigar os efeitos do *programming* neonatal sobre os

complexos mitocondriais e sobre os marcadores de estresse oxidativo em modelo de sepse experimental.

A mitocôndria é uma organela intracelular existente na maioria das células eucarióticas, desempenhando importante papel na produção de ATP celular. Ela está envolvida na homeostasia celular, tendo importante papel na sinalização intracelular, apoptose, metabolismo de aminoácidos, lípidos, colesterol, esteróides e nucleotídeos. Contudo, a sua principal função é no metabolismo energético, β -oxidação dos ácidos graxos, ciclo da ureia e na via final comum de produção de ATP – cadeia respiratória [28]. Quatro complexos ligados à membrana mitocondrial formam a cadeia respiratória que sequencialmente transfere elétrons através de uma série de doadores e receptores, tendo o oxigênio comoceptor final [29]. Estes constituintes, bem como o complexo V (ATP sintetase) formam o sistema de fosforilação oxidativa, que fornece o ATP necessário à célula. Este sistema é o mecanismo final de todas as vias metabólicas para a produção de energia e qualquer alteração na cadeia respiratória mitocondrial tem consequências nesse sistema [28]. Nosso trabalho mostra que não há diminuição da atividade das cadeias mitocondriais nos grupos estudados. Pelo contrário, parece haver um efeito protetor basal – em animais não sépticos - do *programming* neonatal por aumentar significativamente a atividade dos complexos II e II-III dos camundongos que receberam LPS no primeiro período de vida em relação àqueles em que foi administrado solução salina. Tal evento só ocorre nos animais machos, mostrando que este efeito benéfico no aumento da capacidade de fosforilação oxidativa pode ter influência de hormônios sexuais. Segundo a literatura, a função mitocondrial se encontra reduzida em pacientes com estado de sepse, resultando depleção de ATP e, eventualmente, necrose celular [12]. Nosso estudo conflita com tal, pois não evidenciamos diminuição da atividade dos complexos mitocondriais nos grupos sépticos. É importante salientar que o modelo experimental de sepse por LPS pode distinguir, em alguns aspectos, da sepse clínica ou de outros modelos de indução. Ademais, os marcadores envolvidos são dinâmicos e, uma única análise em 12 horas após o evento indutor, pode não refletir toda a teia biológica envolvida na disfunção.

As mitocôndrias são uma importante fonte fisiológica de ERO, que são gerados devido à redução incompleta do oxigênio durante a respiração mitocondrial normal. As ERO são geradas em quantidades excessivas sob certas condições patológicas, atuando como mediador da via de sinalização apoptótica. Sob condições fisiológicas normais, as mitocôndrias contêm níveis suficientes de antioxidantes que evitam a geração de ERO e danos oxidativos. No entanto, em circunstâncias em que há excessiva produção mitocondrial de ERO ou quando os níveis de antioxidantes estão esgotados, o dano oxidativo mitocondrial ocorre [30]. A disfunção mitocondrial tem sido demonstrada em modelos animais de sepse. Além disso, já foi demonstrado dano estrutural mitocondrial hepático, estado redox alterado e depleção de antioxidantes em pacientes que morreram de sepse grave relacionada à gravidade da falência de órgãos. A ligação entre a sepse e dano mitocondrial tem sido descrita em várias avaliações. Danos causados pelo estresse oxidativo mediado pela mitocôndria, portanto, parece ser fundamental para a fisiopatologia da insuficiência de órgãos na sepse, sugerindo um papel terapêutico dos antioxidantes [31]. Num primeiro momento, nosso estudo mostra não haver descompensação mitocondrial por não diminuir a atividade dos complexos analisados em nenhum dos grupos sépticos experimentais e, ademais, mostramos que por isso não há efeito na formação de TBARS. Este marcador não encontra-se alterado em nenhum grupo séptico deste estudo. O malondialdeído (determinado pelo TBARS) é um produto da peroxidação lipídica induzida pelo excesso de ERO e largamente utilizado como um marcador de estresse oxidativo [13]. Contudo, ao analisarmos a SOD, nota-se claramente o aumento de sua atividade nos animais submetidos à dose séptica de LPS. Vários sistemas antioxidantes endógenos interagem dentro da mitocôndria para proteger contra danos causados por ERO, como por exemplo, a SOD [31]. No geral, os sistemas de defesa antioxidantes endógenos proporcionam homeostase eficaz no que diz respeito aos níveis de ERO dentro da célula supressora, bem como dentro da mitocôndria [32]. Parece haver, portanto, o efeito benéfico de aumento do mecanismo protetor. Sugerimos a hipótese de que o estresse oxidativo existe, mas não há detecção de alteração dos níveis de

TBARS pelo aumento compensatório e protetor da SOD, o agente antioxidante. Nosso trabalho mostra também, que o *programming* neonatal não gera diferença significativa nos parâmetros de estresse oxidativo analisados.

Na fisiologia normal, ERO e antioxidantes permanecem em equilíbrio, sendo que qualquer perturbação que gere abundância de ERO resulta em estresse oxidativo e danos às células, tecidos e órgãos. Para equilibrar o dano induzido por ERO, as células têm uma variedade de antioxidantes (GSH e SOD, por exemplo) que são eliminadores bem conhecidos de espécies reativas de oxigênio que impedem a peroxidação lipídica [33]. Em nosso trabalho encontramos diferentes comportamentos da GSH em relação ao sexo. Não encontramos diferenças entre os grupos experimentais quando em animais machos, contudo, os camundongos fêmeas submetidos à sepse apresentaram diminuição nos níveis de GSH. Parece haver, portanto, uma influência hormonal nos efeitos sobre este parâmetro. Já foi reportado menor quantidade de GSH em tecido hepático de ratos fêmeas comparado com machos [34]. É sabido que a GSH cerebral aumenta com o envelhecimento em ambos os sexos e é elevada em fêmeas em comparação com ratos machos, sendo que no cérebro de fêmeas, a atividade da GSH é provavelmente modulada diretamente por alterações relacionadas ao estrogênio [35]. Os hormônios sexuais têm efeito regulador sobre a atividade das enzimas antioxidantes do estresse oxidativo, sendo que o estrogênio afeta positivamente este sistema [34]. Por outro lado, não foi evidenciado efeito do *programming* neonatal na determinação da GSH.

Além da produção de ERO, a cadeia respiratória mitocondrial pode produzir óxido nítrico (que por si só tem um elétron não emparelhado e é, portanto, um radical livre) e outros subprodutos de óxido nítrico, as espécies reativas de nitrogênio [31]. O NO desempenha papel importante na inflamação [36], sendo que sua produção é aumentada durante a sepse [31]. Após a aplicação de LPS, grandes quantidades dos mediadores pró-inflamatórios, NO e prostaglandina E2 (PGE2), são gerados pela óxido nítrico sintase induzida e pela ciclooxigenase 2 (COX-2), respectivamente [37]. Corroborando com isso, nossos experimentos mostram o aumento

significativo na mensuração de NO nos grupos de animais submetidos à sepse por LPS. Não houve, contudo, qualquer modificação em comparação àqueles animais que foram submetidos à aplicação de LPS no período neonatal. Considerando que a sepse constitui uma resposta sistêmica à infecção, esta resposta engloba ambas as fases pró e anti-inflamatórias, que são marcadas pela geração sequencial de citocinas pró e anti-inflamatórias [24], já que a inflamação – e o subsequente dano tecidual – é um processo dinâmico, que é acionado por diversos mediadores [12]. Para avaliação deste perfil inflamatório, buscamos a mensuração de citocinas importantes na resposta sistêmica à infecção séptica. Quando se considera a imunopatofisiologia da sepse, parece importante reconhecer que a fase precoce da doença é caracterizada por liberação maciça e descontrolada de mediadores endógenos (TNF- α , IFN- γ , IL-1 e IL-6) em resposta ao estímulo infeccioso [38,39]. Ademais, estudos mostram o aumento de MCP-1 em modelos animais de sepse [40]. Neste sentido, encontramos concentrações elevadas de citocinas séricas nos animais submetidos à infecção sistêmica. Revelamos ainda que o aumento nos valores de TNF- α , IL-6, INF- γ e MCP-1 não são alterados pelo *programming* neonatal. Estudos anteriores em ratos Sprague-Dawley mostram concentrações circulantes das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β significativamente atenuadas em animais adultos duplamente tratados com LPS (no décimo quarto dia de vida e em idade adulta) em comparação aos controles [41]. Contudo, é interessante notar que os níveis de citocinas em ratos Fischer 344 adultos não são atenuadas (tratados por LPS no terceiro e quinto dias após o nascimento e na idade adulta) [42], indicando que mecanismos específicos podem estar ligados à dose, idade ou tipo de animal envolvido [7].

A partir de um determinado momento da sepse, passa-se a evidenciar mecanismos na tentativa de regulação anti-inflamatória. A liberação de mediadores anti-inflamatórios (como IL-10 e TGF- β), podem induzir uma resposta anti-inflamatória contra-regulatória levando a uma alteração no perfil de expressão de citocinas em um grande número de células do sistema imunológico. Pode-se especular que isso ocorre como uma medida de proteção, sempre que a infecção local não pode ser

suficientemente controlada [38]. A resposta do TGF- β desempenha papel na reparação do tecido e resolução de inflamação, demonstrando promoção de vários efeitos anti-inflamatórios [43]. Os resultados encontrados pelo nosso estudo mostram diminuição do TGF- β 1 em animais sépticos independente do estímulo neonatal. Apesar de um estudo mostrar queda não significativa de TGF- β em 24 horas após a administração de LPS [44], o decréscimo desta citocina conflita com a literatura, que demonstra aumento dos seus níveis. É conveniente salientar que há flutuação das concentrações séricas das citocinas conforme o estágio da sepse, e uma única avaliação em 12 horas pode refletir um estado de inflamação maciça.

Assim, em conjunto, os resultados do presente estudo indicam que a inflamação no período neonatal foi efetiva na indução do *programming* em camundongos Balb/c, evidenciado pelo aumento do comportamento de medo e ansiedade. O metabolismo da cadeia respiratória mitocondrial parece ser influenciado pela inflamação neonatal em animais machos. Influências da modulação de hormônios sexuais podem ter papel em alguns destes efeitos e merecem ser estudados com mais detalhes. Por outro lado, o estresse neonatal por LPS parece não alterar o perfil inflamatório das citocinas no modelo de sepse experimental. Estudos adicionais avaliando diferentes janelas temporais após indução de sepse poderiam contribuir para um melhor entendimento sobre este tema de reconhecida importância.

5. Referências bibliográficas

- [1] Amani M, Samadhi H, Doosti MH, Azarfarin M, Bakhtiari A, Zolbanin NM, Rahimi MM, Salari AA. Neonatal NMDA receptor blockade alters anxiety- and depression-related behaviors in a sex-dependent manner in mice. *Neuropharmacology* 2013;73:87-97.
- [2] Benatti C, Alboni S, Capone G, Corsini D, Caggia F, Brunello N, Tascetta F, Blom JM. Early neonatal inflammation affects adult pain reactivity and anxiety related traits in mice: genetic background counts. *Int J Dev Neurosci* 2009;27(7):661-8.
- [3].. Xiong F, Zhang L. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2013;34:27-46.
- [4] Li XF, Jones JSK, Knox AMI, Wu XQ, Tahsinsoy D, Brain SD, Lightman SL, O'Byrne KT. Neonatal lipopolysaccharide exposure exacerbates stress-induced suppression of luteinizing hormone pulse frequency in adulthood. *Endocrinology* 2007;148:5984-5990.
- [5] Jenkins TA, Harte MK, Stenson G, Reynolds GP. Neonatal lipopolysaccharide induces pathological changes in parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the rat. *Behavioural Brain Research* 2009;205:355-359.
- [6] Walker AK, Nakamura T, Byrne RJ, Naicker S, Tynan RJ, Hunter M, Hodgson DM. Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34(10):1515-25.
- [7] Spencer SJ, Galic MA, Pittman QJ. Neonatal programming of innate immune function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300:E11-E18.
- [8] Boissé L, Spencera SJ, Mouihatea A, Vergnolle N, Pittman QJ. Neonatal immune challenge alters nociception in the adult rat. *Pain* 2005;119:133-141.

- [9] Neumann ID, Veenema AH, Beiderbeck DI. Aggression and anxiety: social context and neurobiological links. *Front Behav Neurosci* 2010;4:1-12.
- [10] Schwarz JM, Bilbo SD. Sex, glia, and development: interactions in health and disease. *Hormones and Behavior* 2012;62:243–253.
- [11] Wendel M, Heller AR. Mitochondrial function and dysfunction in sepsis. *Wien Med Wochenschr* 2010;160:118–123.
- [12] Hirsiger S, Simmen HP, Werner CM, Wanner GA, Rittirsch D. Danger signals activating the immune response after trauma. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:1-10.
- [13] Qiao Y, Bai XF, Du YG. Chitosan oligosaccharides protect mice from LPS challenge by attenuation of inflammation and oxidative stress. *Int Immunopharmacol* 2011;11(1):121-7.
- [14] Zanatta A, Viegas CM, Tonina AM, Busanello ENB, Grings M, Moura AP, Leipnitz G, Wajner M. Disturbance of redox homeostasis by ornithine and homocitrulline in rat cerebellum: a possible mechanism of cerebellar dysfunction in HHH syndrome. *Life Sciences* 2013;93:161–168.
- [15] Zanatta A, Moura AP, Tonin AM, Knebel LA, Grings M, Lobato VA, Ribeiro CAJ, Dutra-Filho CS, Leipnitz G, Wajner M. Neurochemical evidence that the metabolites accumulating in 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency induce oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Cell Mol Neurobiol* 2013;33:137–146.
- [16] Scaini G, Simon KR, Tonin AM, Busanello ENB, Moura AP, Ferreira GC, Wajner M, Streck EL, Schuck PF. Toxicity of octanoate and decanoate in rat peripheral tissues: evidence of bioenergetic dysfunction and oxidative damage induction in liver and skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 2012;361:329–335.
- [17] Spencer SJ, Mouihate A, Galic MA, Ellis SL, Pittman QJ. Neonatal immune challenge does not affect body weight regulation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293(2):R581-9.
- [18] Iwasa T, Matsuzaki T, Kinouchi R, Fujisawa S, Murakami M, Kiyokawa M, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Neonatal LPS injection alters the body weight regulation systems of rats under non-stress and immune stress conditions. *Int J Dev Neurosci* 2010;28(1):119-24.

- [19] Bourin M, Petit-Demouliere, Dhonnchadha BN, Hascoet M. Animal models of anxiety in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 2007;21(6):567-74.
- [20] Sominski L, Fuller EA, Bondarenko E, Ong LK, Averell L, Nalivaiko E, Dunkley PR, Dickson PW, Hodgson DM. Functional programming of the autonomic nervous system by early life immune exposure: implications for anxiety. *Plos One* 2013;8(3):1-13.
- [21] Shanks N, Windle RJ, Perks PA, Harbuz MS, Jessop DS, Ingram CD, Lightman SL. Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(10):5645-50.
- [22] Lin LC, Chen YY, Lee WT, Chen HL, Yang RC. Heat shock pretreatment attenuates sepsis-associated encephalopathy in LPS-induced septic rats. *Brain Dev* 2010;32(5):371-7.
- [23] Ramnath RD, Ng SW, Guglielmotti A, Bhatia M. Role of MCP-1 in endotoxemia and sepsis. *Int Immunopharmacol* 2008;8(6):810-8.
- [24] Frolkis I, Klein Y, Locker C, Adi N, Dahan E, Uretzsky G, Shapira I, Sorkine P. Vipera aspis venom reduces lethality and down-regulates tumor necrosis factor-alpha in a rat model of LPS-induced sepsis. *Cytokine* 2010;49(3):319-24.
- [25] Nunes FB, Graziottin CM, Alves Filho JCF, Lunardelli A, Caberlon E, Peres A, Oliveira JR. Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes. *International Immunopharmacology* 2003;3:267-272.
- [26] Santos RCV, Lunardelli A, Caberlon E, Bastos CMA, Nunes FB, Pires MGS, Biolchi V, Paul EL, Vieira FBC, Aquino ARC, Corseuil E, Oliveira JR. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of Ulomoides dermestoides on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. *Inflammation* 2010;33(3):173-179.
- [27] Ritter C, Andrades ME, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira JCF, Dal-Pizzol F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med* 2004;32:342-349.

- [28] Ferreira M, Aguiar T, Vilarinho L. Cadeia respiratória mitocondrial: aspectos clínicos, bioquímicos, enzimáticos e moleculares associados ao déficit do complexo I. *Arquivos de Medicina* 2008;22:49-56.
- [29] Ishii T, Miyazawa M, Onouchi H, Yasuda K, Hartman OS, Ishii N. Model animals for the study of oxidative stress from complex II. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013;1827:588–597.
- [30] Pramanik KC, Boreddy SR, Srivastava SK. Role of mitochondrial electron transport chain complexes in capsaicin mediated oxidative stress leading to apoptosis in pancreatic cancer cells. *Plos One* 2011; 6(5):1-16.
- [31] Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *British Journal of Anaesthesia* 2011;107(1):57–64.
- [32] Muravchick S, Levy RJ. Clinical implications of mitochondrial dysfunction. *Anesthesiology* 2006;105:819–37.
- [33] Sharma L, Kaur J, Rishi P, Shukla G. *Plasmodium berghei*: influence of infection on the oxidant and antioxidants levels in pregnant BALB/c mice. *Experimental Parasitology* 2012;131:215–222.
- [34] Bal E, Ilgin S, Atli O, Ergun B, Sirmagul B. The effects of gender difference on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Hum Exp Toxicol* 2013;32:766-774.
- [35] Evsen MS, Ozler A, Gocmez C, Varol S, Tunc SY, Akil E, Uzar E, Kaplan I. Effects of estrogen, estrogen/progesterone combination and genistein treatments on oxidant/antioxidant status in the brain of ovariectomized rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2013;17:1869-1873.
- [36] Lunardelli A, Leite CE, Pires MGS, Oliveira JR. Extract of the bristles of *Dirphia* sp. increases nitric oxide in a rat pleurisy model. *Inflammation Research* 2006;55:129–135.
- [37] Kang CH, Han SH, Koo JR, So JS. *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* extract inhibits the production of nitric oxide and PGE2 through inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in RAW 264.7 cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2013;18:501-506.

- [38] Schefold JC, Hasper D, Volk HD, Reinke P. Sepsis: time has come to focus on the later stages. *Medical Hypotheses* 2008;71:203–208.
- [39] Albayrak A, Halici Z, Polat B, Karakus E, Cadirci E, Bayir Y, Kunak S, Karcioğlu SS, Yigit S, Unal D, Atamanalp SS. Protective effects of lithium: a new look at an old drug with potential antioxidative and anti-inflammatory effects in an animal model of sepsis. *International Immunopharmacology* 2013;16:35–40.
- [40] Ramnath RD, Ng SW, Guglielmotti A, Bhatia M. Role of MCP-1 in endotoxemia and sepsis. *Int Immunopharmacol* 2008;8(6):810-8.
- [41] Ellis S, Mouihate A, Pittman QJ. Early life immune challenge alters innate immune responses to lipopolysaccharide: implications for host defense as adults. *FASEB J* 2005;19:1519–1521.
- [42] Walker FR, Hodyl NA, Krivanek KM, Hodgson DM. Early life host–bacteria relations and development: long-term individual differences in neuroimmune function following neonatal endotoxin challenge. *Physiology & Behavior* 2006;87:126-134.
- [43] Yeha FL, Shenb HD, Fanga RH. Deficient transforming growth factor β and interleukin-10 responses contribute to the septic death of burned patients. *Burns* 2002;28:631–637.
- [44] Ren y, Xie Y, Jiang G, Fan J, Yeung J, Li W, Tam PKH, Savill J. Apoptotic cells protect mice against lipopolysaccharide-induced shock. *Journal of Immunology* 2008;180:4978–4985.

Tabela 1. Avaliação comportamental dos grupos experimentais no aparato de cruz elevada.

	Machos		Fêmeas	
	nSal	nLPS	nSal	nLPS
Braço fechado (s)	350,2±28,1	438,4±19,1*	344,5±62,2	470,3±12,8*
Campo central (s)	189,4±25,7	120,5±17,6*	189,9±38,1	116,8±12,5*
Braço aberto (s)	60,3±6,3	41,1±8,9	65,5±27,2	12,9±4,3*
Distância (m)	12,7±0,8	12,5±0,9	9,9±1,6	14,0±1,5
Latência (s)	18,2±10,9	73,4±28,15	9,3±4,5	33,1±11,5

nSal: administração de solução salina no décimo dia de vida; nLPS: administração de LPS no décimo dia de vida; latência: tempo entre o início do procedimento e o ingresso do animal ao braço aberto. Dados expressos em média ± EPM. *p<0,05 quando comparado ao grupo nSal no mesmo sexo. n = 8-18.

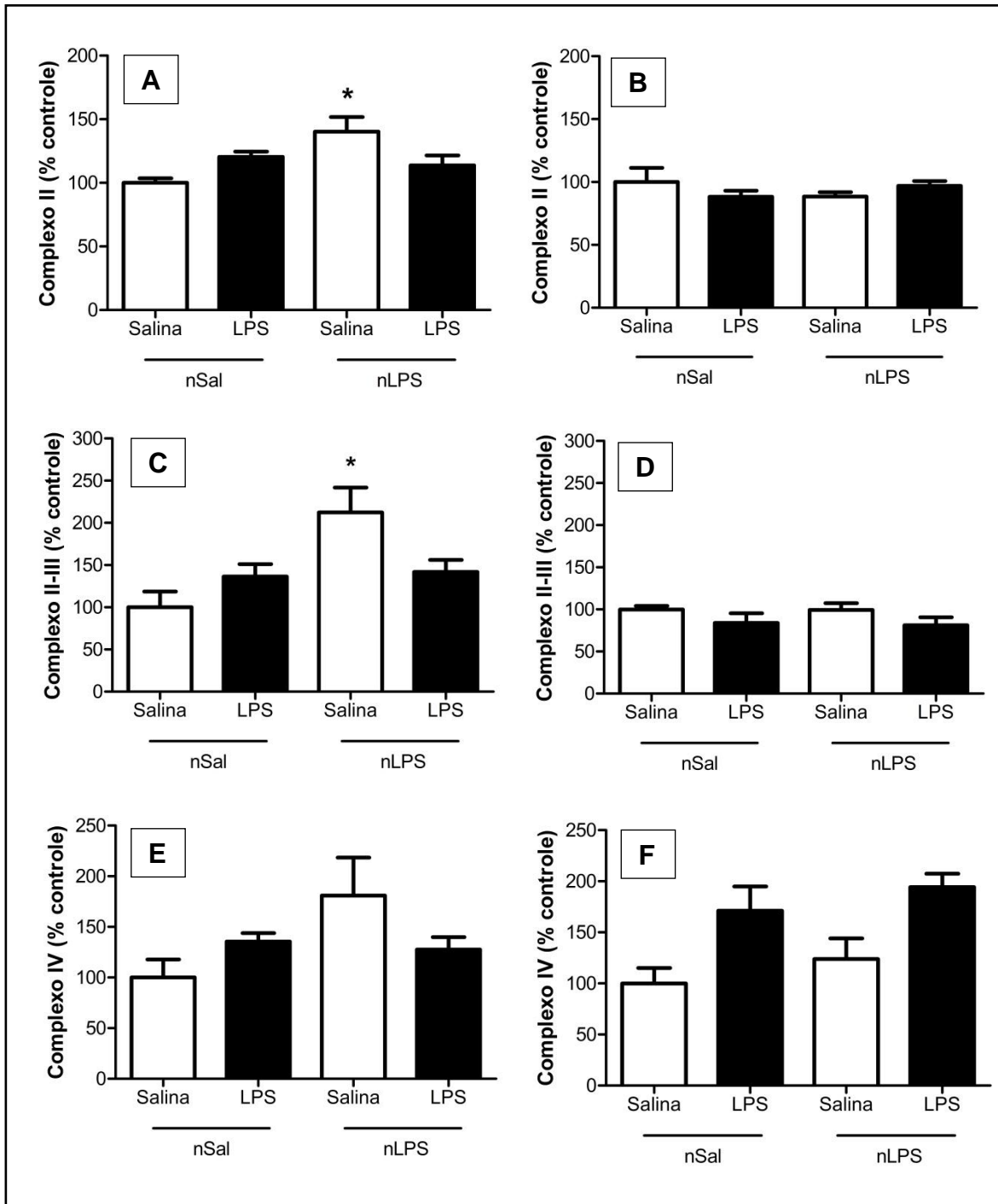


Figura 1. Atividade dos complexos mitocondriais II (machos em A e fêmeas em B), II-III (machos em C e fêmeas em D) e IV (machos em E e fêmeas em F) hepático nos grupos experimentais. nSal: administração de solução salina no décimo dia de vida; nLPS: administração de LPS no décimo dia de vida. Dados expressos em % sobre o controle \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo nSal-Salina. $n = 5-11$.

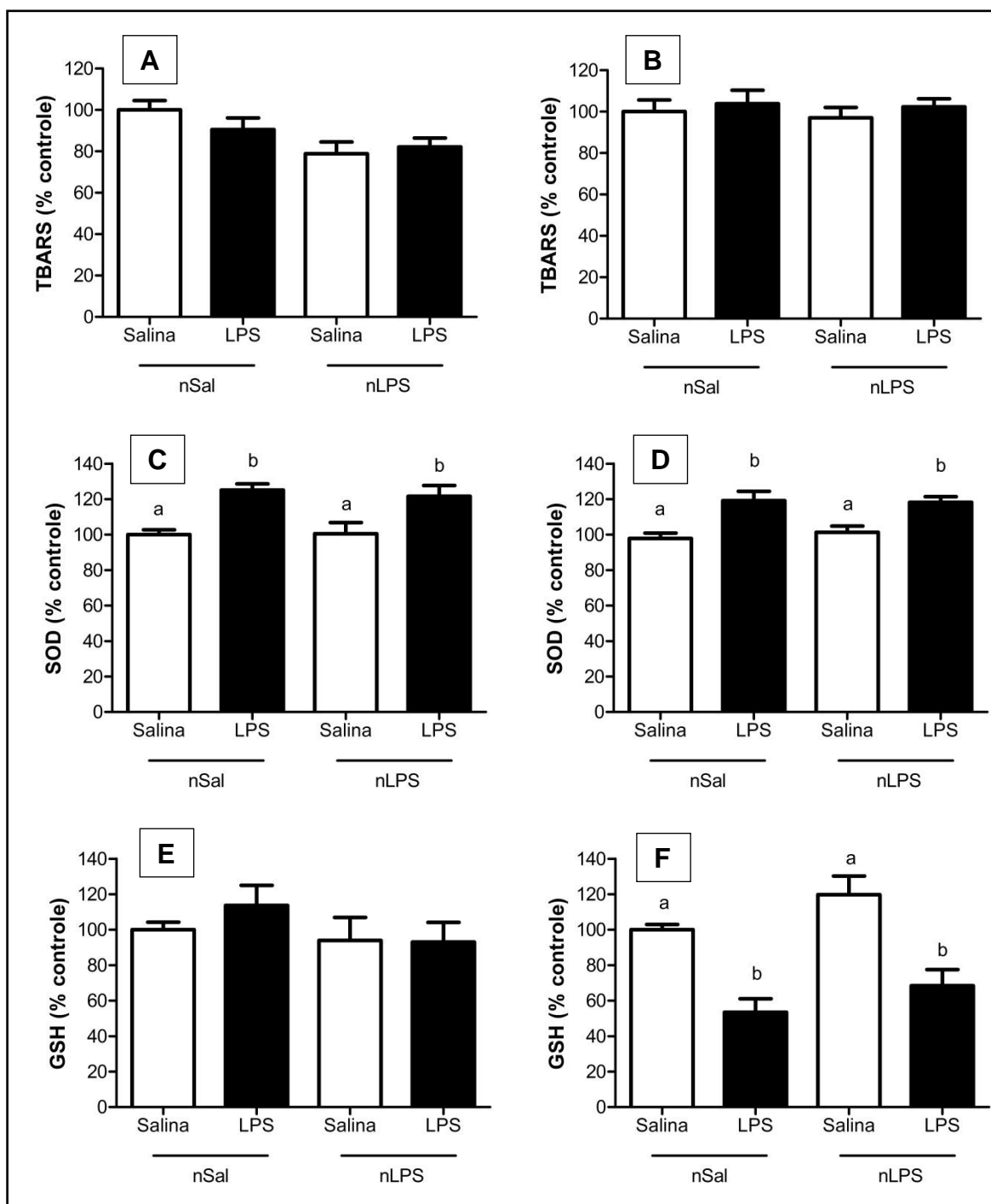


Figura 2. Determinação de TBARS (machos em A e fêmeas em B), SOD (machos em C e fêmeas em D) e GSH (machos em E e fêmeas em F) hepático nos grupos experimentais. nSal: administração de solução salina no décimo dia de vida; nLPS: administração de LPS no décimo dia de vida. Dados expressos em % sobre o controle \pm EPM. Letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). $n = 5-11$.

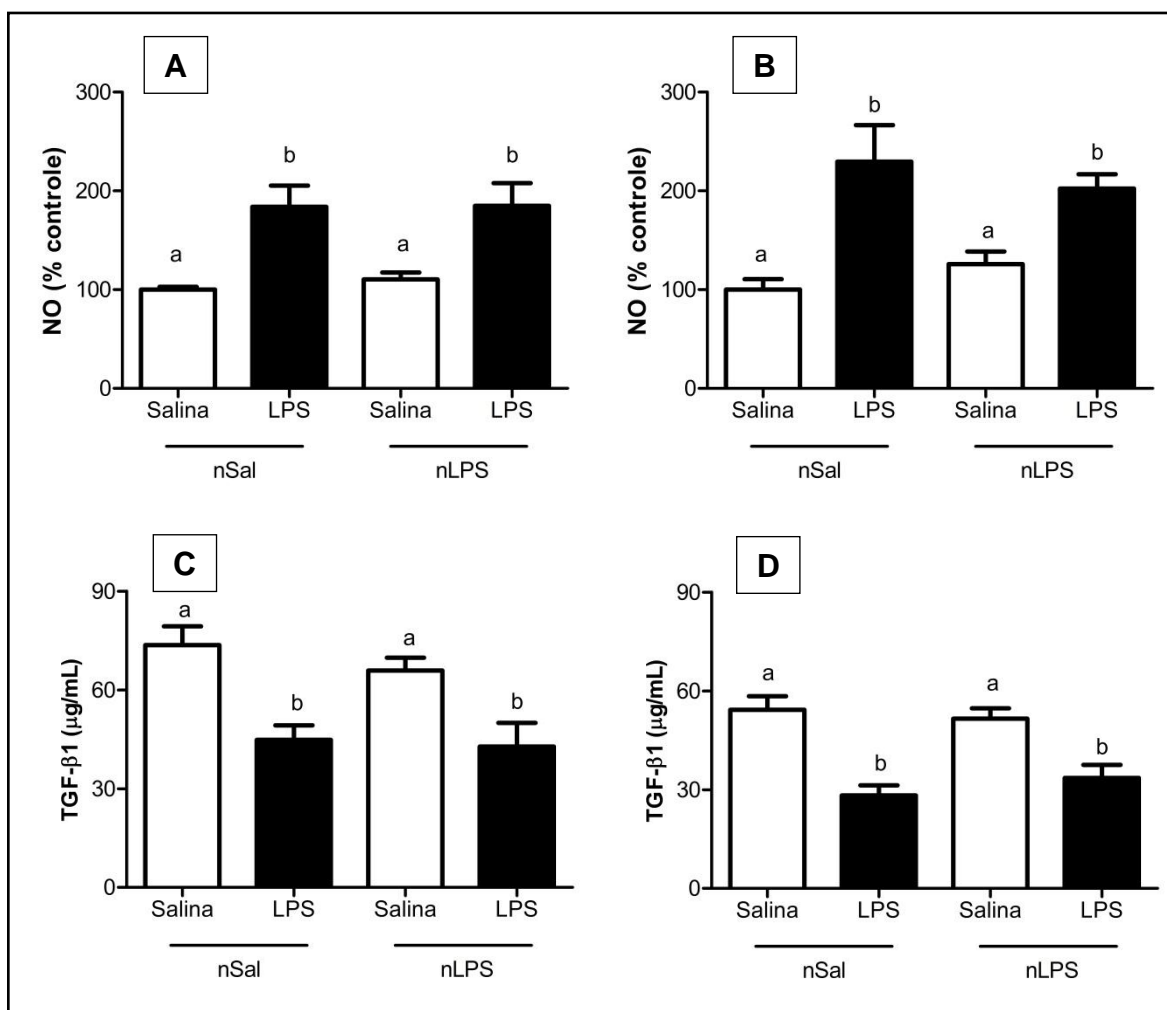


Figura 3. Determinação de NO (machos em A e fêmeas em B) hepático expresso em % sobre o controle \pm EPM e TGF- β 1 (machos em C e fêmeas em D) sérico expresso em média \pm EPM nos grupos experimentais. nSal: administração de solução salina no décimo dia de vida; nLPS: administração de LPS no décimo dia de vida. Letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). $n = 5-11$.

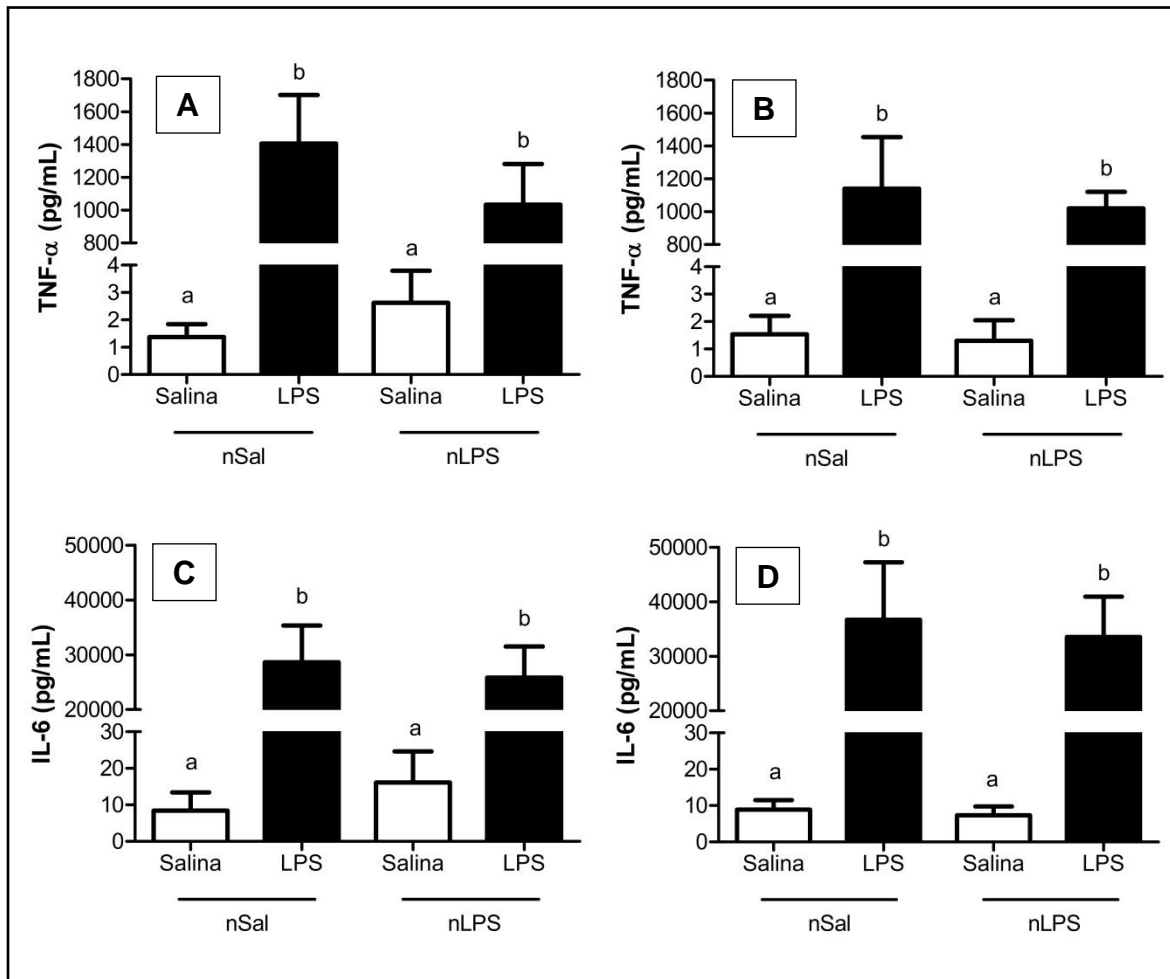


Figura 4. Concentração sérica de TNF- α (machos em A e fêmeas em B) e IL-6 (machos em C e fêmeas em D) nos grupos experimentais. nSal: administração de solução salina no décimo dia de vida; nLPS: administração de LPS no décimo dia de vida. Dados expressos em média \pm EPM. Letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). $n = 5-11$.

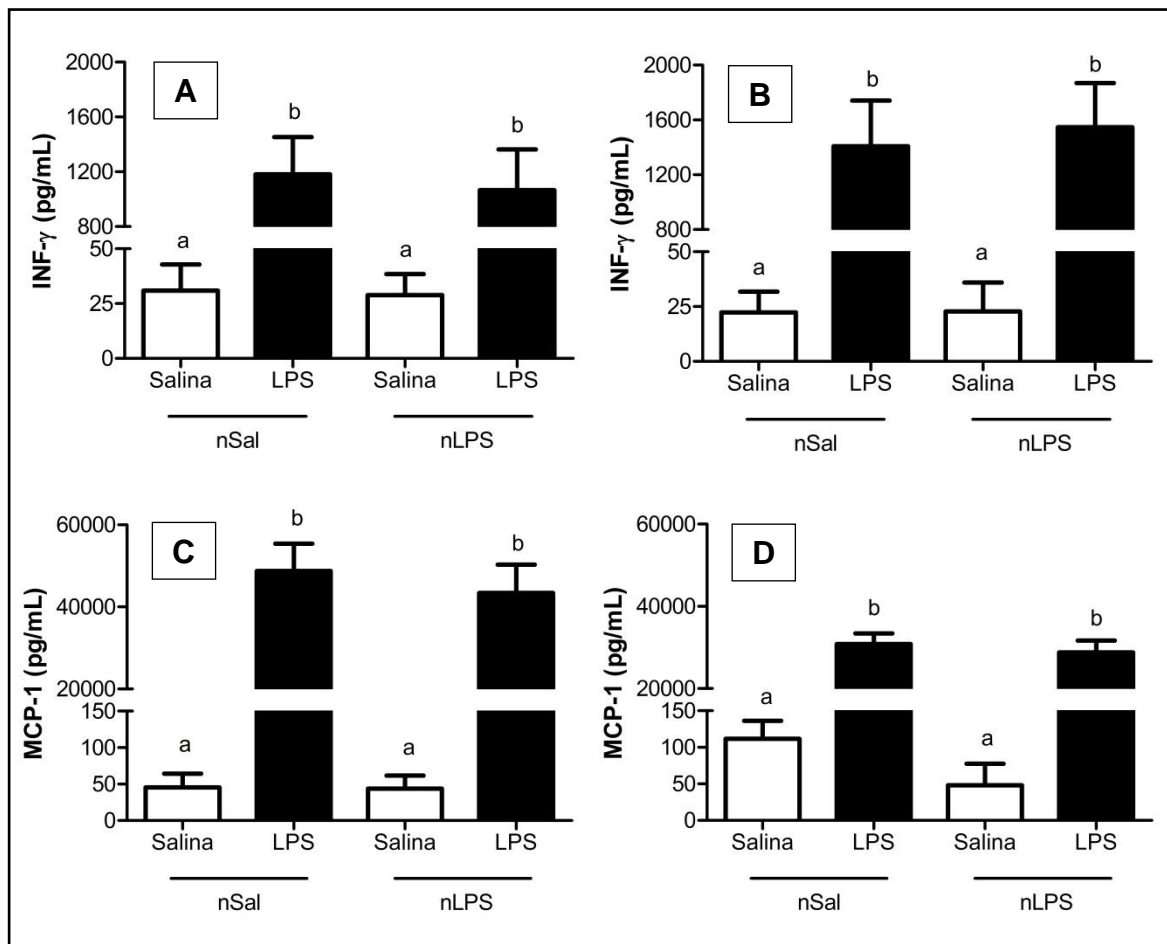


Figura 5. Concentração sérica de INF- γ (machos em A e fêmeas em B) e MCP-1 (machos em C e fêmeas em D) nos grupos experimentais. nSal: administração de solução salina no décimo dia de vida; nLPS: administração de LPS no décimo dia de vida. Dados expressos em média \pm EPM. Letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). $n = 5-11$.

Capítulo IV

Conclusão

Conclusão

Em conjunto, esta tese revisa e desmembra um modelo de estudo experimental animal no entendimento dos efeitos a longo prazo do estresse no período neonatal. Apesar de, à luz da literatura atual, permanecer obscuro os mecanismos fisiológicos precisos que levam ao *programming*, a indução desta marca em roedores utilizando-se LPS neonatal apresenta evidências sólidas, demonstrado, entre outros, pelas alterações funcionais estáveis do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Além disso, os resultados do presente estudo indicam que a inflamação no período neonatal foi efetiva na indução do *programming* em camundongos Balb/c, evidenciado pelo aumento do comportamento de medo e ansiedade. O metabolismo da cadeia respiratória mitocondrial parece ser influenciado pela inflamação neonatal em animais machos. Por outro lado, diferenças encontradas entre machos e fêmeas demonstram que a influência da modulação de hormônios sexuais podem ter papel em alguns destes efeitos. Ainda, o estresse neonatal por LPS parece não alterar o perfil inflamatório das citocinas no modelo de sepse experimental utilizado. Futuros esforços avaliando diferentes janelas temporais após indução de sepse poderiam contribuir para um melhor entendimento sobre este tema de reconhecida importância.