



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
LETÍCIA VENTURA

ENVOLVIMENTO DO INFLAMASSOMA NLRP3 NO COMPORTAMENTO
RELACIONADO À ESQUIZOFRENIA EM ANIMAIS JOVENS EXPOSTOS A
ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA

Palhoça
2018

LETÍCIA VENTURA

**ENVOLVIMENTO DO INFLAMASSOMA NLRP3 NO COMPORTAMENTO
RELACIONADO À ESQUIZOFRENIA EM ANIMAIS JOVENS EXPOSTOS
A ATIVAÇÃO IMUNE MATERNA**

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção do
título de Mestre (a) em Ciências da
Saúde.

Orientador Profa. Clarissa Martinelli Comim, Dr^a.

Palhoça 2018

V57 Ventura, Letícia, 1994-
Envolvimento do inflamassoma NLRP3 no comportamento
relacionado à esquizofrenia em animais jovens expostos a ativação
imune materna / Letícia Ventura. – 2018.
53 f. : il. color ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-
graduação em Ciências da Saúde.
Orientação: Prof. Clarissa Martinelli Comim

1. Sistema imune. 2. Sistema nervoso central - Doenças. 3.
Esquizofrenia. 4. Doenças mentais. I. Comim, Clarissa Martinelli. II.
Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.079

Ficha catalográfica elaborada por Carolini da Rocha CRB 14/1215



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Envolvimento do inflamassoma NLRP3 no comportamento relacionado à esquizofrenia em animais jovens expostos a ativação imune materna

LETÍCIA VENTURA

AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 20 de novembro de 2018.

Doutora Clarissa Martinelli Comim (orientador) _____

Doutora Talita Tuon (Avaliador externo - UFSC) _____

Doutora Aline Daiane Schlindwein (avaliador interno - PPGCS) _____

Professor Doutor Jefferson Traebert

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

RESUMO

Introdução: A ativação imune materna (AIM) pode ser uma via compartilhada, conferindo riscos ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos como a Esquizofrenia. Doenças que envolvem o sistema nervoso central (SNC) apresentam quadro neuroinflamatório, com o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 β (IL- 1 β) a qual se torna madura através da ativação do complexo molecular do inflamassoma NLRP3, sendo ativado pelo lipopolisacarídeos (LPS). **Objetivo:** Avaliar o envolvimento do inflamassoma NLRP3 no comportamento relacionado à esquizofrenia em animais jovens expostos a ativação imune materna. **Métodos:** Os animais foram acasalados durante 24 horas. No 15º dia gestacional, as fêmeas receberam uma injeção i.p de LPS para indução do modelo de AIM. Quando os animais completaram 7, 14 e 45 dias pós-natais, foram submetidos a MIA e dissecado o cérebro total para análise bioquímica da expressão do complexo do inflamassoma NLRP3 e níveis de IL-1 β , através do uso de Western Blot e ELISA, respectivamente. Os animais com 45 dias foram submetidos aos testes comportamentais de atividade locomotora, interação social e movimentos estereotipados. **Resultados:** Os animais apresentaram comportamento do tipo esquizofrênico aos 45 dias de vida nas variáveis de atividade locomotora, interação social e aumento do número de movimentos estereotipados. Na análise bioquímica, os resultados mostram a expressão aumentada da ativação do complexo do inflamassoma e do níveis de IL-1 β nos dias 7, 14 e 45 de vida. **Conclusão:** Os dados observados neste estudo mostram que a ativação imune materna pode estar associada a um comportamento relacionado a esquizofrenia com parâmetros inflamatórios e locomotores alterados. Estas evidências podem basear futuros estudos sobre a relação entre neuroinflamação e transtornos psiquiátricos.

Descritores: Ativação Imune Materna, Inflamassoma NLRP3, Esquizofrenia, Desordens Psiquiátricas

ABSTRACT

Introduction: In the course of brain development, all changes, such as maternal or insecticidal or inflammatory exposure, may compromise the development of fetal brain function. Maternal immune activation (MAI) may be a shared pathway, endangering the development of psychiatric disorders such as schizophrenia, where it is a psychiatric disorder related to neurodevelopment. Diseases involving the central nervous system (CNS) neuroinflammatory framework, with the involvement of proinflammatory cytokines such as interleukin 1 β (IL-1 β), which becomes mature through the activation of the molecular complex of the NLRP3 inflammation, being activated by lipopolysaccharides (LPS)

Objective: To evaluate the involvement of NLRP3 non-schizophrenia-related inflammation in young animals exposed to maternal immune activation.

Methods: The animals were mated for 24 hours, and after, were evaluated or not of a vaginal. On the 15th gestational day, as the probes received an injection of LPS for the experimental group and PBS for the control of the induction of the AIM model. The day of birth of the animals was defined as P0, when they completed 7 and 14 days postnatal, were submitted to MIA and dissected the brain for biochemical analysis of the expression of the inflammatory complex NLRP3 and levels of IL-1 β , as well as the Os animals that completed 45 days and were submitted to behavioral tests of locomotion, social interaction and stereotyped and later biochemical analysis of the same parameters, through the use of Western Blot and ELISA, respectively.

Results: Young animals, from the prenatal exposure to the LPS, the schizophrenic type behavior at 45 days of age in the locomotion variables, with the increase in the number of crosses, social interaction through the increase in latency, number and the total contact time and the increase in the number of stereotyped movements. In the biochemical analysis, the results of the tests were increased in the activation of the inflammation complex on days 7, 14 and 45 of life, as well as levels of IL-1 β were also raised in the day, remaining high in 14 and 45.

Conclusion: The data observed in this study show that the activation is related to the communication of a squamophrenic with communication characteristics and altered locomotives. These evidences may be based on studies between neuroinflammation and psychiatric disorders.

Descriptors: Maternal Immune Activation, Inflamasome NLRP3, Schizophrenia

Lista de abreviaturas

AIM - Ativação Imune Materna

AP-1 - Ativador de proteína 1

ASC - Proteína Associada à Apoptose

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais Experimentais

CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX - cicloxygenase

DAMPs - Padrões Moleculares Associados a Danos

ERO - Espécie Reativa de Oxigênio

GFAP - Proteína Glial Fibrilar Ácida

i.p - intraperitoneal

IFN - Interferon

IFNAR - receptor IFN α/β

IL-1 β - Interleucina 1 β

iNOS - Óxido Nítrico Síntese induzível

Interferon - IFN

IRAK - receptor de interleucina

LANEX – Laboratório de Neurociência Experimental

LBP - Proteína ligadora de lipopolissacarídeo

LPS - Lipopolissacarídeo

MIA – Morte indolor assistida

NF- κ B - Fator de Transcrição Nuclear kappa B

NLR - Receptores do Tipo NOD/ Nod-Like Receptors

NLRP-3 - *pyrindomain-containing3*

OMS – Organização Mundial Da Saúde

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

PBS - tampão fosfato salina

PolyI:C - Ácido poliinosínico-
 policitidílico PRR - Receptor
 Reconhecedor De Padrões Rna -
 Ácido Ribonuléico
 SBNeC - Sociedade Brasileira de Neurociências e
 comportamento SNC - Sistema Nervoso Central
 TAK-1 - Fator de crescimento β associado à
 cinase 1 TLR - receptor Toll-like
 TNF- α - Fator de Necrose Tumoral tipo α
 TRAF6 - Fator 6 associado ao receptor do fator de necrose
 tumoral TRL4 - receptor toll-like 4
 UNISUL - Universidade do Sul de Santa Catarina

Lista de quadros

Quadro 1 – Variáveis de estudo.....	23
Quadro 2 – Resumo dos resultados.....	39

Lista de figuras

Figura 1 – Desenho experimental	20
---------------------------------------	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
Ativação imune materna... ..	11
Resposta neuroinflamatória decorrente da ativação imune materna	14
Alterações no neurodesenvolvimento ea Esquizofrenia.....	17
Modelo animal de ativação imune materna	18
2. OBJETIVOS	22
OBJETIVO GERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. MÉTODOS	23
TIPO DE ESTUDO.....	23
MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	23
ANIMAIS.....	23
DELINEAMENTO DO ESTUDO... ..	23
TESTE/ENSAIOS/TECNICAS	25
VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	28
PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS.....	28
ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	28
4. RESULTADOS.....	29
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS	42
APÊNDICE A – Artigo relativo à dissertação... ..	54
ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética.....	70

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do encéfalo é definido como um processo elaborado que ocorre durante o período pré-natal. Após o 42º dia embrionário, inicia-se a diferenciação e a migração dos neurônios para diferentes áreas cerebrais. É neste período que se formam as primeiras conexões neuronais¹. No decorrer do desenvolvimento encefálico, quaisquer alterações, como a exposição materna a insultos infecciosos ou inflamatórios, podem comprometer o desenvolvimento da função do encéfalo fetal². Estes insultos, durante o desenvolvimento, podem contribuir para mudanças em longo prazo nas funções cerebrais e comportamentais que podem persistir até a idade adulta¹. Está bem descrito na literatura que o risco do desenvolvimento de alterações neuropsiquiátricas pode aumentar se houver exposição à infecção pré-natal, seja esta viral ou bacteriana^{3,4}.

Estudos epidemiológicos sugerem que a resposta da ativação imune materna (AIM) pode ser uma via compartilhada, conferindo assim, riscos ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos como os Transtornos do espectro autista (TEA) e a Esquizofrenia⁵. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012, transtornos psiquiátricos como os Transtornos do neurodesenvolvimento e os Transtornos do humor serão, em torno do ano de 2030, os principais comprometedores da produtividade profissional e social da população⁶. A Esquizofrenia se caracteriza por ser um transtorno psiquiátrico relacionado ao neurodesenvolvimento que afeta 1% população mundial, sendo que pacientes com o diagnóstico vivem em média de 12 a 15 anos a menos em relação ao tempo médio de vida⁶. O início da sintomatologia ocorre, geralmente, no final da adolescência e início da idade adulta, acarretando em déficits nos domínios da cognição como a velocidade de processamento, atenção, memória de trabalho, aprendizagem verbal e visual, raciocínio e resolução de problemas^{7,8}.

Algumas hipóteses estão relacionadas a etiologia da Esquizofrenia, como o desequilíbrio no sistema de neurotransmissores, principalmente nos sistemas dopaminérgico⁹, glutamatérgico^{10,11} e GABAérgico^{12,13}, provocando alterações em suas interações. As teorias adicionais sobre a patogênese da Esquizofrenia incluem, também, a neuroinflamação^{14,15}. Somando a isto, estudos mostram que pacientes com

este diagnóstico apresentam desequilíbrio na resposta imune associado a alterações dos níveis de citocinas^{7,16}. Alguns achados clínicos relataram níveis elevados de marcadores inflamatórios no sangue e no líquido cefalorraquidiano de pacientes em vários estágios do transtorno¹⁷.

A inflamação durante a gestação está associada ao aumento do risco de desenvolver psicopatologias na prole⁸⁹. A associação entre inflamação e transtornos psiquiátricos foi inicialmente demonstrada através de estudos epidemiológicos onde os surtos de gripe precederam um aumento nos transtornos do espectro da Esquizofrenia, onde os danos atingiram a vida adulta dos descendentes de gestantes que sofreram com o surto⁷². Inflamação na gravidez, desde então, tem sido associada a patologias adicionais na prole, incluindo Transtorno de humor bipolar e os Transtornos do espectro autismo (TEA)^{90,3,5}

Neste sentido, a patogênese de algumas doenças que envolvem o sistema nervoso central (SNC) apresentam um quadro neuroinflamatório, em que há o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias¹⁸. Entre estas estão a interleucina 1 β (IL- 1 β) e a interleucina18 (IL-18), as quais são sintetizadas como proteínas precursoras e dependem de um posterior processamento, executado pela enzima caspase-1, para tornarem-se maduras e exercerem suas funções¹⁸. O processo de clivagem da caspase-1 se dá através de algumas moléculas, dentre elas o *pyrindomain- containing3* (NLRP-3)¹⁹. O NLRP-3 leva à formação de um inflamassoma, uma plataforma molecular composta pela caspase-1 ativada²⁰.

O inflamassoma de NLRP3 está associado a doenças metabólicas e inflamatórias crônicas como a doença de Alzheimer, Diabetes tipo II e Obesidade²⁰. Acredita-se que o NLRP3 responde à alterações no citoplasma da célula do hospedeiro, que podem ser causadas por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou por agentes estressantes como toxinas bacterianas²⁰. É bem estabelecido que o inflamassoma de NLRP3 responde à alterações nas membranas de células da imunidade inata e, sendo assim, essa característica leva ao conceito que NLRP3 é um sensor de dano, podendo assim ser ativado por padrões moleculares associados a danos (DAMPs)²⁰. A ativação do inflamassoma de NLRP3 e a ativação da caspase-1 requer o efluxo de K⁺, catepsinas lisossomais e

espécies reativas ao oxigênio (ERO)^{20,21}.

São necessários três sinais para a ativação do inflammasoma NLRP3 completo em resposta a bactérias gram-negativas²². Em primeiro lugar, um ativador bacteriano do receptor *Toll-like* (TLR) leva à seção celular e à regulação positiva da NLRP3 e da expressão de IL-1 β ^{23,24}. O segundo ponto de verificação de ativação pode ser dividido em duas partes em resposta a bactérias. Um ponto de controle é que consiste na ativação do NLRP3, a partir do contato com o RNAm de bactérias vivas (também conhecido como vita-PAMPs)⁴; o outro ponto de verificação é que a ativação do TLR4 é desencadeada pelo lipopolisacarídeos (LPS), mediando a secreção de interferon (IFN) de tipo I, induzindo a expressão e ativação da pro caspase-1 por desencadeamento do receptor IFN- α/β (IFNAR). Neste contexto, sabe-se que a exposição pré-natal à infecção materna representa um fator de risco para o desenvolvimento de alguns transtornos psiquiátricos, sobretudo aqueles relacionados ao neurodesenvolvimento, como o TEA e a Esquizofrenia²⁵. Embora essas associações forneçam evidências de que a infecção pré-natal pode contribuir para o desencadeamento destes transtornos, ainda não há nexo de causalidade envolvendo a fisiopatologia.

A Esquizofrenia pode afetar drasticamente a qualidade de vida dos indivíduos diagnosticados. Embora sua etiologia seja multifatorial e possa envolver tanto fatores intrínsecos como extrínsecos, sugere-se que a probabilidade de desenvolver uma dessas condições seja aumentada por rupturas no ambiente *in utero*⁹¹. Em particular, a inflamação materna durante a gravidez é colocada para desempenhar um papel forte na sua patogênese¹.

A pesquisa clínica sugere modelos animais como um ponto de partida necessário, diante de um entendimento mais profundo da fisiopatologia, provendo ferramentas para o sucesso na descoberta de drogas, visando um tratamento direto e eficaz para esta condição, visando estudar a ligação entre discrepâncias comportamentais e alterações celulares, moleculares e morfológicas no cérebro de proles após a exposição pré-natal a agentes imunomoduladores como o LPS, e mimetizar infecções virais ou bacterianas^{79, 92,1}.

Desta forma, o presente estudo levanta a questão e procurar elucidar, qual o envolvimento do inflamassoma NLRP3 no comportamento relacionado à esquizofrenia

em animais jovens expostos a endotoxemia no período gestacional? Hipotetizou-se que a AIM pode resultar em alterações no perfil inflamatório ao longo do desenvolvimento encefálico e exacerbar o comportamento relacionado à Esquizofrenia no período juvenil da prole.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Ativação imune materna

O sistema imune é formado por células e moléculas que protegem o organismo contra doenças. Alguns patógenos e seus produtos são capazes de ativar este sistema, iniciando assim uma resposta imune²⁶. Especificamente, a AIM, por diferentes agentes patogênicos, apresenta implicações na interação entre o sistema imunológico da progenitora, se estendendo ao embrião, feto e neonato.

A inflamação durante a gravidez está associada ao aumento do risco de várias psicopatologias na prole⁸⁹. A associação entre inflamação e transtorno psiquiátrico foi inicialmente demonstrada através de estudos epidemiológicos onde os surtos de gripe na progenitora precederam um aumento nos transtornos do espectro da esquizofrenia na prole⁷². Inflamação no período gestacional, desde então, tem sido associada a patologias adicionais na prole, incluindo Transtorno de humor bipolar e Transtornos do espectro autista^{35, 3, 5}.

A ativação imune materna pode ser estritamente definida como níveis medidos de marcadores inflamatórios excedendo seu nível normal, onde, infecções, estresse psicossocial, psicopatologias maternas e alto índice de massa corporal são condições comuns associadas a estados inflamatórios durante a gestação que, por sua vez, têm sido associados a alterações no neurodesenvolvimento, levando a transtornos mentais¹.

A exposição materna a estímulos imune-inflamatórios aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral tipo α (TNF- α) por células do sistema imune. Estas citocinas atravessam a barreira placentária e hematoencefálica modulando o sistema nervoso do feto. Por outro lado, a ativação imune pode ocorrer devido ao reconhecimento de patógenos pelas células trofoblásticas (células que envolvem o embrião) que irão liberar citocinas, agindo diretamente no feto²⁷. Além disso, a placenta e os órgãos do feto podem aumentar a

produção de citocinas em resposta à infecção materna^{28,29}.

Neste processo, a microglia tem um papel importante como mediador neuroinflamatório, uma vez que afeta diretamente a maturação neuronal ao desempenhar ações na poda sináptica, na homeostase e nos circuitos neuronais. Estas alterações, podem contribuir para o desenvolvimento de uma variedade de disfunções neuronais e comportamentais observadas em diferentes fases da vida¹. Sabe-se que o desenvolvimento do encéfalo é um processo especializado que ocorre predominantemente durante o período pré-natal. Na medida em que os neurônios são produzidos, migram para diferentes áreas onde começam a estabelecer as primeiras redes neurais¹.

Neste contexto, a exposição materna a insultos infecciosos ou inflamatórios, pode comprometer o desenvolvimento e função do encéfalo fetal² e resultar em alterações a curto e a longo prazo. Essas alterações aumentam o risco ao parto prematuro e estão associadas a alterações cognitivas e transtornos associados ao neurodesenvolvimento como o TEA, Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDHA) e Esquizofrenia³⁰.

Evidências demonstram que a AIM no início da gestação (primeiro trimestre), altera a proliferação e diferenciação neuronal e consequentemente a maturação sináptica. Quando ocorre em períodos mais tardios (terceiro trimestre), está associada a alterações na migração e organização neural, maturação sináptica e crescimento axonal²⁷. Um recente estudo utilizando modelos animais, demonstrou que a AIM, tanto do nono (equivalente ao primeiro trimestre de gestação em humanos) quanto no décimo sétimo dia de vida intrauterina (equivalente ao terceiro trimestre em humanos) foi associado a um comportamento relacionado a ansiedade (colocar referência).

Além disso, a AIM no décimo sétimo dia de vida intrauterina reduziu a preferência por sacarose na prole jovem, sugerindo um comportamento semelhante a anedonia. Estas alterações comportamentais estão, possivelmente, relacionadas aos sintomas positivos e/ou negativos da Esquizofrenia³¹. No entanto, os mecanismos moleculares relacionados à AIM e as consequências comportamentais ao longo da vida ainda não estão totalmente claros na literatura. Entretanto, sabe-se a AIM está associada a ativação microglial e a um processo neuroinflamatório durante o período pós-natal¹

Pesquisas pré-clínicas mostram uma relação entre infecções *in utero* com o vírus influenza e alterações estruturais, funcionais e comportamentais na prole. Estas alterações incluem uma diminuição do volume do hipocampo, aumento da imunoreatividade para a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e alterações comportamentais como comprometimento da memória e do aprendizado³². Além disso, mostram que a exposição à infecção pré-natal pode aumentar o risco da prole em desenvolver diferentes alterações neuropsiquiátricas³³ como paralisia cerebral, epilepsia³⁴ e transtornos do humor³⁵. Já estudos moleculares apontam que a AIM pode estar associada a alterações na transmissão sináptica e na plasticidade no hipocampo da prole jovem³⁶.

Estudos mostram que um quadro infeccioso pré-natal pode representar um fator de vulnerabilidade para transtornos relacionados ao desenvolvimento neurológico, de modo que a especificidade da neuropatologia e dos sintomas psicopatológicos subsequentes provavelmente serão influenciados pelo contexto genético e ambiental em que ocorrem as adversidades pré-natais³⁷⁻³⁹. Em modelos animais, a exposição ao LPS durante o período neonatal, aumentou a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF α em tecido encefálico agudamente⁴⁰. Além disso, a AIM induzida com LPS está associada a anormalidades como a ativação de células microgliais, alterações a longo prazo na função GABAérgica e uma diminuição no volume hipocampal^{41,43}.

Alguns modelos experimentais têm sido utilizados para mimetizar as condições de infecções maternas associadas a bactérias Gram negativas (*E. coli*) e a *Gardinerella vaginalis*. Estes agentes possuem uma maior prevalência durante o período gestacional⁴⁴, sendo que, as infecções por *E. coli* representam cerca de 90% de todas as infecções no trato urinário de mulheres em idade fértil⁴⁴. As alterações advindas da inflamação materna são, muitas vezes, atribuídas à ativação imune da mãe e não à uma ação direta do estímulo imune, uma vez que esse estímulo não atravessa a barreira placentária.

A AIM desencadeia alterações comportamentais de longo prazo na prole, onde os agentes infecciosos não agem diretamente sobre o cérebro fetal em desenvolvimento, mas sim em vez acontecer a ativação das vias de sinalização imune imediata, leva a função imune ao aumento da expressão de citocinas e outros fatores imunes, sendo mantida na fase adulta^{93,94}. A alteração do estado

imunológico pode contribuir para o neurodesenvolvimento anormal e/ou disfunção sináptica continuada na prole, sendo essas alterações comuns nos transtornos relacionadas ao Autismo e Esquizofrenia^{1,95,96}. Por essa razão, os estudos pré-clínicos, como a exposição da mãe à patógenos específicos como por exemplo, à bactéria *E. coli*, são considerados bons modelos pois mimetizam as alterações agudas e tardias relacionadas a AIM⁴⁵.

Resposta neuroinflamatória decorrente da ativação imune materna

A administração de LPS, um componente da parede celular de bactérias gram-negativas, em animais está associada a uma resposta inflamatória através do seu reconhecimento pelo sistema imune inato. Este reconhecimento se dá principalmente através dos receptores TLR^{46,47}. Uma vez que o LPS entra em contato com o organismo animal, seja a partir de uma bactéria gram-negativa como a *E. coli*, ou pela administração direta do mesmo, inicia-se uma série de respostas no organismo infectado. Esta endotoxina pode atuar em macrófagos, monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas e células endoteliais⁴⁷. O LPS é capaz de ativar principalmente a resposta imune inata com a participação do macrófago. Atua também na resposta imune adquirida, referente a respostas de linfócitos que reconhecem antígenos microbianos específicos com atuação do TLR-4⁴⁸.

Existem 10 genes TLR expressos em humanos e 13 em roedores e cada um é responsável por reconhecer um grupo distinto de padrões moleculares. O TLR-4 é quem reconhece o LPS bacteriano⁴⁹. Resumidamente, o TLR-4 possui a habilidade de ativar o fator nuclear kappa B (NF- κ B). O NF- κ B alerta o sistema imune quanto a presença de patógenos bacterianos, ativando subsequentemente mediadores pró-inflamatórios que irão ativar a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a cicloxigenase (COX). Outra função bem descrita do NF- κ B é a estimulação e liberação de citocinas pró-inflamatórias²⁶.

No mecanismo de ação por meio de macrófagos, inicialmente, o LPS que se encontra no plasma, liga-se a uma proteína de fase aguda do hospedeiro, a proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP). Dentro do macrófago ocorre uma série de reações em cascata, incluindo a atuação do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), proteína cinase associada ao receptor de interleucina (IRAK), fator 6

associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6), fator de crescimento β associado à cinase 1 (TAK-1), ativador de proteína 1 (AP-1), dentre outras, até a ativação do fator de transcrição NF- κ B, que ativa os genes que codificam as proteínas envolvidas na defesa contra a infecção, que são as citocinas pró-inflamatórias⁴⁸. Entre as citocinas pro-inflamatórias ativadas e liberadas a partir do contato com LPS, destacam-se a IL-1 β , IL-6 e o TNF- α ⁵⁰.

As citocinas são descritas como pequenas proteínas inflamatórias de sinalização que podem ser secretadas por inúmeras células componentes do sistema imune, como macrófagos, neutrófilos e outros. Sabe-se que bactérias e vírus são potentes ativadores de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α , IL-1 β e IL-6, que são os principais efetores da resposta imune periférica e os principais mediadores de doenças neurais em resposta à infecção e a inflamação. As citocinas e seus receptores são agrupados de acordo com suas estruturas: (1) IL-1; (2) hematopoietinas; (3) TNF- α e (4) interferons (IFNs). A família IL-1 contém 11 membros sendo os principais a IL-1 α , a IL-1 β e a IL-18. Algumas IL-1 são produzidas como pró-proteínas que são clivadas para produzir citocinas maduras ou ativadas. A IL-1 β é um exemplo deste processo. Ela é liberada pelos macrófagos em resposta a sinalização dos TLRs e são clivadas pela capase-1^{51,52}.

Neste contexto, o SNC é conhecido como um órgão “imunologicamente privilegiado”, ou seja, não suscetível à resposta imune e inflamatória sistêmica, possuindo um sistema imune endógeno coordenado por células imunocompetentes, como a microglia e os astrócitos^{1,53}. As respostas as infecções ou inflamações geradas no encéfalo se diferem das apresentadas na periferia, não sendo comum a presença de sintomas como rubor, tumor, calor no SNC, onde essas diferenças podem ser atribuídas, em parte, à presença da barreira hematoencefálica, que obstrui a entrada de patógenos, protegendo assim, o sistema neuronal⁵⁴.

Embora a entrada de LPS no encéfalo após a administração sistêmica seja em quantidades pequenas, o aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios é capaz de aumentar a permeabilidade da barreira placentária e hematoencefálica do feto, alterar a microvasculatura endotelial e desencadear uma ativação microglial. Uma vez ativada, a microglia inicia um processo de neuroinflamação sustentada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias

diretamente no tecido encefálico, intensificando os danos a células neuronais e gliais. Os níveis elevados de citocinas em tecido encefálico podem permanecer ao longo do desenvolvimento sendo associado a mudanças duradouras na conectividade e função neural na prole¹⁷. Em um recente estudo, foi administrado uma única injeção intraperitoneal de LPS no décimo segundo dia embrionário e os efeitos no período pré-natal, neonatal e pós-natal foram avaliados. Foi observado um aumento na expressão de IL-1 β , TNF- α e IL-6 quatro horas após a MIA, permanecendo elevado no período neonatal e pós-natal (até 40 dias de vida da prole) na amígdala. A expressão de TLR-2 e TLR-4 também foi regulada positivamente na amígdala no período neonatal e pós-natal⁵⁵.

Neste sentido, a patogênese de algumas doenças que envolvem o SNC apresenta um quadro neuroinflamatório, em que há o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias. Entre estas a IL-1 β e a IL-18, as quais são sintetizadas como proteínas precursoras e dependem de um posterior processamento, executado pela enzima caspase-1, para tornarem-se maduras e exercerem suas funções¹⁸. Da mesma forma, a ativação da caspase-1 é dependente da clivagem proteolítica realizada por um complexo multiprotéico denominado inflamassoma²⁰.

O inflamassoma é constituído por uma proteína sensora/receptora de localização citosólica que serve como uma plataforma para a formação do complexo, junto a uma proteína adaptadora associada a apoptose (ASC) e uma proteína efetora, a caspase-1²⁰. A formação do inflamassoma facilita, por tanto, a autoclivagem e ativação da caspase-1, a qual cliva proteoliticamente as citocinas pró-IL-1 β e pró-IL-18 nas suas formas maduras, favorecendo respostas pró-inflamatórias e antimicrobianas^{56,57}.

A importância da ativação dos inflamassomas vem sendo cada vez mais estudada durante infecções bacterianas, mas ainda pouco se sabe a respeito dos seus mecanismos de ação e suas consequências em longo prazo. Em recente pesquisa utilizando amostras de tecidos encefálicos de casos fatais de bebês com microcefalia ligada ao vírus ZIKA, foi verificado uma expressão significativamente maior de do inflamassoma NLRP3 e das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 e da enzima caspase-1. Esses resultados sugerem que a ativação do inflamassoma pode agravar a resposta neuroinflamatória e, conseqüentemente, aumentar os

danos do SNC em recém-nascidos com infecção sistêmica (de Sousa et al., 2018). Entretanto, outro recente estudo avaliou a ativação do inflamassoma NLRP3 em tecido *post-mortem* do córtex pré-frontal de sujeitos com diagnóstico de Transtorno de humor bipolar e Esquizofrenia. Foi verificado uma diminuição da expressão do inflamassoma NLRP3 e seu ligante ASC em sujeitos com Transtorno de humor bipolar. Níveis aumentados de caspase-1, IL1 β , IL-6, TNF α e IL-10 foram encontrados em ambos os sujeitos⁵⁸.

Evidências científicas suportam a hipótese de que as alterações nos níveis de expressão de citocinas durante o desenvolvimento precoce do cérebro estão associadas a transtornos psiquiátricos^{59,60}. A principal hipótese é que, em resposta a AIM, os níveis alterados da expressão de moléculas inflamatórias durante o processo de neurodesenvolvimento podem alterar a conectividade neural, o que, por sua vez, pode ter efeitos a longo prazo sobre as funções cognitivas¹. Estudos prospectivos trazem uma associação entre infecções virais e bacterianas e transtornos do neurodesenvolvimento^{37,42,61}. Recentemente, esta relação ganhou um novo elemento – a resposta imune materna⁴². Neste contexto, sabe-se que a ativação do sistema imune contribui para a fisiopatologia da Esquizofrenia^{1,6,62}. Se a AIM pode ser um dos precursores primários para uma grande variedade de transtornos, incluindo a Esquizofrenia, é necessário estudos complementares para elucidar a fisiopatologia envolvida nos mecanismos que correlacionam a AIM ao comportamento relacionado à Esquizofrenia.

Alterações no neurodesenvolvimento e a Esquizofrenia

Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos têm despertado um crescente interesse na relação entre a AIM e os transtornos de neurodesenvolvimento, como a Esquizofrenia⁶³. A Esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico causada pela interação entre fatores genéticos e ambientais. É geralmente vista como um transtorno que envolve um desenvolvimento e funcionamento anormal das conexões sinápticas⁶⁴. As causas ainda são desconhecidas, entretanto, uma das hipóteses recentes propõe que os déficits sinápticos sejam parcialmente causados por uma alteração na função do sistema imune imaturo⁶⁵.

A Esquizofrenia é considerada um transtorno complexo com déficits de conectividade neural devido a alterações em regiões-chave de circuitos neuronais. Estudos mostram que alterações no córtex pré-frontal e no cerebelo foram ligadas a sintomas negativos^{29,47,66-68} e déficits no circuito cortico-cerebelar-talâmico-cortical foram associadas a alterações cognitivas⁶⁹. Atualmente é caracterizada como um transtorno crônico e debilitante que afeta pelo menos 1% da população em todo o mundo, sendo classificada como uma das 10 maiores causas de incapacidade pela OMS⁶. Os sintomas geralmente se enquadram em um dos três grupos: positivos (por exemplo, alucinações e delírios), negativos (por exemplo, isolamento social, anedonia) e cognitivos (por exemplo, disfunção de processamento sensorial, deficiências na memória de trabalho)^{70,71}.

Embora os sintomas da Esquizofrenia se manifestem tipicamente durante a adolescência e no início da idade adulta, pesquisas vêm relacionando eventos pré-natais, como a infecção materna durante o período gestacional, a um maior risco para desenvolver Esquizofrenia ao longo da vida^{46,61,72,73}. A AIM foi identificada como um importante fator de risco etiológico totalizando 14-21% de todos os casos de Esquizofrenia⁵⁹. Uma revisão sistemática apontou que após a exposição materna a agentes patogênicos virais durante o primeiro e o início do segundo trimestre, está associada a um aumento da incidência do diagnóstico posterior de Esquizofrenia na prole⁷⁴.

Estudo recente mostrou que a AIM em roedores está associada a alterações na percepção temporal na prole jovem, uma alteração comportamental característica na Esquizofrenia⁷⁵. Evidência de alterações nos níveis de citocinas foram encontradas em tecidos cerebrais *post-mortem* obtidos de indivíduos com diagnóstico de Esquizofrenia⁵. Além disso, níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-6, foram encontrados em soro de indivíduos com diagnóstico de Esquizofrenia e TEA²³. Além da Esquizofrenia, estudos apontam que um aumento da presença de doenças transmissíveis, combinado a um aumento nas doenças auto-imunes, poderiam representar uma grande proporção no recente aumento da incidência de transtornos do neurodesenvolvimento^{76,77}. Além da Esquizofrenia,

exposições maternas à infecção, estão associadas ao aumento do risco de Transtorno de humor bipolar e TEA⁴². Investigações apontam resultados comportamentais associados a maiores concentrações de marcadores inflamatórios, correlacionando seus níveis ao desenvolvimento cognitivo de crianças entre 12 e 24 meses de idade^{97,98}.

Uma hipótese para a associação entre transtornos psiquiátricos e a AIM é a alteração nos níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-8 no soro materno. Estes achados foram encontrados na prole jovem de roedores sendo associado a um comportamento relacionado à psicose. Estudos ainda utilizando modelos animais evidenciaram que após a injeção de LPS em ratas prenhas, houve restrição do crescimento fetal e lesões em substância branca na prole jovem^{48,78}. Assim, é provável que um aumento do nível de citocinas, durante e após a infecção materna, conduzam a efeitos a longo prazo sobre a função encefálica, que aumentariam o risco para o desenvolvimento de transtornos do neurodesenvolvimento, como a Esquizofrenia¹⁷.

Por fim, os achados descritos na literatura sugerem que a desregulação no sistema imunológico, incluindo anormalidades na estrutura e função da microglia, está desproporcionalmente presente em indivíduos com Esquizofrenia. Dados os relatos de que a AIM induz a uma desregulação da microglia, a microglia é provavelmente um fator chave nos transtornos de neurodesenvolvimento induzidos pela AIM. Entretanto, outros fatores podem auxiliar na manutenção de um estado neuroinflamatório pós-natal associado a Esquizofrenia – como a ativação do inflamassoma NLRP3⁵⁸. Porém, esta última hipótese necessita de maiores esclarecimentos.

1.1.4. Modelo animal de ativação imune materna

Estudos clínicos apresentam limitações em sua capacidade de detectar as vias moleculares relacionadas a infecções maternas por serem pesquisas que requerem que os seres humanos sejam submetidos à experimentação invasiva. Os modelos animais de infecções pré-natais propõem mimetizar tanto infecções bacterianas quanto virais durante a gestação, principalmente com a administração de LPS,

vírus influenza e ácido poliinosínico-policitidílico (PolyI:C), injetadas pelas vias intraperitoneal, intravenosa, subcutânea e intranasal em roedores⁷⁹.

Em roedores, a exposição precoce ao LPS induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL) -1 β , IL-6 e necrose tumoral alfa (TNF α), tanto na periferia quanto no cérebro⁴⁰, além de provocar anormalidades como diminuição da expressão de marcadores estruturais, aumento da imunorreatividade para proteína ácida fibrilar glial (GFAP), ativação de células da microglia, alterações de longo prazo na função GABAérgica e diminuição das concentrações neocorticais e espessura do hipocampo^{99, 41, 43}. A exposição de mães grávidas a outros agentes inflamatórios durante a gestação também resulta em déficits que incluem perda neuronal, astrogliose e alterações na expressão do receptor de neurotransmissores^{79, 100, 101}.

O número de administrações durante a gestação, o período da gestação e a dose desses agentes infecciosos devem sempre ser levados em conta, pois podem resultar em alterações heterogêneas entre os animais. Além disso, sabe-se que a resposta imune materna a uma infecção pode influenciar o desenvolvimento do feto via aumento nos níveis de citocinas circulantes, deixando o animal susceptível a uma nova infecção ao longo da vida devido a essa exposição¹⁸. O tratamento com LPS, no meio da gestação de ratas, leva a redução do comportamento de brincar nos filhotes e da interação social quando adultos^{79,80}. Já a ativação imune materna no meio da gestação de camundongos com PolyI:C (um análogo sintético de RNA viral) ou IL-10 resulta em prole com comportamentos, histologia e expressão gênica anormal, de modo similar ao de pacientes autistas ou esquizofrênicos⁸¹.

Devido aos desafios de se estudar AIM em seres humanos, a pesquisa animal é, portanto, essencial para identificar mecanismos causais e desenvolver novas ferramentas de diagnóstico e terapêutica. A relação causal entre a infecção materna e as anormalidades comportamentais relacionadas ao autismo e a esquizofrenia foi claramente demonstrada usando modelos animais de roedores e primatas não-humanos. Nestes modelos, as grávidas são expostas a uma manipulação imunológica em um estágio gestacional específico, sendo estes modelos animais, satisfatórios nos critérios exigidos para a validade de um modelo de doença: imitam um fator de risco conhecido relacionado à doença (validade de

construção), exibem uma ampla gama de sintomas relacionados à doença (validade facial) e podem ser usados para prever a eficácia dos tratamentos (validade preditiva)^{80,82}.

Como resultado, modelos animais foram desenvolvidos para compreender melhor a relação entre a infecção pré-natal e o transtorno. Tipicamente, esses modelos envolvem a indução de uma reação imune em ratas ou camundongos prenhas, apoiando a afirmação de que após a ativação imune materna durante a gestação, a prole mostra transtornos comportamentais, anatômicos, neuroquímicos e eletrofisiológicos consistentes^{51,76,77,83-86}.

Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo contribuir para fortalecer as evidências de que um processo de AIM pode estar associada a um processo de neuroinflamação persistente e este, desencadear um evento patológico ao longo do curso de vida. Obtendo respostas e até mesmo elaborando duvidas, o presente estudo vem com a intenção de elucidar esses fatores e contribuir pra com o meio científico e acadêmico.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento do inflamassoma NLRP3 no comportamento relacionado à esquizofrenia em animais jovens expostos a ativação imune maternal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade locomotora, interação social e movimentos estereotipados nos camundongos com 45 dias de vida expostos a AIM.

Verificar a expressão de NLRP3 e IL-1 β em encéfalo de camundongos com 7, 14 e 45 dias de vida expostos a AIM.

3. MÉTODOS

TIPO DE ESTUDO

Estudo pré-clínico com delineamento experimental realizado no Laboratório de Neurociências Experimental (Lanex) da Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL.

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Neste estudo foi utilizado LPS (055:B5 E. Coli – Sigma Aldrich, Brasil); tampão fosfato salina – PBS pó pH 7,2 +/- 0,1 (Laborclin; Brasil); campo aberto (marcenaria local; Palhoça); anticorpos primários para NLRP3 e IL-1 β (Abcam, Brasil).

ANIMAIS

Foram incluídos no estudo 10 camundongos C57BL/6 (5 fêmeas e 5 machos), adultos, pesando entre 22g e 25g e que não possuíam qualquer anormalidade anatômica, funcional e/ou doenças e machucados. Os animais foram provenientes da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e permaneceram no Biotério Experimental do Lanex até o fim do estudo, sob regime cíclico de 12 horas de luz e 12 horas de escuro (luzes ligadas às 06h00min e desligadas às 18h00min por *timer*) e com livre acesso a comida e água. O ambiente foi mantido a temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$. Os animais serão aclimatados ao laboratório por pelo menos 1h antes dos testes comportamentais.

O número de animais por grupo foi calculado em $n=8$. A fórmula empregada para o cálculo foi a equação $n/\text{grupo}=2[(Z\alpha/2 + Z\beta) \times d/\Delta]^{45}$ para comparação de duas médias, considerando-se o poder de teste de 80%, o nível de significância de 5%, o desvio padrão de 12,5% a partir de registros de estudos anteriores e o valor da diferença a ser detectada igual a 18%.

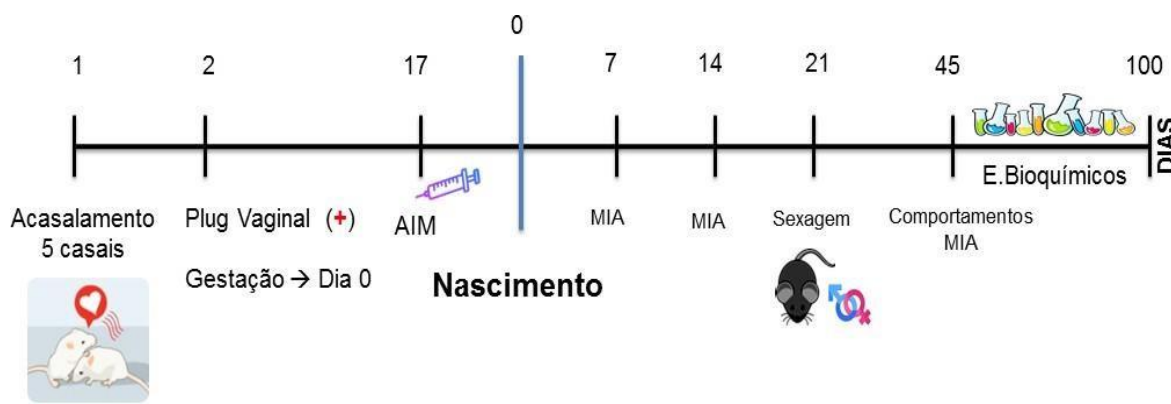
DELINEAMENTO DO ESTUDO

Inicialmente os animais foram acasalados (formando 5 casais) e mantidos em uma gaiola durante a noite (das 18h as 8h) na proporção de uma fêmea para cada macho. No dia seguinte, foi avaliado a presença ou não de um plugue vaginal. Em caso de formação do plugue vaginal, este dia foi definido como dia 0 gestacional (G0). No 15º dia gestacional (definido como G15), as fêmeas receberam uma injeção i.p de LPS (*Escherichia coli* 026: B6). O LPS foi dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (PBS) em uma concentração de armazenamento de 150 µg/mL. Para induzir ao modelo de AIM em camundongos, a injeção i.p terá 50µg/kg de LPS em 100 µL de PBS. O mesmo volume equivalente de PBS foi injetado nos animais do grupo controle. Os animais foram monitorados diariamente após a injeção de LPS para verificação de sinais de hemorragia vaginal, perda de peso ou comportamento doentio, como aumento da temperatura e imobilidade⁸⁷.

O dia do nascimento dos animais foi definido como P0. Uma parte dos animais, quando completarem 7 e 14 dias pós-natais (P7 e P14), foram submetidos a morte indolor assistida (MIA), recebendo injeção de uma dose excessiva de anestésico, de acordo com a resolução 1000 de 12/05/2012 – Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), sob a supervisão do médico veterinário responsável. O encéfalo foi dissecado e armazenado em -80°C para posterior análise bioquímica. Outra parte dos animais, ao completarem 21 dias de vida, deixaram a caixa moradia original e foi realizada a feita sexagem. Separados em fêmeas e machos, os animais foram condicionados em caixas contendo 5 animais onde permaneceram com os mesmos cuidados descritos anteriormente. Ao completarem 45 dias (P45), foram submetidos aos testes comportamentais.

Após o fim dos testes comportamentais, os animais foram submetidos a MIA, recebendo injeção de uma dose excessiva de anestésico, de acordo com a resolução 1000 de 12/05/2012 – CFMV, sob a supervisão do médico veterinário responsável. O cérebro total será dissecado e armazenado em -80°C para posterior análise bioquímica. Neste contexto, os animais foram divididos em seis grupos experimentais: (1) PBS 7P; (2) PBS 14P; (3) PBS 45P; (4) LPS 7P; (5) LPS 14P e; (6) LPS 45P (Figura 1).

Figura 1 – Desenho experimental



Elaborado pelo autor

A decisão de iniciar os experimentos nestas idades foi baseada na literatura para realizar uma avaliação longitudinal na prole exposta ao LPS na sua vida pré-natal. Esses estudos demonstraram que as principais alterações comportamentais são observadas quando a prole atinge o final da adolescência ou início da idade adulta, recapitulando as observações clínicas e bioquímicas relacionadas a Esquizofrenia⁷⁷. Estudos recentes demonstram que há um aumento na expressão dos receptores TLR- 2 e TLR-4 em amígdala somente 45 dias após o nascimento e um aumento dos níveis de IL-1 β em amígdala somente 7 dias após o nascimento⁷⁷.

TESTE/ENSAIOS/TECNICAS

Os testes foram realizados entre as 8h e 12h em uma sala devidamente preparada para este fim. Durante os experimentos, os animais foram transportados para a sala de comportamento uma hora antes dos testes para aclimação. Os testes comportamentais foram realizados pelo mesmo avaliador.

Teste de campo aberto

O teste comportamental de habituação ao campo aberto foi realizado em um aparato chamado open Field, com 40 x 60 cm rodeado por paredes de 50 cm de altura sendo 3 paredes de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto apresenta quadrados desenhados para fazer a

marcação dos quadrantes a serem cruzados. Este teste comportamental refere-se a todas as atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do ambiente, as quais abrangem não só respostas reflexas atencionais imediatas, como também as respostas voluntárias típicas. A adoção desse tipo de teste apresenta uma clara conveniência pela facilidade de registro comportamental, quando comparado ao estudo no ambiente natural. O pressuposto básico envolvido em estudos de confinamento em um novo ambiente é que no intuito de explorar o ambiente, o animal precisa locomover-se nele.

Dessa forma, a quantidade de movimento passa a ser um indicador de atividade exploratória. A resposta exploratória de levantar-se nas patas dianteiras (rearing) é também muito comum em roedores e tem sido utilizada como medida do nível de excitabilidade uma vez que esse comportamento frequentemente se correlaciona com outras atividades como a defesa, reações sexuais, bem como a atividade motora (crossing), onde é quantificado o número de quadrantes que o camundongo percorre.

Movimentos estereotipados

Os movimentos estereotipados são definidos como movimentos rápidos e repetitivos da cabeça e do antebraço. Os comportamentos avaliados serão *sniffing* (cheirar), *grooming* (movimentos de autolimpeza), cabeça balançando, mordendo as unhas e andando em círculos. Para a condução do teste, será colocado 1 animal por vez na caixa para a avaliação. Os animais foram observados 1h durante 1 min em intervalos de 10 min⁴⁴.

Interação social

Antes do teste de interação social, os animais foram isolados socialmente por 6 h. O teste de interação social consiste em colocar dois animais de caixas diferentes (mesmo grupo experimental) em uma caixa de Polipropileno de 41 x 34 x 16 cm, durante 15 minutos. Durante este período, foram avaliados três critérios: latência para a primeira interação entre animais, número de

interações e o tempo total que os animais permaneceram juntos⁸⁸.

Imunoeletroforese – Western Blot

3.5.2.1 Avaliação da expressão de NLRP3 e níveis de IL-1 β

As amostras (50 μ g) foram maceradas em tampão RIPA e desnaturadas à 100°C por 5 minutos e então submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE 12 %) durante 1h e 30 min à 110 V, seguido de transferência para membrana PVDF em sistema semi-dry (BioRad) a 90 A. Após a transferência, o bloqueio da membrana em tampão TBS contendo 0,2 % de Tween 20 (TBST) e albumina 5 % (1 hora) em seguida será adicionado o anticorpo primário (anticorpo policlonal de coelho anti-NLRP3, -TLR4 e -caspase-1, 1:1000 em tampão de bloqueio), que permanecerão sob agitação por 2h e como controle de carregamento, será utilizado a anti-beta-actina (1:10000). Após este período, foi adicionado o anticorpo secundário *anti-rabbit* e *anti-mouse* infravermelho (Uniscience), diluído em TBST (1:20000, 30 min). Após este procedimento, a membrana foi então submetida a scan em fotodocumentador (Odyssey LI-COR Biosciences) e a densitometria realizada pelo programa Image Studio (LI-COR Biosciences).

3.5.2.1 Preparação das amostras

Amostras de cérebro total foram obtidas e armazenadas a -80 °C até sua utilização. As amostras foram homogeneizadas manualmente (com auxílio de micropistilos) em tampão de lise RIPA [composto por Nonidet P-40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e PBS], acrescido de ortovanadato de sódio 100 mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM e coquetel de inibidores de proteases 1% e em seguida, incubados em gelo por 30 minutos. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante (correspondente ao extrato total) foi coletado, sendo uma alíquota separada para a dosagem de proteína em cada amostra, a qual foi determinada através do método de Bradford. Ao restante do sobrenadante, foi adicionado o tampão de amostra (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%) na proporção de 1:6. As amostras foram fervidas (95 °C; 5 min) e permaneceram armazenadas a -80 °C até o momento da eletroforese.

VARIÁVEIS DE

ESTUDO Quadro 1 –

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
LPS	Independente	Qualitativa dicotômica	SIM ou NÃO
Atividade locomotora	Dependente	Quantitativa contínua	Campo aberto Nº de crossing Mediana e intervalos interquartis
Interação social	Dependente	Quantitativa contínua	Latência de contato Mediana e intervalos Interquartis
Estereotipia	Dependente	Quantitativa contínua	Latência de movimentos
IL-1 β	Dependente	Quantitativa contínua	ng/ml Média +/- DPM
NLRP3	Dependente	Quantitativa contínua	ng/ml Média +/- DPM

PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Após tabulação dos dados no Excel e analisados no GraphPad Prism 6, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para caracterização dos dados. Os dados dos parâmetros avaliados foram considerados paramétricos e foram apresentados como a média $\pm$ desvio padrão da média. A análise estatística dos dados entre os grupos foi realizada por meio o teste t de student para a amostras independentes. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Todos os procedimentos experimentais envolvendo os estudos pré-clínicos serão realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e comportamento (SBNeC). Este projeto foi submetido a comissão de ética no uso de animais experimentais (CEUA) da UNISUL sob número de protocolo 18.002.4.01.IV.

4. RESULTADOS

ATIVIDADE LOCOMOTORA

A Figura 1 expõe os dados da atividade locomotora obtidos no teste de campo aberto. Observou-se que os animais do grupo LPS apresentaram um número significativamente maior de cruzamento quando comparado com os animais do grupo PBS, demonstrando um aumento da atividade locomotora. ($t=3,431$; $df=14$; $p=0,0041$).

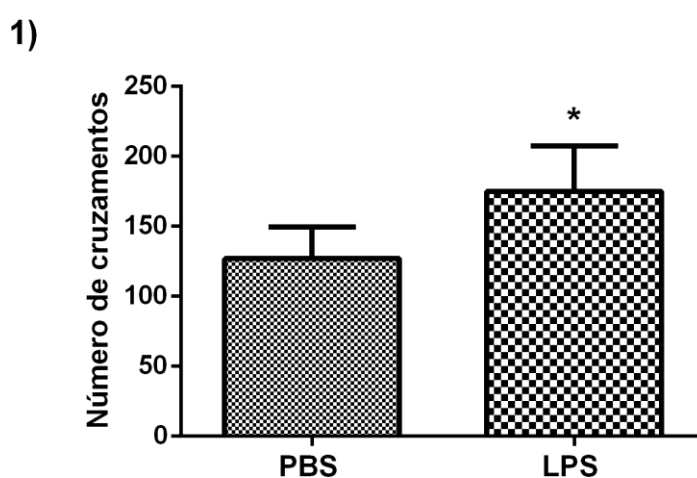


Figura1. Atividade locomotora. Dados expressos em média $\pm$ DPM, analisados pelo teste T de student para amostras independentes. * $p<0,05$ vs PBS. $n=8$

INTERAÇÃO SOCIAL

A Figura 2 demonstra os resultados obtidos no teste de interação social através da latência de primeiro contato (Figura 2A), número de contatos (Figura 2B) e tempo total de interação (Figura 2C) entre os animais do grupo LPS e PBS. Observou-se que houve um aumento estatisticamente significativo no tempo de latência do primeiro contato do grupo exposto ao LPS quando comparado ao grupo que recebeu apenas PBS (Figura 2A). No que se refere ao número de contatos, houve um aumento significativo no grupo de animais expostos ao LPS (Figura 2B). Ao que se refere ao tempo total de interação, houve um aumento significativo dos animais expostos ao LPS quando comparado aos animais que receberam PBS (Figura 2C).

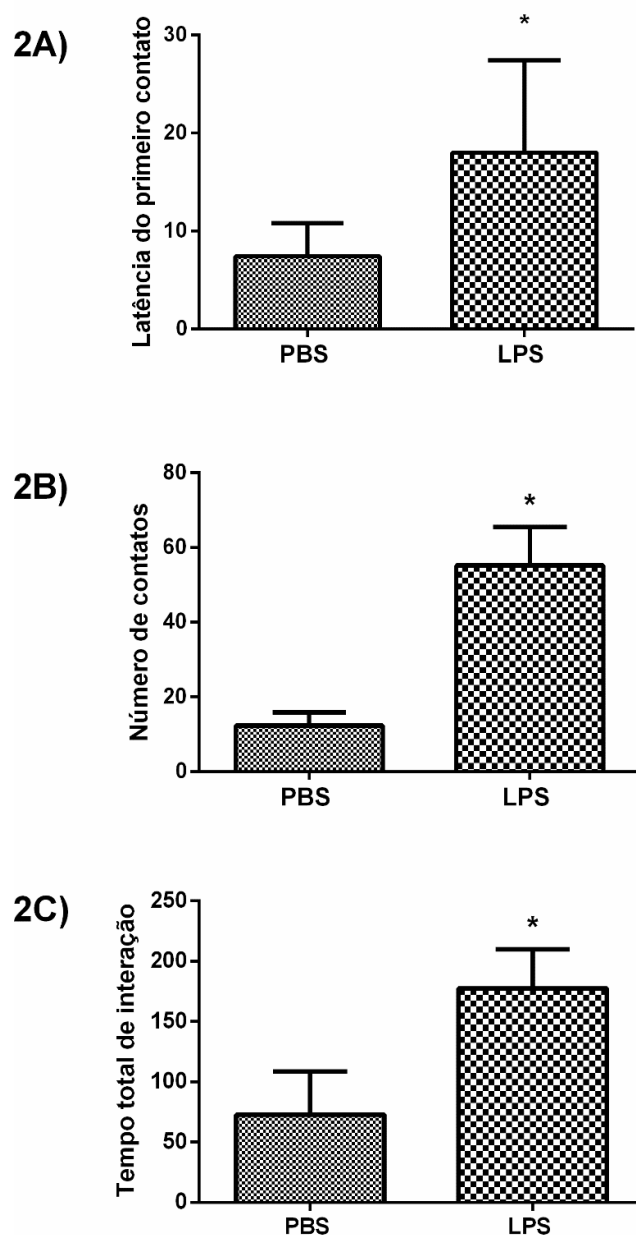


Figura 2: Interação social demonstrado pela latência de primeiro contato (Figura 2A) ($t=2,005$ $df=6$; $p=0,0918$), número de contatos (Figura 2B) ($t=9,674$ $df=10$; $p < 0,0001$) e tempo total de contato (Figura 2C) ($t=5,292$ $df=10$; $p=0,0004$). Dados expressos como média $\pm$ DPM, analisados pelo teste T de student para amostras independentes. * $p < 0,05$ vs PBS. $n=8$.

MOVIMENTOS ESTEROTIPADOS

A Figura 3 expõe os resultados dos testes de movimentos estereotipados através do número de sniffing (**Figura 3A**) número de groomings (**Figura 3B**) e quantidade de vezes em que o animal mordeu as unhas (**Figura 3C**) entre os animais do grupo LPS e PBS. Foi observado que o grupo LPS demonstrou um

aumento estatisticamente significativo no número de sniffing (Figura 3A), no grooming (Figura 3B) e na quantidade de mordidas nas unhas (Figura 3C) quando comparados com o grupo PBS ($t=9,223$ $df=14$; $p < 0,0001$; $t=2,903$ $df=14$; $p=0.0116$ e $t=4,417$ $df=14$; $p=0.0006$ respectivamente), demonstrando aumento na quantidade de movimentos estereotipados do grupo LPS.

No que se refere aos dados sobre o número de vezes em que os animais balançavam a cabeça ($t=1,000$ $df=14$, $p= 0,3343$) e a quantidade de vezes em que circulavam ($t=2,525$ $df=14$, $p=0,0243$) dentro da caixa, pode-se observar que os animais expostos ao LPS apresentaram apenas 1 balanceio e 15 circulações enquanto o grupo de animais que receberam apenas PBS não apresentaram este tipo de comportamento.

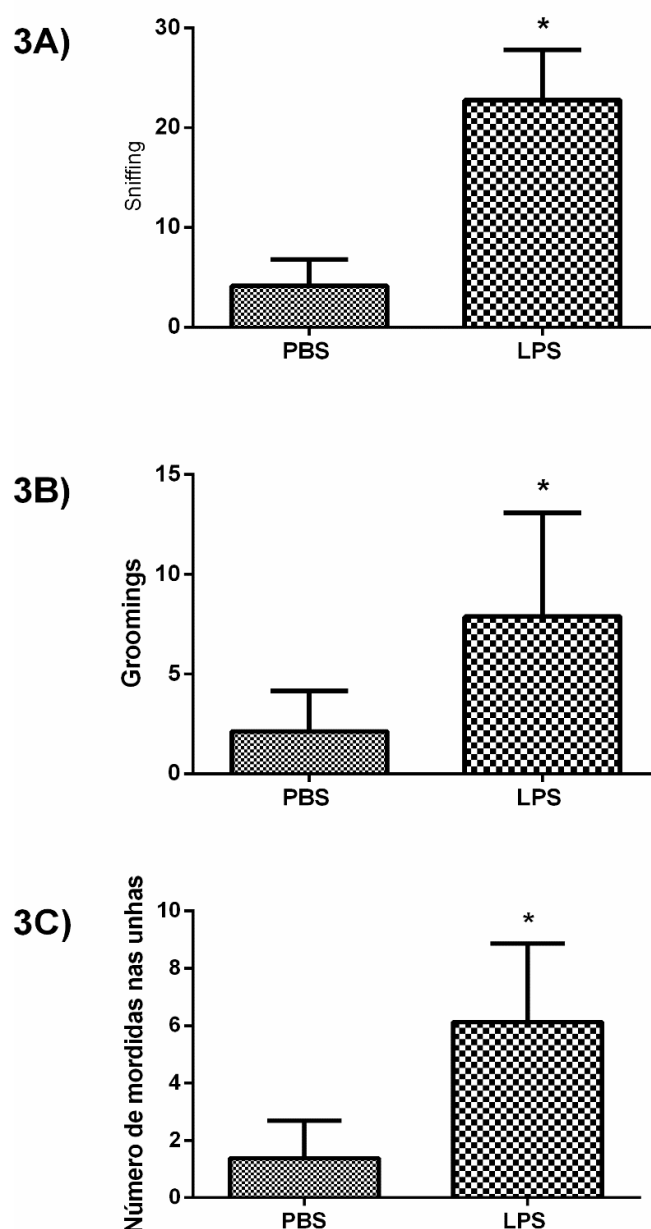


Figura 3: Movimentos estereotipados avaliados através do número de sniffing (Figura 3A), groomings (Figura 3B) e morder as unhas (Figura 3C). Os dados foram expressos como média $\pm$ DPM, analisados pelo teste T de student para amostras independentes. * $p < 0,05$ vs PBS. $n=8$.

NÍVEIS DE IL-1 β

Os dados referentes aos níveis de IL-1 β são demonstrados na Figura 4. Aos 7 dias após o nascimento, houve um aumento significativo nos níveis de IL-1 β em tecido cerebral dos animais expostos ao LPS quando comparados ao grupo controle (Figura 4A). Após 14 (Figura 4B) e 45 (Figura 4C) dias, pode-se observar que este aumento se manteve nos animais expostos ao LPS no período gestacional quando comparados aos animais controles.

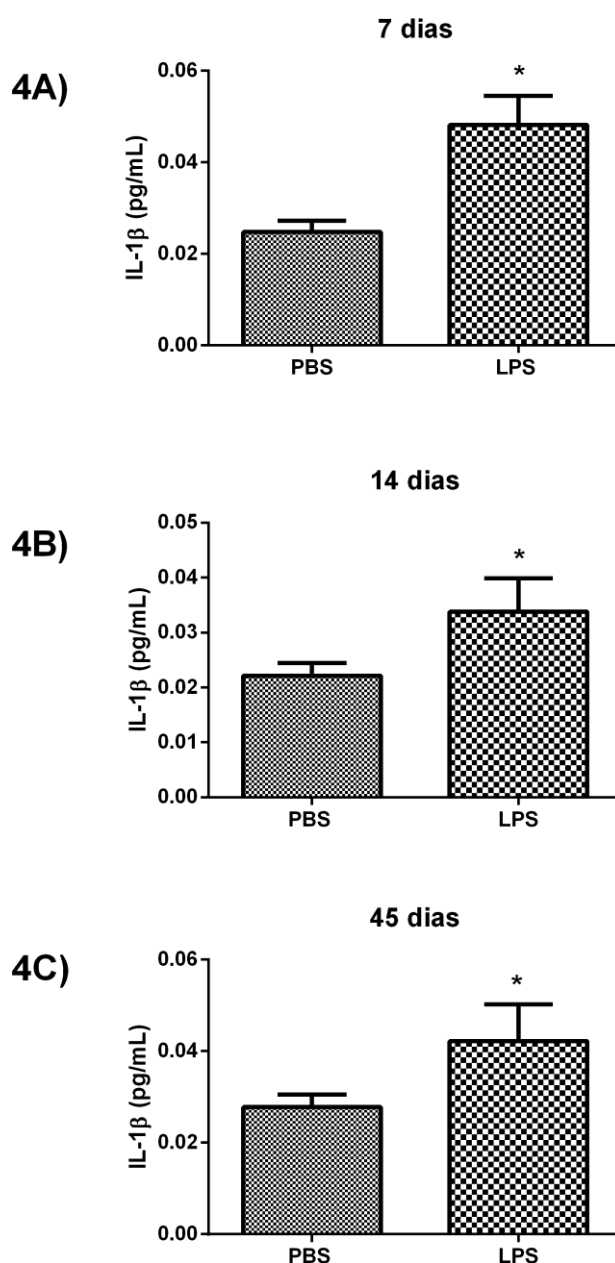


Figura 4: Níveis de IL-1 β em tecido cerebral após 7 (Figura 4 A)($t=7,656$ $df=8$, $p= < 0,0001$), 14 (Figura 4B)($t=4,026$ $df=8$, $p= 0,0038$) e 45 dias (Figura 4C)($t=3,804$ $df=8$, $p= 0,0052$) do nascimento. Dados são expressos como média $\pm$ DPM, analisados pelo teste T de student para amostras pareadas.* $p<0,05$ vs PBS. $n=8$.

EXPRESSÃO DE NLRP3

Os dados referentes a expressão do inflamassoma NLRP3 são demonstrados na Figura 5. Aos 7 dias após o nascimento, houve um aumento significativo na expressão de NLRP3 em tecido cerebral dos animais expostos ao LPS quando comparados ao grupo controle (Figura 5A). Após 14 (Figura 5B) e 45 (Figura 5C) dias, pode-se observar que este aumento se manteve nos animais expostos ao LPS no período gestacional quando comparados aos animais controles.

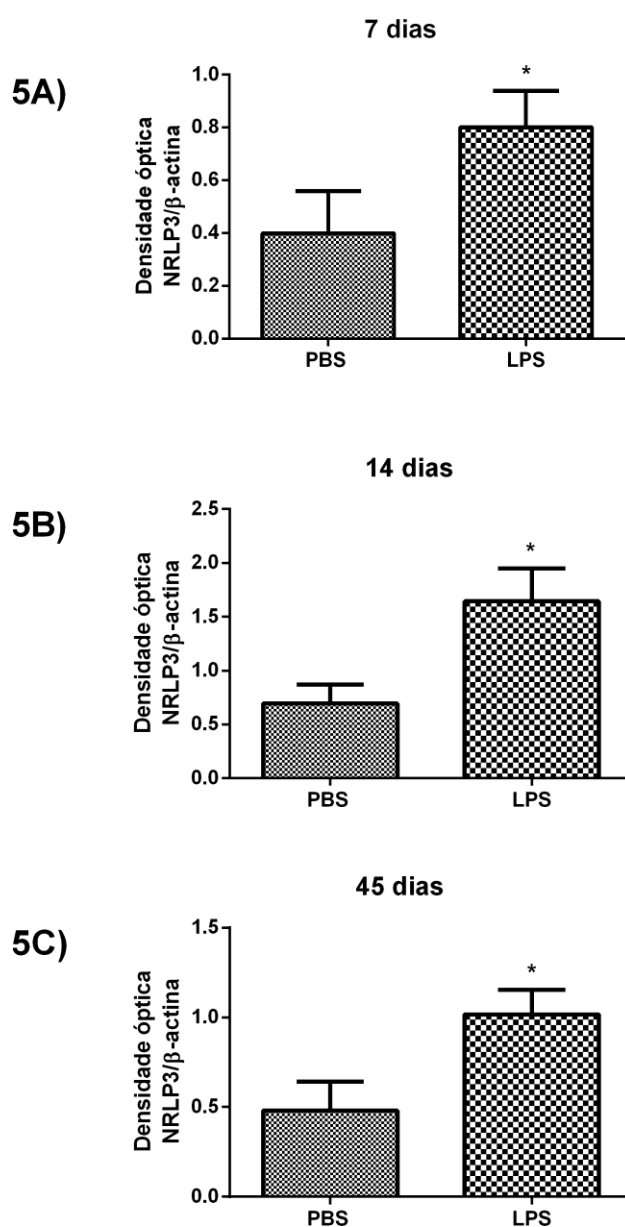


Figura 5: Expressão de NLRP3 em tecido cerebral após 7 (Figura 5 A)($t=3,824$ $df=6$, $p= 0,0087$), 14 (Figura 5B)($t=4,705$ $df=4$, $p= 0,0093$) e 45 dias (Figura 5C)($t=4,364$ $df=4$, $p= 0,0120$) do nascimento. Dados são expressos como média $\pm$ DPM, analisados pelo teste T de student para amostras pareadas.* $p<0,05$ vs PBS. $n=8$.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que os animais expostos ao LPS no período gestacional apresentaram um comportamento relacionado a esquizofrenia 45 dias após o nascimento evidenciado pelo aumento da atividade locomotora, alteração nos parâmetros relacionados a interação social e a presença de movimentos estereotipados. No que diz respeito as avaliações realizadas em tecido cerebral após ativação imune materna, foi observado um aumento dos níveis de IL-1 β quando os animais completaram 7, 14 e 45 dias de vida. A quantificação do inflamassoma NLRP3 também mostrou-se aumentada em todos os tempos avaliados em tecido cerebral após ativação imune materna.

A esquizofrenia é um transtorno que pode afetar drasticamente a qualidade de vida dos indivíduos afetados. Embora sua etiologia seja multifatorial e possa envolver tanto fatores intrínsecos como extrínsecos, sugere-se que a probabilidade de desenvolver esta condição seja aumentada devido a eventos inflamatórios no período gestacional⁹¹. Knuesel e colaboradores (2014), também demonstraram haver uma forte associação entre inflamação materna durante a gravidez e a patogênese de transtornos do neurodesenvolvimento como a esquizofrenia e o transtorno do espectro autista¹. Estudos pré-clínicos utilizando roedores e primatas sugeriram que a ativação do sistema imunológico materno, independentemente da causa específica dessa ativação, pode ser responsável pelo desfecho na prole^{80, 102}. Em recente estudo publicado em 2017, Murray e colaboradores demonstraram a validade do modelo de ativação imune materna para o estudo dos sintomas cognitivos de transtornos do neurodesenvolvimento, como a esquizofrenia¹⁰³.

Neste contexto, pode-se observar que após 45 dias da ativação imune materna, a prole apresentou um aumento da atividade locomotora, alteração nos parâmetros relacionados a interação social e a presença de movimentos estereotipados. Estudos pré-clínicos mostram que a exposição pré-natal ao LPS está associada a uma hiperatividade locomotora na prole após 30 e 60 dias do nascimento^{104,78,87,105}. A medição da atividade locomotora espontânea pode fornecer informações em termos de atividade dopaminérgica, glutamatérgica e serotoninérgica alterada em animais desafiados pelo sistema imune no período pré-

natal. Estudos mostram que o sistema serotoninérgico pode estar envolvido na formação de sintomas psicóticos. Vollenweider e Geyer (2001) mostraram que alguns tipos de alucinógenos são agonistas dos receptores 5-HT_{2A} e podem induzem psicopatologias que incluem agitação, ansiedade e alucinações¹¹⁹. ~~Esses~~ comportamentos são semelhantes aos sintomas observados nos primeiros episódios psicóticos da esquizofrenia¹²⁰. A estimulação dos receptores 5-HT_{2A} conduzem, indiretamente, ao aumento da liberação de glutamato¹²¹.

No entanto, no estudo de Straley e colaboradores (2017), quando examinaram o comportamento motor, verificaram que a AIM induzida por LPS no dia gestacional 12, não afetou o comportamento motor em animais com 9, 30 ou 60 dias de vida pós-natal¹⁰⁶. Em contraste, AIM induzida por LPS no dia gestacional 16, resultou em prejuízos no comportamento motor 9 dias após o nascimento. Trinta dias após o nascimento, este comportamento não estava mais presente. No entanto, na idade adulta, houve o retorno da hiperatividade.

É interessante ressaltar que, devido as diferenças na espécie, na idade de exposição, na duração da inflamação e nos diferentes imunógenos utilizados nos modelos animais, pode haver divergências nos resultados comportamentais apresentados pela prole¹⁰⁷. Neste contexto, há uma necessidade de entender melhor as consequências da exposição a um estímulo inflamatório e as alterações resultantes no comportamento em diferentes fases da vida da prole afetada¹⁰⁷. Neste estudo, foi demonstrado que a AIM no dia gestacional 15, tornou os animais suscetíveis, considerando que a exposição ao LPS induziu a uma hiperatividade, interação social alterada e comportamentos estereotipados. O modelo animal neste estudo utilizou o dia gestacional 15 (equivalente ao terceiro trimestre de gestação) para expor os animais ao LPS por ser um período crítico na neurogênese⁸⁷.

Neste contexto, a hipótese do envolvimento do sistema glutamatérgico da esquizofrenia é associada com os sintomas negativos, que incluem o isolamento social, apatia, anedonia e alogia. O comportamento social é comumente referido como o comportamento que ocorre em um contexto social e resulta da interação entre indivíduos da mesma espécie. Como os roedores são animais altamente sociais, a interação social pode ser eficientemente estudada sob condições experimentais¹⁰⁸. Lavelle, Healey e McCabe (2014) em sua revisão, demonstrou que sujeitos com diagnóstico de esquizofrenia exibem déficits cognitivos sociais

importantes. Neste estudo, verificou-se uma alteração nos parâmetros de interação social, principalmente no que diz respeito ao aumento do tempo de latência do primeiro contato. Isso significa que o animal exposto ao LPS no período gestacional, precisou de mais tempo para realizar o primeiro contato com outro animal¹⁰⁹.

Meyer e Feldon (2014) sugerem que a ativação imune materna pode alterar os circuitos da dopamina do tecido cerebral do feto e propiciar alterações estruturais e funcionais ao longo do desenvolvimento⁴². Alterações em sistemas dopaminérgicos têm sido amplamente estudados no que diz respeito a AIM. Entretanto, ainda não está claro se este envolvimento está relacionado a perda de neurônios dopaminérgicos ou a um aumento no número de neurônios dopaminérgicos e liberação de dopamina^{87, 105}. Na esquizofrenia, a hipótese do envolvimento dopaminérgico é responsável pelos sintomas positivos da esquizofrenia que incluem alucinações visuais, auditivas, delírios, discursos e comportamentos amplamente desorganizados ou catatônicos¹²².

Movimentos estereotipados são caracterizado por movimentos intencionais, repetitivos, estereotipados e sem finalidade (frequentemente ritmados)¹¹⁷. A literatura traz que os movimentos estereotipados estariam correlacionados com o agravamento dos sinais positivos apresentados no espectro da esquizofrenia. Neste estudo, observou-se que os animais com 45 dias de vida, submetidos a AIM, apresentaram um aumento dos parâmetros relacionados aos movimentos estereotipados. Este resultado, associado aos demais apresentados previamente como o aumento da atividade locomotora e alteração na interação social, reforçam a hipótese de que a AIM pode estar relacionada ao comportamento relacionado a esquizofrenia em animais jovens. No estudo de Padgett, Sawa e Peled (2015) foi verificado que animais nocautes para a quimiocina Cxcr4 apresentaram um aumento dos movimentos estereotipados¹¹⁸.

Alguns estudos têm demonstrado que a exposição ao LPS ou Poly I:C no período gestacional está associado a um aumento da liberação de dopamina no estriado¹⁰⁵, diminuição da transmissão glutamatérgica mediada por NMDA, diminuição da transmissão GABAérgica no hipocampo³⁶ e presença de um comportamento relacionado a esquizofrenia em animais jovens³¹.

Neste sentido, a literatura tem discutido que um possível desequilíbrio na expressão de fatores relacionados à inflamação como IL-6, IL-1 β , IL-10 e

TNF α , tem um papel importante na fisiopatologia da esquizofrenia^{81,87,80,112}. No estudo realizado por Miller e colaboradores (2011) evidenciou-se que os níveis de citocinas pró-inflamatórias estão consistentemente aumentados em sujeitos com o diagnóstico de esquizofrenia. Ainda, outro estudo relatou que citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-12, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ estavam aumentados no sangue e no líquido cefalorraquidiano em sujeitos com esquizofrenia²³.

Neste estudo, foi demonstrado que houve um aumento significativo nos níveis de IL-1 β em tecido cerebral dos animais expostos ao LPS no período gestacional e avaliados após 7, 14 e 45 dias de nascimento. Uma associação entre infecção materna e aumento do risco de esquizofrenia na prole foi identificada usando evidências sorológicas. Nestes casos, a infecção durante a gravidez foi confirmada em amostras de sangue de mães daqueles que posteriormente desenvolveram o transtorno^{37,59,72}. Deve-se ressaltar que os 45 dias de vida, os animais ainda apresentavam um aumento da atividade locomotora, alteração da interação social e movimentos estereotipados.

Bilbo e colaboradores (2009) levantaram a hipótese de que mudanças comportamentais a longo prazo relacionadas a esquizofrenia estão associadas a alterações na função das células gliais¹¹³. Eles demonstraram que subconjuntos de microglias são permanentemente mantidos em um estado ativado na idade adulta como consequência da infecção perinatal e que um desafio imune subsequente na idade adulta pode causar níveis exagerados de citocinas¹¹³. Juckel e associados (2011), mostraram que a infecção materna durante a embriogênese contribui para a ativação microglial na prole. Esta ativação pode ser a responsável por manter os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , em tecido cerebral durante longos períodos, aumentando a vulnerabilidade tecidual¹¹⁴. Níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , podem estar relacionadas a ativação do inflamassoma NLRP3. NLRP3 é um complexo multiproteico citoplasmático do sistema imune inato que pode desencadear uma série de reações imunoinflamatórias¹²³. Uma vez ativado, o NLRP3 recruta a proteína ASC, que contém um domínio de recrutamento para caspase e pro-caspase-1. A pro-caspase-1, por sua vez, cliva a pro-IL-1 β e pro-IL-18 proteoliticamente em suas formas ativas, agravando a reação inflamatória¹²⁴.

Neste estudo foi observado que a ativação imune materna utilizando LPS

no dia gestacional 15, aumentou a quantificação do inflamassoma NLRP3 e os níveis de IL-1 β em tecido cerebral após 7, 14 e 45 dias de nascimento. A ativação do inflamassoma NLRP3 pode ser um dos responsáveis por manter um estado neuroinflamatório persistente no SNC e estar associado as alterações comportamentais. Alguns estudos sugerem que o inflamassoma NLRP3 possa contribuir para o desenvolvimento de transtorno do humor e déficits de memória⁷⁷. No estudo de Zhu e colaboradores (2016), foi avaliado o papel da ativação do inflamassoma NLRP3 nas alterações de comportamento a longo prazo de camundongos adultos expostos ao LPS. Foi demonstrado que estes camundongos exibiam comportamentos relacionados à depressão a longo prazo e déficit na memória de reconhecimento, expressão elevada de NLRP3, ASC e caspase-1; aumento dos níveis de IL-1 β , IL-18 e TNF α ; diminuição dos níveis de IL-10 e aumento da ativação da micróglia em tecido cerebral, corroborando com os dados deste estudo¹²⁵.

Estudos mostram que a ativação do inflamassoma NLRP3 está relacionado aos receptores toll-like. No contexto da exposição ao LPS, o receptor toll-like 4 tem sido implicado como ativador desta plataforma multiproteica. Entretanto, a quantificação deste receptor não foi realizada neste estudo. Na revisão de Harris (2017) sugere que a autofagia é um regulador da ativação do inflamassoma, levando subsequentemente a liberação de citocinas da família de IL-1, onde tem demonstrado desempenhar papéis na regulação da ativação do inflamassoma, desde a remoção de sinais endógenos ativadores do inflamassoma, até o sequestro e degradação de componentes do inflamassoma. Este estudo, se difere do relatado acima por se tratar de um modelo de AIM, onde o processo neuroinflamatório ocorre de forma indireta pois uma quantidade muito baixa de LPS acaba atravessando a barreira hemato-placentária e hemato-encefálica do feto. O que realmente acaba afetando o encefálo e iniciando um processo inflamatório são os altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Outro fator relevante é que, no modelo utilizado neste estudo, o encéfalo está em desenvolvimento, aumentando a vulnerabilidade a danos teciduais¹¹⁵.

Estes e McAllister (2016) em sua revisão, trouxeram evidências epidemiológicas que trazem a infecção materna como um fator de risco para o transtorno do espectro autista e a esquizofrenia, trazendo um contraponto com

modelos animais, onde demonstram que a AIM por si só já é suficiente para iniciar um processo fisiopatológico¹⁷. Estudos mostram que mesmo a infecção materna subclínica pode tornar a prole muito mais vulnerável a insultos inflamatórios^{1,17}.

	LPS	PBS
Atividade locomotora	↑	↓
Latência de primeiro contato	↑	↓
Número de contatos	↑	↓
Tempo total juntos	↑	↓
Sniffing	↑	↓
Grooming	↑	↓
Morder as unhas	↑	↓
Circular na caixa	↑	↓
Balançar cabeça	↑	↓
Nível de IL-1 β 7 dias	↑	↓
Nível de IL-1 β 14 dias	↑	↓
Nível de IL-1 β 45 dias	↑	↓
Expressão de NLRP3 7 dias	↑	↓
Expressão de NLRP3 14 dias	↑	↓
Expressão de NLRP3 45 dias	↑	↓

Quadro de resultados: Grupo LPS quando comparado com grupo PBS

6. CONCLUSÃO

Diante da questão problema exposta, na qual questionou-se se um insulto no período pré-natal acarretaria no desenvolvimento de um comportamento atípico, concluiu-se que a ativação imune materna leva à ativação do inflamassoma NLRP3 e consequente produção de IL-1 β . Mediante os resultados obtidos, animais jovens que foram expostos a endotoxemia no período gestacional apresentaram parâmetros alterados quando comparados com animais do grupo controle, onde desenvolveram um comportamento relacionado a esquizofrenia, que foram avaliados através dos testes de atividade locomotora, interação social e movimentos esteriotipados, junto com parâmetros alterados no perfil inflamatório, medidos através da ativação do inflamassoma NLRP3 e dos níveis elevados de IL-1 β . Em conjunto, os resultados deste estudo sugerem que a AIM pode causar a vulnerabilidade do SNC através da neuroinflamação e estar associado a alguns parâmetros relacionados à esquizofrenia.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir desse estudo, espera-se portas possam ser abertas para que pesquisas futuras sejam desenvolvidas para melhor elucidar os mecanismos fisiopatológicos que envolvem a AIM e sua relação com neuroinflamação e esquizofrenia, afim de obter melhor acompanhamento dos sujeitos expostos com intervenções objetivas e eficazes.

REFERÊNCIAS

1. Knuesel I, Chicha L, Britschgi M, Schobel SA, Bodmer M, Hellings JA, Toovey S, Prinssen EP. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat Rev Neurol*. 2014;10:643- 60.
2. Bale TL. Sex differences in prenatal epigenetic programming of stress pathways. *Stress*. 2011;14:348-56.
3. Jiang HY, Xu LL, Shao L, Xia RM, Yu ZH, Ling ZX, Yang F, Deng M, Ruan B. Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*. 2016; 58:165-72.
4. Ploeger A, Raijmakers ME, van der Maas HL, Galis F. The association between autism and errors in early embryogenesis: what is the causal mechanism? *Biol Psychiatry*. 2010; 67:602-7.
5. Scola G, Duong A. Prenatal maternal immune activation and brain development with relevance to psychiatric disorders. *Neuroscience*. 2017; 346:403-8.
6. Organização Mundial de Saúde. Ação de saúde pública para a prevenção do suicídio: um quadro. OMS; 2012
7. Cuesta MJ, Sanchez-Torres AM, Cabrera B, Bioque M, Merchán-Naranjo J, Corripio I. Premorbid adjustment and clinical correlates of cognitive impairment in first-episode psychosis. The PEPsCog Study. *Schizophr Res*. 2015; 164:65-73
8. Van Os J, Kapur S. Schizophrenia. *Lancet*; 2009; 374:635-45.
9. Kantrowitz JT, Javitt DC. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor dysfunction or dysregulation: the final common pathway on the road to schizophrenia? *Brain Res Bull*. 2010; 83:108–121.
10. Kapur, S.; Seeman, P. - Does fast dissociation from the dopamine D2 receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. *Am J Psychiatry* 2001; 158:360-369.
11. Lewis DA. Cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia—implications for preemptive interventions. *Eur J Neurosci* 2012; 35: 1871–78.
12. Caruncho HJ, Dopeso-Reyes IG, Loza MI, Rodriguez MA. A GABA, reelin, and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Crit Rev Neurobiol*. 2004; 16:25–32.

13. Frankle WG, Cho RY, Prasad KM, Mason NS, Paris J, Himes ML, Walker C, Lewis DA, Narendran R. In vivo measurement of GABA transmission in healthy subjects and schizophrenia patients. *Am J Psychiatry*. 2015; 172:1148–1159.
14. Trépanier MO, Hopperton KE, Mizrahi R, Mechawar N, Bazinet RP. Postmortem evidence of cerebral inflammation in schizophrenia: a systematic review. *Mol Psychiatry*. 2016; 21:1009-26.
15. Uhlhaas PJ, Singer W. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11:100-13.
16. Cohen M, Solowij N, Carr V. Cannabis, cannabinoids, and schizophrenia: integration of the evidence. *Aust N Z J Psychiatry*. 2008; 42:357-68.
17. Estes ML, McAllister AK. Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*. 2015; 16:469-86.
18. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992; 356:768-774.
19. Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, Higgins SC, Munoz-Planillo R, Inserra MC, Vetter I, Dungan LS, Monks BG, Stutz A, Croker DE, Butler MS, Haneklaus M, Sutton CE, Nunez G, Latz E, Kastner DL, Mills KH, Masters SL, Schroder K, Cooper MA, O'Neill LA. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med*. 2015; 21:248-55.
20. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:229-65.
21. Pétrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19:615-22.
22. Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*. 2013; 155:1596-609.
23. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry*. 2011; 70:663-71.

24. Modabbernia A, Taslimi S, Brietzke E, Ashrafi M. Cytokine alterations in bipolar disorder: a meta-analysis of 30 studies. *Biol Psychiatry*. 2013; 74:15- 25.
25. Tomasik J, Rahmoune H, Guest PC, Bahn S. Neuroimmune biomarkers in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2016; 176:3–13.
26. Murphy K. *Immunobiology of Jeneway*. 8 ed. Washington University School of medicine, St. Louis 2016.
27. Meyer U, Yee BK, Feldon J. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? *Neuroscientist* 2007; 13:241-56.
28. Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci* 2006; 26: 4752–4762.
29. Schaefer TM, Fahey JV, Wright JA, Wira CR. Innate immunity in the human female reproductive tract: antiviral response of uterine epithelial cells to the TLR3 agonist poly(I:C). *J Immunol* 2005; 174: 992–1002.
30. Oskvig DB, Elkahloun AG, Johnson KR, Phillips TM, Herkenham M. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain Behav Immun*. 2012; 26:623-34.
31. da Silveira VT, Medeiros DC, Ropke J, Guidine PA, Rezende GH, Moraes MF, Mendes EM, Macedo D, Moreira FA, de Oliveira AC. Effects of early or late prenatal immune activation in mice on behavior and neuroanatomical abnormalities relevant to schizophrenia in the adulthood. *Int J Dev Neurosci*. 2017; 58:1-8.
32. Fatemi SH, Cuadra AE, El-Fakahany EE, Sidwell RW, Thuras P. Prenatal viral infection causes alterations in nNOS expression in developing mouse brains. *Neuroreport*. 2000; 11:1493-6.
33. Jiang H, Liu Y, Zhang Y, Chen ZY. Association of plasma brain-derived neurotrophic factor and cardiovascular risk factors and prognosis in angina pectoris. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 415:99-103.
34. Varon E. Epidemiology of acute bacterial meningitis in adult patients in France. *Med Mal Infect*. 2009; 39:432-44.
35. Parboosing R, Bao Y, Shen L, Schaefer CA, Brown AS. Gestational

- influenza and bipolar disorder in adult offspring. *JAMA Psychiatry* 2013; 707: 677–685.
36. Ducharme, G., Lowe, G. C., Goutagny, R. & Williams, S. Early alterations in hippocampal circuitry and the theta rhythm generation in a mouse model of prenatal infection: implications for schizophrenia. *PLoS One* 2012; 7: e29754.
 37. Brown A. S. & Derkits E. J. Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *Am. J. Psychiatry* 2010; 167:261–280.
 38. Dammann O, Leviton A. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr Res* 1997; 42: 1–8.
 39. Johnson J, Anderson B, Pass RF. Prevention of maternal and congenital cytomegalovirus infection. *Clin Obstet Gynecol* 2012; 55: 521–530.
 40. Schwarz JM, Bilbo SD. LPS elicits a much larger and broader inflammatory response than *Escherichia coli* infection within the hippocampus of neonatal rats. *Neurosci Lett*. 2011; 497:110–5.
 41. Ghiani CA, Mattan NS, Nobuta H, Malvar JS, Boles J, Ross MG, Waschek JA, Carpenter EM, Fisher RS, de Vellis J. Early effects of lipopolysaccharide-induced inflammation on foetal brain development in rat. *ASN Neuro*. 2011; 3:10.1042/AN20110027.
 42. Meyer U. Prenatal poly (i: C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biol. Psychiatry* 2014; 75:307–315.
 43. Richetto J, Calabrese F, Riva MA, Meyer U. Prenatal immune activation induces maturation-dependent alterations in the prefrontal GABAergic transcriptome. *Schizophr Bull*. 2014; 40:351–61.
 44. Faro S1, Fenner DE. Urinary tract infections. *Clin Obstet Gynecol*. 1998; 4:744-54
 45. Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2006; 11:47-55.
 46. Campagne G, Schuchat A, Djibo S, Ousseini A, Cisse L, Chippaux JP. Epidemiology of bacterial meningitis in Niamey, Niger, 1981-96. *Bull World Health Organ*. 1999; 77:499-508.
 47. Hanke ML, Kielian T. Toll-like receptors in health and disease in

- the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci*. 2011; 121:367-87.
48. Wang X, Rousset CI, Hagberg H, Mallard C. Lipopolysaccharide induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006; 11:343-53.
 49. Weizman R, Laor N, Karp L, Dagan E, Reiss A, Dar DE, Wolmer L, Gavish M. Alteration of platelet benzodiazepine receptors by stress of war. *Am J Psychiatry*. 1994; 15:766-7.
 50. Hava G, Vered L, Yael M, Mordechai H, Mahoud H. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. *Dev Psychobiol*. 2006; 48:162-8.
 51. Dantzer R, Wollman EE. Relationships between the brain and the immune system. *J Soc Biol*. 2003; 197:81-8.
 52. Mansur RB, Zugman A, Asevedo Ede M, da Cunha GR, Bressan RA, Brietzke E. Cytokines in schizophrenia: possible role of anti-inflammatory medications in clinical and preclinical stages. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2012; 66:247-60.
 53. Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia*. 2001; :180-90.
 54. Jones KA, Thomsen C. The role of the innate immune system in psychiatric disorders. *Mol Cell Neurosci*. 2013; 53:52-62.
 55. O'Loughlin E, Pakan JMP, Yilmazer-Hanke D, McDermott KW. Acute in útero exposure to lipopolysaccharide induces inflammation in the pre- and post natal brain and alters the glial cyto architecture in the developing amygdala. *J Neuroinflammation*. 2017; 14:212.
 56. Broz P, Monack DM. Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunol Rev*. 2011; 243:174-90.
 57. Liu Z, Zaki MH, Vogel P, Gurung P, Finlay BB, Deng W, Lamkanfi M, Kanneganti TD. Role of inflammasomes in host defense against *Citrobacter rodentium* infection. *The Journal of biological chemistry* 2012; 287:16955- 16964.
 58. Kim HK, Andreazza AC, Elmi N, Chen W, Young LT. Nod-like receptor pyrin-containing 3 (NLRP3) in the post-mortem frontal cortex from patient with bipolar disorder: A potential mediator between mitochondria and immune- activation. *J Psychiatr Res*. 2016; 72:43-50.
 59. Brown AS, Begg MD, Gravenstein S, Schaefer CA, Wyatt RJ, Bresnahan M. Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2004; 61:774-80.

60. Abelli M, Chelli B, Costa B, Lari L, Cardini A, Gesi C, Muti M, Lucacchini A, Martini C, Cassano GB, Pini S. Reductions in platelet 18-kDa translocator protein density are associated with adult separation anxiety in patients with bipolar disorder. *Neuropsychobiology*. 2010; 62:98-103.
61. Mathers C, Fat DM, Boerma JT. The global burden of disease: 2004 update. World Health Organization (2008).
62. Bystron I, Blakemore C, Rakic P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci*. 2008; 9:11022.
63. Solek CM, Farooqi N, Verly M, Lim TK, Ruthazer ES. Maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. *Dev Dyn*. 2018; 247:588-619.
64. Glausier JR, Lewis DA. Dendritic spine pathology in schizophrenia. *Neuroscience* 2013; 251:90–107.
65. Sekar A, Bialas AR, Rivera H, Davis A, Hammond TR, Kamitaki N, Tooley K, Presumey J, Baum M, Doren VV, Genovese G, Rose SA, Handsaker RE, Daly MJ. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature*. 2016; 530:177-83.
66. Li Z, Lei W, Deng W, Zheng Z, Li M, Ma X. Aberrant spontaneous neural activity and correlation with evoked brain potentials in first-episode, treatment-naïve patients with deficit and non-deficit schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2017; 261:9-19.
67. McKechnie AG, Moorhead TW, Stanfield AC, Whalley HC, Johnstone EC, Lawrie SM. Negative symptoms and longitudinal grey matter tissue loss in adolescents at risk of psychosis: preliminary findings from a 6-year follow-up study. *Br J Psychiatry*. 2016; 208:565-70.
68. Mittal VA, Dean DJ, Bernard JA, Orr JM, Pelletier-Baldelli A, Carol EE. Neurological soft signs predict abnormal cerebellar-thalamic tract development and negative symptoms in adolescents at high risk for psychosis: a longitudinal perspective. *Schizophr Bull*. 2014; 40:1204-15.
69. Barch DM. Cerebellar-thalamic connectivity in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2014; 40:1200-3.
70. Kahn RS, Sommer IE, Murray RM, Meyer-Lindenberg A, Weinberger DR, Cannon TD, O'Donovan M, Correll CU, Kane JM, van Os J, Insel TR. Schizophrenia. *Nat Rev Dis Primers*. 2015; 1:15067.

71. Ungprasert P, Wijarnpreecha K, Cheungpasitporn W. Patient with schizophrenia have a high risk of psoriasis: A systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Res.* 2017; 259:422-426.
72. Brown A. S. Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. *Dev. Neurobiol* 2012; 72:1272–1276.
73. Eaton WW. The burden of mental disorders. *Epidemiol. Rev.* 2008; 30:1–4.
74. Khandaker GM, Zimbron J, Lewis G, Jones PB, Babulas V, Factor-Litvak P. Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: a systematic review of population-based studies. *Psychol Med.* Cambridge University Press. 2013; 43:239–57
75. Deane AR, Millar J, Bilkey DK, Ward RD. Maternal immune activation in rats produces temporal perception impairments in adult offspring analogous to those observed in schizophrenia. *PLoS One.* 2017; 12:e0187719.
76. Piontkewitz Y, Arad M, Weiner I. Tracing the development of psychosis and its prevention: what can be learned from animal models. *Neuropharmacology* 2012; 62:1273–1289.
77. Zhang Y, Cazakoff BN, Thai CA, Howland JG. Prenatal exposure to a viral mimetic alters behavioural flexibility in male, but not female, rats. *Neuropharmacology* 2012; 62:1299–1307.
78. Kirsten TB, Taricano M, Maiorka PC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. *Neuroimmunomodulation* 2010; 17:240-51.
79. Arsenault D; St-Amour I; Cisbani G; Rousseau LS; Cicchetti F. Os diferentes efeitos dos desafios imunológicos pré-natais LPS e poli I: C sobre o comportamento, desenvolvimento e respostas inflamatórias em camundongos grávidas e seus descendentes. *Brain Behav Immun.* 2014; 38:77-90.
80. Boksa P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. *Brain Behav Immun.* 2010; 24:881-97.
81. Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci.* 2007; 27:10695-702.
82. Machado MG, Oliveira HA, Cipolotti R, Santos CA, de Oliveira EF, Donald RM. Anatomical and functional abnormalities of central nervous system in autistic disorder: a MRI and SPECT study. *Arq*

Neuropsychiatr 2003; 61:957-61

83. Ballendine SA. Behavioral alterations in rat offspring following maternal immune activation and ELR-CXC chemokine receptor antagonism during pregnancy: implications for neurodevelopmental psychiatric disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2015; 57:155–165 (2015).
84. Dickerson DD. Association of aberrant neural synchrony and altered GAD67 expression following exposure to maternal immune activation, a risk factor for schizophrenia. *Transl. Psychiatry* 2014; e418.
85. Machado CJ, Whitaker AM, Smith SE, Patterson PH, Bauman MD. Maternal immune activation in nonhuman primates alters social attention in juvenile offspring. *Biol. Psychiatry* 2015; 77:823–832.
86. Sangha S, Greba Q, Robinson PD, Ballendine SA, Howland JG. Heightened fear in response to a safety cue and extinguished fear cue in a rat model of maternal immune activation. *Front. Behav. Neurosci.* 2014; 8:168.
87. Meyer U, Murray PJ, Urwyler A, Yee BK, Schedlowski M, Feldon J. Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling. *Mol Psychiatry*. 2008; 13:208–221
88. File SE, Seth P. A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol* 2003; 463:35-53.w
89. Fineberg AM, Ellman LM Review Inflammatory cytokines and neurological and neurocognitive alterations in the course of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2013 May 15; 73(10):951-66.
90. Parboosing R, Bao Y, Shen L, Schaefer CA, Brown AS. Gestational influenza and bipolar disorder in adult offspring. *JAMA Psychiatry*. 2013 Jul; 70(7):677-85.
91. Antonelli M. C. Perinatal Programming of Neurodevelopment. New York, NY: Springer. (Ed.). (2015).
92. Harvey L, Boksa P Review Prenatal and postnatal animal models of immune activation: relevance to a range of neurodevelopmental disorders. *Dev Neurobiol.* 2012 Oct; 72(10):1335-48.
93. Han X, Li N, Meng Q, Shao F, Wang W. Maternal immune activation impairs reversal learning and increases serum tumor necrosis factor- α in offspring. *Neuropsychobiology*. 2011; 64(1):9-14.

94. Hsiao EY, McBride SW, Chow J, Mazmanian SK, Patterson PH. Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 31; 109(31):12776-81.
95. Onore CE, Schwartz JJ, Careaga M, Berman RF, Ashwood P. *Brain Behav Immun*. 2014 May; 38():220-6.
96. Patterson PH. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behav Brain Res*. 2009 Dec 7; 204(2):313-21.
97. Rudolph MD, Graham AM, Feczko E, Miranda-Dominguez O, Rasmussen JM, Nardos R,. Maternal IL-6 during pregnancy can be estimated from newborn brain connectivity and predicts future working memory in offspring. Entringer S, Wadhwa PD, Buss C, Fair DA *Nat Neurosci*. 2018 May; 21(5):765-772.
98. Spann MN, Monk C, Scheinost D, Peterson BS. Maternal Immune Activation During the Third Trimester Is Associated with Neonatal Functional Connectivity of the Salience Network and Fetal to Toddler Behavior.. *J Neurosci*. 2018 Mar 14; 38(11):2877-2886.
99. Fatemi SH, Emamian ES, Sidwell RW, Kist DA, Stary JM, Earle JA, Thuras P. Human influenza viral infection in utero alters glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the developing brains of neonatal mice. *Mol Psychiatry*. 2002; 7(6):633-40.
100. Jennische E, Hansson HA, Holmång A *Am J Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning*. Samuelsson AM, *Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006 May; 290(5):R1345-56.
101. Smith PL, Hagberg H, Naylor AS, Mallard C. Neonatal peripheral immune challenge activates microglia and inhibits neurogenesis in the developing murine hippocampus. *Dev Neurosci*. 2014; 36(2):119-31.
102. Bauman, M. D., Iosif, A.-M., Smith, S. E. P., Bregere, C., Amaral, D. G., and Patterson, P. H. (2014). Activation of the maternal immune system during pregnancy alters behavioral development of rhesus monkey offspring. *Biol. Psychiatry* 75, 332–341. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.06.025
103. Murray RM, Bhavsar V, Tripoli G¹, Howes O¹. 30 Years on: How the Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia Morphed Into the Developmental Risk Factor Model of Psychosis. *Schizophr Bull*. 2017 Oct 21;43(6):1190-1196. doi: 10.1093/schbul/sbx121.
104. Fortier, M.E, Joober, R, Luheshi,GN, Boksa P. Maternal exposure to

- bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine-induced locomotion and startle responses in adult rat offspring. *J Psychiatr Res*, 38 (2004), pp. 335-345
105. Zuckerman L, Weiner I. Maternal immune activation leads to behavioral and pharmacological changes in the adult offspring. *J Psychiatr Res*, 39 (2005), pp. 311-323
 106. Straley ME ¹, Van Oeffelen W ², Theze S ³, Sullivan AM ², O'Mahony SM ², Cryan JF ², O'Keeffe GW. Alterações distintas no comportamento de procura de motor e recompensa são dependentes da idade gestacional da exposição à ativação imune materna induzida por LPS. *Brain Behav Immun*. Julho de 2017 ; 63:
 107. Fortier,ME, Luheshi,GN, Boksa P Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy *Behav Brain Res*, 181 (2007), pp. 270-277
 108. Crawley JN (2007). Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol* **17**: 448–459.
 109. Lavelle M¹, Healey PG, McCabe R. Nonverbal behavior during face-to-face social interaction in schizophrenia: a review. *J Nerv Ment Dis*. 2014 Jan;202(1):47-54. doi: 10.1097/NMD.0000000000000031.
 110. Timothy R.Campellone; Ann M.Kring Anticipated pleasure for positive and negative social interaction outcomes in schizophrenia. Elsevier 2018
 111. Tyler Cash-Padgett,Akira Sawa e Hanna Jaaro-Peled. Estereotipia aumentada em camundongos knockout Cxcr4 condicionais. *Neurosci Res*. 2016 Apr; 105: 75–79.
 112. Canetta, S., Sourander, A., Surcel, H.-M., Hinkka-Yli-Salomä ki, S., Leiviskä , J., Kellendonk, C., et al. (2014). Elevated maternal C-reactive protein and increased risk of schizophrenia in a national birth cohort. *Am. J. Psychiatry* 171, 960–968. doi: 10.1176/appi.ajp.2014.13121579
 113. Bilbo, J.M. SchwarzEarly-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system*Front Behav Neurosci*, 3 (2009), pp. 1-14
 114. Juckel, M.P. Manitz, M. Brune, A. Friebe, M.T.Heneka, R.J . WolfMicroglial activation in a neuroinflammation animal model of schizophrenia- pilot study *Schizophr Res*, 131 (2011), pp. 96-100

115. Harris, James; Lang, Tali; Thomas, Jacinta P W; Sukkar, Maria B; Nabar, Neel R; Kehrl, John H. Immunology and Microbiology; Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. Elsevier BV 2017
116. Giovanoli, S Tina Notter, Juliet Richetto, Marie A. Labouesse, Stéphanie Vuillermot, Marco A. Riva ,e Urs Meyer. Ativação imunológica pré-natal tardia causa déficits hipocámpais na ausência de inflamação persistente ao longo do envelhecimento. J Neuroinflamação . 2015; 12: 221
117. Mackenzie k. Distúrbios do Movimento Estereotípico. Elsevier 2018
118. Padgett, TC Sawa A e Hanna Jaaro-Peled. Estereotipia aumentada em camundongos knockout Cxcr4 condicionais. Neurosci Res. 2016 Apr; 105: 75–79.
119. Vollenweider FX¹, Geyer MA. A systems model of altered consciousness: integrating natural and drug-induced psychoses. Brain Res Bull. 2001 Nov 15;56(5):495-507..
120. Fletcher PC¹, Honey GD. Schizophrenia, ketamine and cannabis: evidence of overlapping memory deficits. Trends Cogn Sci. 2006 Apr;10(4):167-74. Epub 2006 Mar 10.
121. Muschamp JW¹, Regina MJ, Hull EM, Winter JC, Rabin RA. Lysergic acid diethylamide and [-]-2,5-dimethoxy-4-methylamphetamine increase extracellular glutamate in rat prefrontal cortex. Brain Res. 2004 Oct 8;1023(1):134-40.
122. Lau LW ¹, Cua R , MB Keough , Haylock-Jacobs S , Yong VW . Fisiopatologia da matriz extracelular cerebral: um novo alvo para a remielinização. Nat Rev Neurosci. 2013 Oct; 14 (10): 722-9. doi: 10.1038 / nrn3550. Epub 2013 ago 29.
123. Shao BZ¹, Xu ZQ¹, Han BZ¹, Su DF¹, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. Front Pharmacol. 2015 Nov 5;6:262. doi: 10.3389/fphar.2015.00262. eCollection 2015.
124. Ema Ozaki, Matthew Campbell, Sarah L Doyle Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspective. J Inflamm Res. 2015; 8: 15–27.
125. Zhu W, Cao FS, Feng J, et al. A ativação do inflamassoma NLRP3 contribui para alterações comportamentais a longo prazo em camundongos injetados com lipopolissacarídeo. Neurociência . 2016; 343: 77-84.