



**UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PAULA DIAS**

**EFEITOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO NOS PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES EM LONGO PRAZO NO SISTEMA  
NERVOSO CENTRAL APÓS ATIVAÇÃO IMUNE NEONATAL**

Palhoça

2022

**PAULA DIAS**

**EFEITOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO NOS PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES EM LONGO PRAZO NO SISTEMA  
NERVOSO CENTRAL APÓS ATIVAÇÃO IMUNE NEONATAL**

**LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador (a): Profa. Franciane Bobinski, Dra.

Palhoça

2022

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - DOUTORADO**

Título da Tese

Efeitos do ambiente enriquecido nos parâmetros comportamentais e moleculares em longo prazo no sistema nervoso central após ativação imune neonatal

**PAULA DIAS**  
AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Tese em 19 de agosto de 2022.

Doutora Franciane Bobinski (Orientador) Franciane Bobinski

Doutora Jaqueline da Silva Generoso (Avaliador externo - UNESC) – presente por *videoconferência*

Doutora Josiane Budni (Avaliador externo - UNESC) – presente por *videoconferência*

Doutora Anna Paula Piovezan (Avaliador interno - PPGCS) – presente por *videoconferência*

Doutor Rafael Mariano de Bitencourt (Avaliador interno - PPGCS) – presente por *videoconferência*

*Professora Doutora Gislaire Tezza Rezzi*

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

- Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina, Sede, Reitoria - Av. José Acácio Moreira, 787, Bairro Dehon - 88704-900, Tubarão, SC - Fone 48 3621.3000
- Unisul Região Sul
  - Campus Tubarão - Avenida José Acácio Moreira, 787, Bairro Dehon, Caixa Postal 370 - 88704-900, Tubarão, SC - Fone 48 3621.3000
  - Campus Araranguá - Rodovia Governador Jorge Lacerda, 3201, Bairro Urussanguinha - 88905-355, Araranguá, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3521-3000
  - Campus Braço do Norte - Rodovia SC 370, 1023, Rio Bonito - 88750-000, Braço do Norte, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3621-3925
  - Campus Içara - Rua Linha Três Ribeirões, Loteamento Centenário, 250, Bairro Liri - 88820-000, Içara, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3621-3460
- Unisul Região Grande Florianópolis
  - Campus Pedra Branca - Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária Pedra Branca, 88137-270, Palhoça, SC - Fone 48 3279.1000
  - Campus Florianópolis - Rua Dib Mussi, 366, Centro - 88015-110, Florianópolis, SC - Fone 48 3279.1000
    - Rua Trajano, 219, Centro - 88010-010, Florianópolis, SC - Fone 48 3279.1000
- Campus Unisul Digital - Av. Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - 88137-900, Palhoça, SC - Fone 48 3279.1200



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradecer a Deus!

Agradecer meus pais e minha irmã, pelo apoio e incentivo ao longo desses anos, nada que eu diga ou faça será o suficiente para retribuir. Sou muito grata por ter pais que me incentivaram a estudar e aproveitar as oportunidades. Espero que vocês estejam orgulhos de onde eu cheguei.

Agradecer meu amado esposo, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e por vezes, acreditando mais em mim do que eu mesma, peço desculpas pelas vezes que estive ausente nesses anos.

Agradecer minhas colegas e amigas Vivi e Lê, obrigada pelo companheirismo ao longo desses anos, sou muito grata por tudo que me ensinaram e principalmente por me acolherem com tanto carinho. Aprendo muito com vocês.

Agradecer a Profa Franciane, por me acolher e me ajudar, por estar sempre atenta e disposta a me ensinar. Obrigada!

E de maneira geral gostaria de agradecer a todos que estiveram presente nesses anos de doutorado, não é fácil chegar ao final desta jornada, mas é gratificante!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001, com o apoio do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições Comunitárias de Ensino Superior (PROSUC/CAPES), com o apoio da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL).

## RESUMO

**Introdução:** A ativação imune neonatal (AIN) promove no sistema nervoso central (SNC), alterações comportamentais e neuroquímicas em longo prazo. O enriquecimento ambiental (EA), consiste em uma alternativa promissora na modulação de tais alterações causadas pela NIA. **Objetivo:** Avaliar os efeitos de um ambiente enriquecido nos parâmetros comportamentais e neuroquímicos em longo prazo no SNC após a AIN. **Métodos:** Foram utilizados camundongos C57BL/6 de dois dias de idade que receberam PBS ou LPS (indução da AIN). A partir dos 28 dias de vida, os camundongos foram submetidos a um protocolo de EA de 3 horas/dia, durante 5 dias/semana, até os 60 ou 120 dias de vida. Após completarem os protocolos de EA, foi realizada a avaliação da memória através dos testes comportamentais campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto aquático de Morris. Após os testes comportamentais, foi avaliado a neuroinflamação (níveis de citocinas e os níveis de BDNF pelo Enzyme-Linked Immunosorbent Assay e o imunocontéudo da proteína GSK-3 $\beta$  e do peptídeo  $\beta$ -amiloide por *Western blotting Assay* no hipocampo e córtex dos animais. **Resultados:** O EA melhorou a capacidade de memória aos 60 e 120 dias de vida, aumentou os níveis de BDNF, diminuiu os níveis da interleucina (IL)-1 $\beta$  e do fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  aos 60 e 120 dias no córtex e hipocampo. O EA até 60 dias reduziu o imunocontéudo de GSK-3 $\beta$  no hipocampo e o EA 120 dias reduziu GSK-3 $\beta$  em hipocampo e córtex. **Conclusão:** Os presentes resultados demonstram a importância de utilizar EA, visando minimizar danos em longo prazo após AIN, transacionando isso para aspectos clínicos, o EA pode ser utilizado como uma estratégia experimental, não invasiva de prevenção em neonatos após processo de neuroinflamação.

**Palavras-chave:** Ativação Imune Neonatal. Enriquecimento Ambiental. Memória. Citocinas. Neurotrofinas. Neurodegeneração

## ABSTRACT

**Introduction:** Neonatal immune activation (NIA) promotes long-term behavioral and neurochemical changes in the central nervous system (CNS). Environmental enrichment (EE) is a promising alternative to modulate such changes caused by NIA. **Objective:** To evaluate the effects of an EE on long-term behavioral and neurochemical parameters in the CNS after NIA. **Methods:** Two days old, C57BL/6 mice that received either PBS or LPS (AIN induction) were used. Twenty eight days old, mice were submitted to an EE protocol of 3 hours/day, for 5 days/week, until 60 or 120 days old. After completing the EE protocols, memories were evaluated through the open field, object recognition and Morris water maze behavior tests. After behavioral tests, neuroinflammation (cytokine levels and BDNF levels by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) and the immunocontent of proteins of GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -amyloid by Western blotting Assay in the hippocampus and total cortex of the animals were evaluated. **Results:** EE improved memory capacity at 60 and 120 days old, increased BDNF levels, decreased interleukin (IL)-1 $\beta$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  levels at 60 and 120 days in cortex and hippocampus. The EE up to 60 days reduced the immunocontent of GSK-3 $\beta$  in the hippocampus and the EE 120 days reduced GSK-3 $\beta$  in the hippocampus and cortex. **Conclusion:** The present results demonstrate the importance of using EE, aiming to minimize long-term damage after NIA. Transposing this to clinical aspects, EE can be used as an experimental, non-invasive strategy for prevention in neonates after neuroinflammation process.

**Keywords:** Neonatal immune activation. Environmental enrichment. Memory. cytokines. Neurotrophins. Neurodegeneration

## LISTAS

Lista de abreviaturas

AIN- Ativação Imune Neonatal

A $\beta$ - Proteína  $\beta$ -amiloide

APP- Proteína Percursora Amiloide

BDNF- Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo

BHE- Barreira Hematoencefálica

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimento Animal

DA- Doença de Alzheimer

DBCA - Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos

EA- Enriquecimento ambiental

GSK3 – Glicogênio sintase- cinase 3

IL- Interleucina

LANEX- Laboratório de neurociência experimental

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LPS - Lipopolissacarídeo

LTP- Potencial de longa duração (*Long Term Potentiation*)

MAP- Proteínas Associadas a Microtúbulos (*Microtubule Associated Protein*)

MIA- Morte indolor assistida

NF- $\kappa$ B - Fator nuclear Kappa B

NGF- fator de crescimento de nervo (*Nerve Growth Factor*)

PBS – Tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PAMPs- Padrões Moleculares Associados à Patógenos (*Pathogen Associated Molecular Pattern*).

PRRs- Receptores de Reconhecimento de Padrões (*Pattern Recognition Receptor*)

SN - Sistema nervoso

SNC - Sistema nervoso central

TLR - *Toll-Like* Receptor

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*)

UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina

UNISUL- Universidade do Sul de Santa Catarina

Lista de quadros

Quadro 1 - Materiais e equipamentos .....	36
Quadro 2 - Quadro de Variáveis .....	44

Lista de figuras

Figura 1 - Grupos experimentais.....	38
Figura 2 - Delineamento do estudo.....	40

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO .....	17
1.1.1 Neurodesenvolvimento.....	17
1.1.2 Ativação Imune Neonatal .....	18
1.1.3 Neuroinflamação.....	20
1.1.4 Processos neurodegenerativos associados a ativação imune neonatal e processos neuroinflamatórios.....	24
1.1.5 Enriquecimento Ambiental.....	28
1.1.6 Modelo animal de ativação imune neonatal.....	33
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>3. MÉTODOS</b> .....	36
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	36
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	36
3.3 ANIMAIS.....	37
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	38
3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS.....	40
3.5.1 Modelo animal de Ativação Imune Neonatal.....	40
3.5.2 Protocolo de enriquecimento ambiental.....	40
3.5.3 Testes de memória e aprendizado.....	41
3.5.3.1 Labirinto Aquático de Morris .....	41
3.5.3.2 Habituação ao Campo Aberto.....	42
3.5.3.3 Reconhecimento de objetos.....	42
3.5.4 Avaliação de citocinas e de fator neurotrófico derivado do encéfalo.....	43
3.5.5. Ensaio Western Blotting.....	43
3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	44
3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	45
3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	45

<b>4. ARTIGO.....</b>	<b>47</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO A- Parecer Aprovação da Comissão de Ética .....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO B – Produção científica publicada durante o período do Doutorado .....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O sistema imune no período neonatal ainda está imaturo o que o torna mais suscetível a agentes infecciosos presentes neste período. O encéfalo em desenvolvimento se torna vulnerável a alterações decorrentes de uma resposta inflamatória sistêmica, pois o aumento dos mediadores pró-inflamatórios podem aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e levar à ativação microglial e astrocitária. A ativação da microglia inicia um processo de neuroinflamação sustentada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias diretamente no tecido encefálico. Esse processo neuroinflamatório pode ocasionar alterações significativas em áreas específicas do sistema nervoso central (SNC), provocando prejuízos nas funções cognitivas como memória e aprendizado<sup>1</sup>. Estudos têm demonstrado que o processo neuroinflamatório no período neonatal pode estar associado a déficits neurológicos em longo prazo, tanto em estudos clínicos<sup>2,3</sup> quanto em estudos pré-clínicos<sup>4,5</sup>. Dias e colaboradores (2019), demonstraram que após 60, 120 e 180 dias da ativação imune neonatal (AIN), houve alterações na memória visuo-espacial<sup>6</sup>.

As infecções causadas por bactérias Gram-negativas são de alta prevalência durante os períodos pré-natal e neonatal. O lipopolissacarídeo (LPS) é o principal constituinte da membrana externa de bactérias Gram-negativas<sup>7</sup>. Em animais expostos ao LPS, o comprometimento da memória e do aprendizado foi associado à perda neuronal em regiões do hipocampo, área importante na consolidação, armazenamento e evocação da memória<sup>8-12</sup>. Há evidências que demonstram uma associação entre processos neuroinflamatórios e neurodegenerativos<sup>13-16</sup>. Estudos tem demonstrado que a exposição ao LPS no período neonatal pode ocasionar alterações nos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) a longo prazo em áreas como hipocampo<sup>17</sup>. É sabido que alterações nos níveis de BDNF, estão relacionados a alterações cognitivas<sup>18</sup>.

As doenças neurodegenerativas são condições debilitantes, caracterizadas por uma degeneração progressiva das células neuronais, resultando no comprometimento das funções superiores, como a memória e o aprendizado<sup>19</sup>. Na doença de Alzheimer (DA), uma das mais conhecidas doenças neurodegenerativas, há presença de alterações cognitivas e degeneração sináptica em áreas como hipocampo e córtex,

associado ao acúmulo de placas senis, emaranhados neurofibrilares e aumento da expressão das proteínas glicogênio sintase cinase-3  $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), tau e  $\beta$ -amiloide em tecido encefálico, proteínas envolvidas nos déficits das funções cognitivas<sup>19-22</sup>.

De acordo com estudos pré-clínicos, observa-se que a AIN (AIN), traz alterações no processo de memória a longo prazo, assim como, alterações em aspectos morfológico e bioquímicos. Este processo neuroinflamatório que acontece na ativação imune sistêmica apresenta relação com processos neurodegenerativos a longo prazo. Em um estudo realizado com animais submetidos a AIN, foi possível observar que, quando adultos (120 dias), apresentaram alterações na expressão das proteínas tau e GSK-3 $\beta$ , em hipocampo e córtex, assim como, alteração na memória visuo-espacial<sup>6</sup>.

Neste contexto, estudos pré-clínicos demonstram que a utilização do enriquecimento ambiental (EA) proporciona melhora nos aspectos cognitivos, estimula a plasticidade cerebral, a neurogênese e proporciona um aumento da expressão de fatores neurotróficos. Os fatores neurotróficos são expressos em grande quantidade em algumas regiões encefálicas como o hipocampo e estão envolvidos na neuroplasticidade relacionada à memória e aprendizagem, bem como em mecanismos protetivos contra os efeitos de possíveis insultos relacionados ao SNC<sup>23,24</sup>. O EA refere-se a condições de habitação em que os animais são mantidos em um ambiente que promove estimulação sensorial, minimiza interações sociais estressantes, aumenta o exercício voluntário, podendo ter um efeito sobre as funções cognitivas relacionadas a doenças do SNC<sup>25</sup>. Estudos vêm demonstrando que animais submetidos ao EA conseguem realizar melhor as tarefas relacionadas a memória e ao aprendizado, associado à integridade hipocampal<sup>26</sup>. Finalmente, há evidências que demonstram um aumento nos níveis de BDNF após um período de EA<sup>27,28</sup>. O EA tem apresentado efeitos benéficos em modelos experimentais de doenças como DA, Parkinson, síndrome do X frágil, síndrome de Down e esquizofrenia<sup>3,29</sup>.

Diante do exposto, verifica-se que um ambiente enriquecido possa ser uma alternativa na prevenção de alterações comportamentais e funcionais. O EA é uma intervenção não farmacológica e não invasiva que pode proteger o SNC e prevenir as consequências a longo prazo associadas à ativação imune. Transacionando para os aspectos clínicos, a exposição precoce a um processo neuroinflamatório torna o cérebro mais suscetível a desenvolver alterações significativas no neurodesenvolvimento associados a processos neurodegenerativos tardios. Um

ambiente enriquecido pode ser adaptado a um ambiente domiciliar e escolar devido ao seu baixo custo, proporcionando à criança uma melhora nos aspectos cognitivos, assim como, ação preventiva contra possíveis alterações neurofuncionais a longo prazo.

Diante disto, este estudo tem como pergunta de pesquisa: quais os efeitos da utilização de um ambiente enriquecido nos parâmetros comportamentais e moleculares no SNC após AIN? Perante o exposto acima este projeto baseia-se na hipótese de que um ambiente enriquecido possa trazer benefícios significativos quanto aos aspectos cognitivos em especial a memória e o aprendizado e aos parâmetros moleculares como diminuição dos níveis de citocinas, aumento dos níveis de neurotrofinas, assim como, diminuição do imunoconteúdo das proteínas envolvidas no processo neurodegenerativo, minimizando os efeitos do processo neuroinflamatório e promovendo efeitos preventivos quanto a aspectos relacionados a neurodegeneração a longo prazo.

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 Neurodesenvolvimento

O neurodesenvolvimento consiste em um processo progressivo de aquisição de competências cognitivas, motoras e comportamentais. O desenvolvimento de tais competências consiste em um processo contínuo e evolutivo e depende da maturação física e neuronal. Em relação ao desenvolvimento cerebral, o sistema nervoso (SN) tem sua formação iniciada ainda na concepção e continua a se desenvolver nos períodos pré e pós-natal, incluindo a fase adulta<sup>30,31</sup>. A modulação do neurodesenvolvimento ocorre através da programação genética, do nascimento celular, da formação de sinapses, da morte celular e da poda sináptica. A especialização morfo-químico-funcional permite a formação de conexões entre neurônios<sup>32</sup>. É fundamental que os neurônios estabeleçam conexões entre si, pois somente a partir da formação das redes neurais torna-se possível o processo de aprendizagem<sup>30</sup>.

O estágio final de maturação do SN é marcado pelo processo de mielinização. Este processo se inicia no útero (sexto mês de vida intrauterina) e se intensifica após o nascimento. Desta forma o processo de mielinização tem uma relação direta com a

aprendizagem<sup>33</sup>. O cérebro em desenvolvimento é plástico, ou seja, capaz de reorganização de padrões e sistemas de conexões sinápticas com vistas a readequação do crescimento do organismo às novas capacidades intelectuais e comportamentais da criança. Embora a produção e a migração de neurônios apareçam como eventos pré-natais, os mesmos continuam durante um período prolongado após o nascimento com diferenciação e maturação durante toda a infância e fase adulta<sup>30</sup>. A estrutura morfológica e estrutural do encéfalo não está completamente estabelecida após o nascimento e continua a se desenvolver ao longo da primeira infância<sup>34</sup>.

De maneira geral, primeiramente amadurecem as regiões correspondentes as funções primárias, tais como os sistemas motores e sensoriais. Em seguida, amadurecem a região do córtex de associação temporal e parietal, que está relacionado às habilidades básicas de linguagem e à atenção espacial. Por último, amadurece o córtex pré-frontal, lateral e temporal, que são áreas de associação, que intervêm entre processos sensorio-motores e modulam a atenção básica e os processos de linguagem<sup>34,35,36</sup>.

O desenvolvimento do SNC acontece de maneira continua recebendo influência de fatores internos e externos, que podem interferir na trajetória do desenvolvimento e maturação neurológica<sup>37,38,39</sup>. Visto que o sistema imune no recém-nascido ainda está em processo de formação, torna-se mais vulnerável a exposição a insultos infecciosos como bactérias e processos inflamatórios. Esses fatores podem levar ao comprometimento do desenvolvimento cerebral, contribuindo para mudanças a longo prazo, como alterações nas funções cognitivas e comportamentais.

### **1.2.2 Ativação Imune Neonatal**

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 imune<sup>40</sup>. A ativação imune ocorre através de um processo infeccioso, causado por agentes patogênicos como bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas<sup>41,42</sup>, assim como através de endotoxinas ou mediadores inflamatórios como o LPS<sup>43</sup>.

A resposta imune inata é um mecanismo natural de defesa inicial que compreende mecanismos de barreiras, celulares e fatores humorais. A defesa contra

patógenos é baseada, em partes, na expressão de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) para estruturas específicas dos micro-organismos denominados de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Dentre os PRRs encontra-se os receptores *toll-like* (TLR). Os TLR são uma família de proteínas transmembranas que atuam no sistema imune inato e são expressos na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células epiteliais ou no citoplasma de células de diferentes tecidos<sup>44</sup>.

Existem diferentes tipos de TLR identificados, dentre eles o TLR-4 que reconhece o LPS bacteriano, uma vez que o LPS entra em contato com o organismo animal, inicia-se uma série de respostas no organismo infectado<sup>45-49</sup>.

Resumidamente, o TLR-4 possui a habilidade de ativar o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). O NF- $\kappa$ B alerta o sistema imune quanto a presença de patógenos bacterianos, ativando subseqüentemente mediadores pró-inflamatórios que irão ativar a óxido nítrico sintase induzível e a ciclooxigenase. Outra função bem descrita do NF- $\kappa$ B é a estimulação e liberação de citocinas pró-inflamatórias<sup>40</sup>.

As citocinas são descritas como pequenas proteínas inflamatórias 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 fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL) 1 $\beta$  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<sup>50,51</sup>. O equilíbrio existente entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, permite uma resposta imune efetiva e ao mesmo tempo, tem a função de proteger o hospedeiro de uma resposta inflamatória excessiva<sup>52</sup>. Em resumo, a ativação imune através do LPS induz uma inflamação sistêmica<sup>53</sup> através da ativação do sistema imune inato com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8 e outros mediadores inflamatórios<sup>54</sup>, juntamente com os PAMPs, iniciando uma cascata de alterações fisiológicas e comportamentais<sup>55,56</sup>.

Estudos vêm demonstrando que a inflamação sistêmica pode induzir um quadro de neuroinflamação associado a danos e/ou disfunções encefálicas devido a um aumento da permeabilidade da BHE. O processo de neuroinflamação pode ocasionar alterações significativas em áreas específicas do SNC, provocando prejuízos nas funções cognitivas a longo prazo<sup>1</sup>. Vale destacar que o sistema imunológico do recém-nascido é mais vulnerável a patógenos invasivos, mostrando-

se mais suscetíveis a infecções, ou seja, a resposta inflamatória sistêmica decorrente de um processo de ativação imune pode causar um comprometimento importante do tecido encefálico em desenvolvimento<sup>52,57,58</sup>.

Em animais neonatos submetidos a endotoxemia sistêmica e avaliados quando adultos, foi verificado comprometimento da memória e do aprendizado associado a um processo neuroinflamatório<sup>8</sup>. Estudos pré-clínicos, em sua maioria, são realizados por indução sistêmica de LPS. A indução por LPS nas primeiras semanas de vida reproduz algumas das complicações observadas em neonatos com sepse neonatal como a produção de repostas neuroinflamatórias<sup>1</sup>.

### 1.1.3 Neuroinflamação

O SNC é um sistema imunologicamente privilegiado. É normalmente protegido por três elementos estruturais: a BHE com a interface entre o encéfalo e os vasos sanguíneos; a barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (LCR), formada pelo plexo coroide e a membrana aracnoide com os vasos sanguíneos e o LCR; e a barreira sangue-aracnoide, que é a interface dos vasos sanguíneos com a camada do epitélio da aracnoide subjacente à dura-máter. Essas barreiras são estruturas especializadas do SNC que controlam e regulam a homeostase<sup>59</sup>. A BHE é formada pela membrana basal do endotélio, pericitos, astrócitos, que, em conjunto com as junções oclusivas, dificultam o contato entre o SNC e órgãos periféricos. Moléculas presentes na circulação sistêmica, como as citocinas, que contribuindo para a iniciação, manutenção e regulação de respostas imunes inflamatórias têm dificuldade de penetrar no SNC<sup>60</sup>.

Neste contexto acredita-se que a desregulação da BHE ocasione a exposição do SNC a substâncias nocivas e/ou tóxicas, envolvidas na morte neuronal<sup>61,62,63</sup>. O aumento da permeabilidade da BHE é ocasionado, em grande parte, pelo aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias sistêmicas que atravessam e acessam o tecido encefálico<sup>52,57,63</sup>. Um grande número de células imunes efectoras são mobilizadas para a circulação e, concomitantemente, estas células imunes secretam citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  que atravessam facilmente a BHE no parênquima cerebral<sup>64</sup>. Em sequência, as citocinas pró-inflamatórias podem ativar a micróglia, célula imune residente do SNC e iniciar uma complexa cascata

inflamatória incluindo a liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias diretamente no tecido encefálico<sup>65,66</sup>.

Durante o processo de desenvolvimento a ativação imune no SNC, envolve a micróglia e astrócitos, que constituem as células imunes residentes e desempenham um papel importante na regulação da homeostase<sup>67</sup>. Os astrócitos desempenham a função de proteção do tecido neuronal pela promoção do reparo celular, modulação de neurotrofinas, o reestabelecimento da permeabilidade da BHE e a promoção da neurovascularização e a neurogenese<sup>67</sup>. No entanto, estímulos excessivos aos astrócitos podem resultar na falência da reparação da BHE, infiltração leucocitária, desmielinização e morte de células oligodendrocitas<sup>68</sup>. Após a ativação da microglia, há produção de metabólitos que provocam a morte neuronal e impedem a neurogenese<sup>69</sup>. As concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias no encéfalo são responsáveis por ativar a microglia, liberando concentrações ainda maiores de mediadores pró-inflamatórios potencialmente tóxicos, causando danos reversíveis e irreversíveis no encéfalo em desenvolvimento<sup>70,71</sup>.

Além disso, a ativação microglial também foi associada a um aumento da expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 no tecido encefálico após a inflamação sistêmica<sup>72,73,74</sup>. A microglia afeta 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<sup>70</sup>, assim como a relação com processos neurodegenerativos<sup>75</sup>. Neste contexto, a neuroinflamação pode contribuir significativamente para a progressão de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, a DA, a esclerose múltipla, doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica<sup>3,26,76,77</sup>. Em um estudo realizado por Laske e colaboradores (2013), foi demonstrado que o receptor TNF pode ser um biomarcador inflamatório para melhor compreensão de doenças neurodegenerativas como a DA<sup>78</sup>. Estudos demonstram a associação entre a DA e biomarcadores inflamatórios como IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 e TNF- $\alpha$ <sup>79,80</sup>.

Evidências vêm demonstrando que o processo neuroinflamatório pode estar relacionado a processos neurodegenerativos<sup>81</sup>. Estudos utilizando o LPS, demonstram que esta endotoxina pode estar envolvida em eventos patológicos ligados aos processos neurodegenerativos. Neste contexto o LPS pode servir como um elo entre a neuroinflamação e neurodegeneração possibilitando assim um maior

entendimento dos processos que ocorrem em doenças neurodegenerativas como DA<sup>82,83,84</sup>. Estudos evidenciam uma possível associação entre a neuropatologia da DA e as concentrações de LPS em tecido cerebral, observando a presença concomitante de LPS e proteína  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) na substância branca e cinzenta em tecido cerebral de sujeitos diagnosticados com DA<sup>85</sup>. Em um estudo foi observado que a administração de LPS por 7 dias aumentou a expressão de A $\beta$ , desencadeando degeneração neuronal<sup>86</sup>. Assim como em outra pesquisa foi observado concentrações elevadas de LPS no neocórtex e no hipocampo de tecido cerebral de indivíduos com diagnósticos de DA<sup>87,88</sup>.

Estudos demonstraram que uma única injeção de LPS aumentou os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em córtex e hipocampo de camundongos transgênicos (Tg2576) com 16 meses de idade, nas primeiras 6 horas após estímulo<sup>89</sup> e aumento nos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  em um estudo utilizando animais com 2 meses de idade da linhagem Sprague Dawley<sup>90</sup>. Outro estudo também utilizando uma única injeção de LPS conseguiu observar um aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  e A IL-18 nas mesmas áreas cerebrais após 10 meses da exposição ao LPS. Ressaltando que a IL-18 pode atuar na progressão da neurodegeneração e disfunção cognitiva.

A indução de LPS pode contribuir para o aumento nos níveis de A $\beta$  favorecendo a formação de emaranhados neurofibrilares<sup>90</sup>. Em estudos pré-clínicos foi observado que a injeção de LPS aumentou não somente os níveis de A $\beta$  solúveis, mas também da proteína tau fosforilada no tecido cerebral dos animais<sup>90,91</sup>. Em um outro estudo a administração sistêmica de LPS promoveu um aumento da fosforilação da proteína tau e como possível consequência a ativação da proteína GSK-3 em camundongos<sup>92</sup>. Além de contribuir para o aumento das proteínas, estudos demonstram que a indução por LPS contribui para o desenvolvimento de déficits cognitivos<sup>93,94,95</sup>.

Recentemente, foi demonstrado que animais que receberam uma única injeção de LPS de maneira sistêmica no sétimo dia pós-natal, apresentaram um aumento de células apoptóticas após 24 horas e um aumento dos níveis de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  entre 6 e 48 horas em tecido encefálico. A ativação microglial foi observada após 48 horas da exposição ao LPS. Neste mesmo estudo, os autores mostraram que estas alterações persistem até 7 dias após a endotoxemia<sup>96</sup>. Outro estudo demonstrou que a ativação imune sistêmica por LPS no terceiro e no quinto dia pós-natal aumento os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em hipocampo de animais avaliados quando adultos<sup>68</sup>. Assim como, foi verificado que uma única injeção de LPS no sétimo dia pós-natal aumentou

os níveis de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  associado a um aumento da ativação microglial em tecido encefálico após 48 horas e 7 dias da exposição endotoxêmica<sup>68</sup>.

O encéfalo dos neonatos é mais vulnerável a alterações decorrentes de uma resposta inflamatória sistêmica<sup>61</sup>. Estudos realizados em modelos animais utilizando LPS durante a primeira semana pós-natal mostraram que a inflamação sistêmica pode interferir na maturação do SNC, causando atrofia neuronal, atraso de mielinização, lesão da substância branca e paralisia cerebral<sup>97,98</sup>. Outros estudos também têm demonstrado uma perda na densidade cortical de substância cinzenta ao longo do tempo após a exposição ao LPS no período pós-natal<sup>99,100,101</sup>.

Estudos apontam que o processo neuroinflamatório em neonatos pode estar associado a déficits neurológicos a longo prazo<sup>69,97</sup>. Um estudo realizado por Comim e colaboradores (2016) demonstrou que os animais expostos ao LPS no período neonatal apresentaram alterações na memória de habituação, de aversão e de reconhecimento de objetivos quando adultos<sup>4</sup>. Além disso, foi demonstrado que uma única injeção sistêmica de LPS no décimo quarto dia pós-natal alterou o comportamento social quando os animais completaram 21 dias de vida<sup>103</sup>.

Wang e colaboradores (2013) mostram que a exposição neonatal ao LPS resultou em déficits cognitivos e redução no volume do hipocampo, associado a respostas inflamatórias sustentadas no hipocampo em animais com 71 dias de vida<sup>104</sup>. Também foram observados um aumento do número de micróglia ativadas e um aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  no hipocampo. Este estudo revelou que a exposição neonatal ao LPS e a neuroinflamação causaram lesões persistentes no hipocampo e resultaram em um comprometimento da memória a longo prazo. Em um estudo realizado por Stoll e colaboradores (2004) foi possível observar a associação entre a sepse neonatal e déficits cognitivos. Após a avaliação de crianças entre 18 e 22 meses de idade, foi possível observar que aquelas que apresentaram sepse no período neonatal, demonstraram maior comprometimento das funções cognitivas<sup>105</sup>. Neste contexto, Selkoe e colaboradores (2000) demonstraram que o acúmulo dos mediadores inflamatórios em tecido encefálico é normalmente acompanhado de perda neuronal, principalmente em áreas corticais e hipocampais, resultando na perda progressiva das funções cognitivas<sup>106</sup>.

O LPS, realiza a indução de células inunes residentes no cérebro, como a micróglia, que libera mediadores inflamatórios. O desencadeamento da produção de

citocinas pró-inflamatórias através do LPS, em especial em células imaturas, influenciam no processo de neurodegeneração<sup>14,15,16</sup>.

#### **1.1.4 Processos neurodegenerativos associados à ativação imune neonatal e processos neuroinflamatórios**

A neurodegeneração caracteriza-se pela perda crônica progressiva da estrutura e funções dos materiais neuronais, resultando em deficiências funcionais, podendo ocasionar morte neuronal<sup>107</sup>. As interações imunes no processo neurodegenerativo podem ocorrer no interior dos neurônios, no tecido encefálico ou no ambiente sistêmico através de citocinas, neurotransmissores, interações célula-célula e nervos periféricos. Alterações em qualquer desses níveis de organização podem modular processos neurodegenerativos no SNC<sup>19,108</sup>. As doenças neurodegenerativas são caracterizadas por uma morte neuronal prematura em regiões focais do cérebro. São condições debilitantes que afetam pessoas de todas as idades, caracterizada por uma degeneração progressiva das células neuronais, resultando no comprometimento das funções superiores<sup>109,110</sup>, são exemplos de doenças neurodegenerativas DA, doença de Parkinson, Esclerose Múltipla entre outras.

Dentro dos processos degenerativos, a demência se caracteriza por um declínio de memória associado ao déficit de pelo menos uma outra função cognitiva (linguagem, percepções ou funções executivas) com intensidade suficiente para interferir no desempenho social ou profissional do indivíduo. Este declínio não pode ser relacionado ao processo de envelhecimento normal<sup>19,111</sup>.

Dentre os tipos de demência, a DA tem sido descrita como uma das principais e mais prevalentes doenças de caráter neurodegenerativo progressivo<sup>22</sup> que se caracteriza por uma deterioração global e irreversível de diversas funções cognitivas (memória, atenção, concentração, linguagem, pensamento, entre outras), associada a déficits na organização espacial, podendo haver desorientação de espaço e tempo e alterações no comportamento e na personalidade<sup>106</sup>. Um dos primeiros sintomas consiste na perda da memória episódica para eventos recentes, no entanto, o déficit na memória pode evoluir, comprometendo também a memória semântica e de trabalho. Pode ser observado também comprometimento das funções executivas

(julgamento, planejamento e abstração), dificuldade para fazer cálculos<sup>12</sup> e também da função motora<sup>106</sup>.

O processo degenerativo presente na DA, pode levar a uma degeneração difusa das sinapses no hipocampo, no córtex cerebral e em algumas estruturas subcorticais, que ultrapassa o mínimo necessário para a execução da função mnemônica<sup>19</sup>. A análise histopatológica de materiais decorrentes da autópsia em paciente com DA, revela perda neuronal no córtex cerebral e degenerações sinápticas intensas, tanto no hipocampo quanto em nível neocortical. Também é possível identificar depósitos extracelulares de peptídeos  $\beta$ -amiloide, placas senis e emaranhados neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada<sup>112,113</sup>. Os emaranhados neurofibrilares e as placas senis podem estar presentes nos cérebros normalmente senis mas em menor quantidade e com distribuição menos extensa<sup>114</sup>.

A proteína precursora amiloide (APP), é uma proteína transmembrana integral, que está envolvida na transdução de sinais, alongamento axonal, adesão e migração celular, transporte de proteínas e sinaptogênese<sup>115</sup> e representa uma das proteínas mais abundantes no SNC<sup>20</sup>. Ela sofre clivagem após sua síntese, dando origem ao fragmento denominado proteína  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ), composto de 42 aminoácidos<sup>116</sup>. Esse fragmento é mais amiloigênico do que a proteína original pois tem a propriedade de agregação proteica na parte extracelular dos neurônios. Portanto uma vez que se encontre em quantidade maior que a normal, o acúmulo resultará na formação de fibras amiloides gerando placas senis<sup>22</sup>. O acúmulo de A $\beta$  desencadeia eventos neurotóxicos, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, resposta neuroinflamatória anormal, diminuição da neuroplasticidade e neogênese e hiperfosforilação da proteína tau<sup>22,106,117</sup>, assim como, diminuição da neurotransmissão colinérgica, contribuindo para as alterações cognitivas<sup>118</sup>. Estes eventos acabam ampliando a neurotoxicidade da A $\beta$ , culminando na morte neuronal<sup>22</sup>.

A proteína Tau faz parte da família das proteínas associadas aos microtúbulos (MAP). Encontrada na maioria dos tecidos, é expressa no SNC e periférico<sup>21</sup>. A principal função das MAPs é estabilizar os microtúbulos pela agregação da tubulina<sup>119</sup>, sendo que a estabilidade depende do estado de fosforilação da proteína Tau<sup>120</sup>. Nas doenças degenerativas, a proteína Tau apresentam-se na forma de filamentos anormais insolúveis e hiperfosforilados<sup>121</sup>. Ao estar anormalmente fosforilada, é menos capaz de polimerizar a tubulina e provocar uma ruptura do citoesqueleto celular

e por consequência, morte neuronal<sup>79</sup>. Todas as alterações na proteína Tau modificam o transporte axonal, que é vital e necessário para a manutenção da homeostase neuronal. A hiperfosforilação da Tau propicia a formação de agregados, bloqueando a ligação intracelular de proteínas neurotróficas, assim como outras proteínas funcionais, resultando em perda ou declínio do transporte axonal nos neurônios<sup>122</sup>. A interrupção do transporte dos potenciais de ação pelos axônios afetados causa disfunção e morte celular<sup>19</sup>.

Neste contexto, algumas proteínas-quinases e fosfatases estão envolvidas na regulação da fosforilação da tau. Dentre estas, a GSK-3 vem sendo considerada a mais importante tau-quinase nos neurônios<sup>22</sup>. Nos mamíferos, a GSK-3 é codificada por dois genes altamente relacionados que codificam GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$ , respectivamente. No cérebro, a GSK-3 $\beta$  regula muitos processos celulares, atuando como um interruptor chave que controla numerosas vias de sinalização<sup>123,124</sup>. A desregulação do GSK-3 $\beta$  pode ser encontrada no desenvolvimento de doenças como câncer, diabetes, DA, transtornos psiquiátricos como esquizofrenia e transtorno de humor bipolar, doenças inflamatórias, entre outros<sup>125</sup>. A GSK-3 $\beta$  exerce papel importante no metabolismo do glicogênio, na ativação de fatores de transcrição e é uma enzima chave na regulação do metabolismo celular, incluindo a fosforilação da proteína tau<sup>22</sup>.

A GSK-3 $\beta$  desempenha papel importante na fisiopatologia da DA<sup>116</sup> sendo encontrada em níveis aumentados no hipocampo<sup>126,127</sup>. A desregulação do metabolismo da GSK-3 $\beta$  pode levar a um aumento da atividade dessa proteína. Esta desregulação pode tornar-se um evento patológico, contribuindo para o aumento da produção de A $\beta$  e estar relacionada ao processo de hiperfosforilação da Tau<sup>128</sup>. Além disso, a GSK-3 $\beta$  está envolvida nos déficits de aprendizagem e memória, em respostas inflamatórias e no processo de neurodegeneração<sup>91</sup>. O aumento da expressão da GSK-3 $\beta$  em hipocampo de camundongo resulta em desempenho prejudicado no teste comportamental do labirinto aquático de Morris, hiperfosforilação da tau e morte neuronal<sup>92</sup>. Evidências demonstram que os inibidores de GSK-3 melhoram funções cognitivas em modelos animais, aspecto importante, visto que déficits cognitivos e a demência são características de doenças neurodegenerativas<sup>131</sup>.

A GSK-3 $\beta$  também é um mediador chave da apoptose<sup>132</sup> e portanto, pode contribuir diretamente para a perda neuronal. Em estudos utilizando modelo animal,

observou-se que o aumento da expressão de GSK-3 $\beta$  está relacionado à apoptose em áreas cerebrais como o hipocampo. O hipocampo está envolvido no processo de memória e aprendizado, aspectos cognitivos estes que se encontram alterados na DA<sup>133,134</sup>. A GSK-3 $\beta$  promove a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF<sup>97</sup> e diminui a produção de IL-10. Esse ambiente pró-inflamatório é prejudicial para os neurônios imaturos pois inibe sua maturação adequada<sup>134</sup>.

Estudos demonstram que as proteínas  $\beta$ -amiloide, tau e GSK-3 $\beta$  estão envolvidas no processo de neurodegeneração e nos déficits das funções cognitivas como a memória e a aprendizagem<sup>19</sup>. Alterações das proteínas GSK-3 $\beta$  e Tau estão relacionados ao transporte axonal, levando ao comprometimento da memória e do aprendizado, como resultado da disfunção sináptica<sup>127,132,135</sup>. Camundongos transgênicos para a GSK-3 $\beta$  apresentaram uma hiperfosforilação da proteína Tau e exibiram dificuldades no reconhecimento visuoespacial no teste do labirinto aquático de Morris<sup>130</sup>. Estudos *in vitro* e em modelos animais indicam que agentes patogênicos induzem a formação de A $\beta$ , placas amiloides e ocasionam a hiperfosforilação da Tau<sup>136,137</sup>. Utilizando animais transgênicos, Tracy e colaboradores (2016) mostraram que o aumento da expressão da Tau inibe a plasticidade sináptica subjacente as deficiências na memória dependente do hipocampo, como a memória visuoespacial. Neste contexto, uma importante revisão de literatura concluiu que o potencial de longa duração (LTP), essencial nos processos de aprendizado e memória, é influenciada pelo aumento da expressão de GSK-3 $\beta$ <sup>127</sup>.

Dias e colaboradores (2019) demonstraram que animais expostos a AIN aos dois dias de vida, apresentaram alterações na memória visuoespacial, através do teste do Labirinto Aquático de Morris. E observaram nestes animais, aumento na expressão da proteína GSK- 3 $\beta$  em hipocampo aos 60, 120 e 180 dias de vida e no córtex aos 120 e 180 dias, assim como, aumento na expressão da proteína Tau em hipocampo e córtex aos 120 dias e em hipocampo aos 180 dias de vida<sup>6</sup>.

Estudos demonstram evidências de que a neuroinflamação possa estar envolvida nas doenças neurodegenerativas<sup>13</sup>, como a DA, demonstrando que o dano neuronal, pode ser resultado do processo de inflamação em áreas do SNC. Pesquisas mostram que em cérebros de indivíduos com diagnóstico de doenças neurodegenerativas, houve um aumento nos níveis de mediadores inflamatórios<sup>13</sup>. A expressão de BDNF também pode estar alterado nestas doenças. No hipocampo, o BDNF é um componente vital para plasticidade sináptica e formação de memória<sup>138</sup>.

Problemas na expressão dessas neurotrofinas estão associados ao comprometimento da formação da memória e à neurodegeneração<sup>139</sup>.

Estudos demonstraram que crianças que desenvolveram infecções sistêmicas recorrentes apresentaram déficits cognitivos durante a infância e a vida adulta<sup>140</sup>. Há evidências que sugerem uma possível relação entre a sepse e a patogênese da DA, visto que a sepse está associada ao estresse oxidativo, ao aumento dos níveis de citocinas inflamatórias e ao óxido nítrico, podendo causar disfunção neuronal e neurodegeneração<sup>141,142</sup>. Em um estudo utilizando modelo animal, observou-se que um grupo de animais expostos a endotoxemia por LPS, apresentaram consequências a longo prazo, como déficit de memória, déficits comportamentais e perda neuronal em regiões do hipocampo. Também se encontrou um número reduzido de células no córtex pré-frontal, o que pode ocasionar desorientação e maior dificuldade na execução de tarefas mais complexas<sup>143</sup>.

O estudo de Semmler e colaboradores (2007), reforça que a endotoxemia pode levar a perdas substanciais de neurônios e inervação colinérgica em diferentes regiões do cérebro até 90 dias após a exposição endotoxêmica, o que poderia justificar os déficits nas funções cognitivas e comportamentais<sup>143</sup>. Animais submetidos a endotoxemia no período neonatal apresentaram comprometimento da memória de habituação, aversiva e de reconhecimento de objetos quando adultos, demonstrando que o processo neuroinflamatório no período de desenvolvimento pode ter consequências a longo prazo<sup>4</sup>.

Perante as alterações causadas pelo processo de neuroinflamação e sua possível correlação com processos neurodegenerativos<sup>144</sup> estudos vêm demonstrando que mudanças no ambiente podem possibilitar alterações em aspectos cognitivos e no desenvolvimento e funcionamento do cérebro. Sendo assim, o EA apresenta-se como uma técnica não invasiva e de baixo custo, podendo ser eficiente nos processos de memória e aprendizagem em modelos pré-clínicos.

### **1.1.7 Enriquecimento Ambiental**

O EA consiste em uma técnica que busca modificar o ambiente, tornando-o mais natural e confortável, tendo como objetivo fornecer oportunidades para os indivíduos expressarem o máximo possível de seus comportamentos naturais. O EA aborda a combinação de interação social, exercício físico e exposição a diferentes

objetos que contribuem para o bem-estar dos animais, assim como, estimulação de áreas visuais, motoras, cognitivas e somatossensoriais<sup>23</sup>. Além disso, o ambiente enriquecido poder estimular a plasticidade cerebral, a neurogênese e proporcionar aumento da expressão de fatores neurotróficos, bem como proteger contra os efeitos de possíveis insultos relacionados ao SNC<sup>145</sup>.

Os animais são mantidos em gaiolas espaçosas contendo brinquedos, rodas de correr e objetos com formas e texturas diferentes. A troca de objetos e da posição dos mesmos, dentro das gaiolas são de fundamental importância para o funcionamento do modelo, pois estas alterações no ambiente contribuem para a formação de mapas espaciais, podendo promover o aumento na plasticidade hipocampal dos animais. O período de exposição ao ambiente enriquecido vem sendo considerado algo muito importante na qualidade dos resultados obtidos, visto que períodos muito curtos em ambientes enriquecidos não promovem os mesmos resultados que períodos mais prolongados<sup>146</sup>.

Os animais expostos a ambientes enriquecidos demonstram melhora em aspectos como memória e aprendizado<sup>147,148</sup>, assim como, parece influenciar no desenvolvimento e funcionamento do cérebro, promovendo habilidades cognitivas principalmente circuitos neurais, corticais e hipocampais<sup>148</sup>. Em relação as alterações neurobiológicas, o EA resulta em aumento da espessura do córtex cerebral e do tamanho dos neurônios, favorece a neurogênese hipocampal, ramificação dendrítica e formação sináptica e reforço do LTP<sup>148,149,150</sup>. Em um estudo realizado por Leggio e colaboradores (2005) foi relatado que o ambiente enriquecido contribui para alterações comportamentais dos animais através da utilização de objetos que estimulem aspectos cognitivo, exercícios físicos e interação social. O estudo ainda demonstra o aumento dos níveis de fatores neurotróficos que otimizam o processo de aprendizado<sup>151</sup>.

O EA proporciona uma melhora no desempenho das funções cognitivas avaliadas em modelos animais, além de reduzir o déficit da memória decorrente do envelhecimento. Estudos demonstram que animais submetidos ao protocolo de EA apresentaram melhores resultados em tarefas relacionadas a memória e aprendizagem, sendo que os animais que estão em ambientes enriquecidos demonstram aprendizado mais rápido e melhor adaptação ao novo ambiente<sup>152</sup>. Isso é possível observar nos estudos que utilizam testes comportamentais, como o labirinto aquático de Morris, que avalia a memória espacial dependente do hipocampo. Os

estudos demonstram que os animais expostos ao EA apresentam melhor desempenho que os animais que estão em um ambiente empobrecido de estímulos sensoriais, motores e cognitivos, trazendo prejuízos ao desempenho da memória e diminuição dos níveis de BDNF maduro (mBDNF) no hipocampo. Estudos já tendo apontado que o mBDNF é uma molécula importante nos processamentos de memória e aprendizado e na neuroplasticidade<sup>154</sup>. O mesmo acontece em estudos que avaliaram os animais após o EA através do teste do campo aberto. Os animais demonstraram maior capacidade de habituar-se e ajustar-se a novos estímulos, demonstrando melhora no processamento de informação e adaptação<sup>147,148</sup>. Em um estudo de Dong e Colaboradores (2007), os autores utilizaram um modelo de EA, onde os animais foram expostos ao ambiente enriquecido durante três horas por dia, cinco dias por semana e em um período de cinco meses. Foi demonstrado que o protocolo de EA possibilitou melhora no desempenho dos animais no teste do labirinto aquático de Morris<sup>155</sup>.

Reforçando a importância do EA para o processo de memória e aprendizado, os resultados de alguns estudos demonstram que a exposição de animais a ambientes enriquecidos tem mostrado uma melhora na memória espacial<sup>156</sup>, na memória emocional, na resolução de problemas<sup>157,158</sup> e na prevenção do declínio cognitivo relacionado ao envelhecimento, assim como, efeito antidepressivo e ansiolítico<sup>159</sup>. Em um estudo realizado por Lambert e colaboradores (2005), demonstrou-se que os estímulos ambientais tem reduzido as deficiências de memória e aprendizado relacionado ao envelhecimento em camundongos<sup>160</sup>. Em um estudo com modelo animal de isquemia-reperfusão, Rojas (2013), mostrou que a estimulação fornecida pelo EA promoveu a recuperação de déficits relacionados a memória espacial e de reconhecimento de objetos e preservou a densidade do hipocampo<sup>26</sup>. Segundo Lambert e colaboradores (2005), o EA pode produzir modificações em áreas do cérebro relacionadas ao aprendizado e à memória como o hipocampo e o neocórtex, resultado no espessamento do córtex dos animais<sup>160</sup>. Mudanças significativas na bioquímica cerebral, morfologia sináptica e função neuronal também foram observados neste modelo experimental<sup>147</sup>.

O EA mostrou-se eficaz em um modelo animal de epilepsia, no qual após 30 dias de exposição ao ambiente enriquecido, os animais apresentaram menor comportamento de hiperatividade e ansiedade, assim como, melhor reconhecimento olfatório e aprendizagem espacial<sup>161,162</sup>. Em pesquisa sobre o EA no tratamento de

sequelas causadas pelo acidente vascular cerebral em modelos animais, o EA favoreceu a plasticidade na dominância ocular, além de restabelecer a plasticidade da dominância ocular já perdida em animais adultos criados em alojamento padrão, indicando alterações adaptativas nos circuitos corticais<sup>163</sup>.

Apesar dos diversos estudos evidenciarem que o EA proporciona uma melhora nos aspectos relacionados aos processos de memória e aprendizagem, demonstrando principalmente que modelos animais que são expostos aos protocolos de EA apresentam melhor desempenho em testes comportamentais do que os animais não expostos, os mecanismos pelos quais o enriquecimento aprimora o aprendizado e a memória ainda não está totalmente conhecido e descrito<sup>164</sup>.

Os estudos demonstram que além das mudanças nos aspectos comportamentais e cognitivos, o EA também pode proporcionar um aumento nos níveis de BDNF após um período de EA<sup>27,28</sup>. Estudos demonstram que o EA promoveu a plasticidade neural através de níveis crescentes de BDNF e fator de crescimento de nervo (NGF) no cérebro<sup>165,166</sup>. Outros estudos também evidenciaram que a EA pode reduzir tanto o estresse oxidativo<sup>167</sup> quanto o processo inflamatório no tecido encefálico<sup>168</sup>. No estudo de Zhu e colaboradores (2006) foi possível observar que animais expostos ao ambiente enriquecido apresentam aumento dos níveis de BDNF no cerebelo, hipocampo e em áreas corticais<sup>169</sup>. Em recente estudo realizado por Giacobbo e colaboradores (2019), foi observado que EA aumentou os níveis centrais de proBDNF e mBDNF, juntamente com aumento da plasticidade neuronal e melhora no desempenho da memória em animais jovens e de meia-idade<sup>170</sup>. No entanto, as vias que o EA utiliza para ocasionar estas mudanças não estão totalmente esclarecidas na literatura.

A influência do EA tem apresentado efeitos benéficos em modelos animais de doenças do SNC como DA, Parkinson, síndrome do X frágil, síndrome de Down e esquizofrenia. De modo geral, diversos estudos indicam que animais expostos ao EA apresentam desempenho melhor em muitas tarefas se comparados a animais criados em ambientes pobres em estimulação<sup>26</sup>. Em um estudo realizado com modelo animal de DA (camundongos transgênicos APP23) com 10 semanas de idade submetidos à exposição do EA por um mês, mostrou-se um melhor desempenho no teste comportamental do labirinto aquático de Morris e aumento na produção de BDNF no hipocampo em comparação com camundongos que não foram expostos ao EA<sup>171</sup>. Em outro estudo utilizando camundongos transgênicos com patologia da DA (TgCRND8),

mostrou que o EA está associado a um aumento no número de novos neurônios no hipocampo<sup>172</sup>.

O ambiente enriquecido também vem demonstrando apresentar efeitos neuroprotetores tanto nos aspectos cognitivos como em áreas estruturais do neocórtex. Mas esses efeitos parecem depender em parte da atividade do BDNF, pois o ambiente enriquecido demonstrou restaurar os níveis de expressão de BDNF, que aparece diminuídos em algumas patologias<sup>173,174</sup>. Em um estudo animal utilizando um modelo transgênico de DA, Hu e colaboradores (2010) mostraram que animais com 21 dias de vida expostos a um ambiente enriquecido por um período de 30 dias reverteu a neurogênese prejudicada no início da doença e aumentou a plasticidade sináptica. Assim como, neste mesmo estudo o EA realizado por um período foi associado a uma diminuição nos níveis de A $\beta$  no córtex e hipocampo dos animais transgênicos e observou-se uma diminuição da hiperfosforilação da proteína tau. Tais achados sugerem que a experiência em um ambiente enriquecido diminui a atividade patológica de quinases e fosfatases regulando os níveis de fosforilação da tau<sup>175</sup>. Outros estudos também descrevem que animais expostos ao EA por um período de 30 dias, demonstraram reduções nos níveis de A $\beta$  e depósitos de amiloide em comparação com animais em condições de alojamento padrão<sup>164, 176</sup>.

Estudos pré-clínicos e clínicos têm sugerido que o EA pode melhorar ou mesmo reverter efeitos desfavoráveis do envelhecimento no cérebro, assim como, os efeitos prejudiciais de determinadas patologias<sup>147,177</sup>. A exposição ao EA durante o período pré-natal, demonstra ter efeitos nos aspectos emocionais e hormonais a longo prazo nos descendentes<sup>178</sup>. Além disso, esses estudos fornecem evidências de efeitos benéficos sobre o comportamento e performance cognitiva da prole, especificamente na aprendizagem e memória com indícios de alterações estruturais cerebrais. Um estudo demonstrou que o EA precoce, ou seja, no pré-desmame diminui a ansiedade em ratos a longo prazo, e ainda pode aumentar o nível de cuidados maternos<sup>179</sup>.

Perante os estudos apresentados, pode-se observar que o EA contribui para a melhora em aspectos cognitivos como processos de memória e aprendizagem, levando a alterações comportamentais, neurobiológicas e neuroquímicas. Diante disto acredita-se que a aplicação de um protocolo de EA, possa ser uma alternativa promissora na redução ou prevenção de alterações nos processos de memória e aprendizagem, que a longo prazo se estabelecem como efeitos do processo de neuroinflamação, resultado da , assim como, uma técnica que possa atuar nas vias

relacionadas às alterações na proteína GSK-3 $\beta$  e no peptídeo  $\beta$ -amiloide, estas envolvidas em processo de neurodegeneração. Portanto a EA pode tornar-se uma alternativa eficaz na prevenção de alterações relacionadas ao neurodesenvolvimento.

### 1.1.8 Modelo animal de ativação imune neonatal

O LPS é uma endotoxina bacteriana que induz efeitos inflamatórios e pró-coagulantes. É um componente da membrana plasmática de bactérias gram-negativa e reconhecido como principal fator responsável por manifestações tóxicas de infecções gram-negativas severas e inflamação generalizada<sup>179,180</sup>.

A AIN, em animais é provocada pela exposição endotoxêmica ao LPS. O LPS é reconhecido pelo sistema imune como um agente patogênico associado aos PAMPs. Ele também se liga ao TLR-4 em monócitos e macrófagos, constituindo com esta ligação uma cascata de eventos que conduz a inflamação<sup>56</sup>.

Existem diferentes tipos de TLR identificados, dentre eles o TLR-4 que reconhece o LPS bacteriano<sup>45</sup>. 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 acontece principalmente através dos receptores TLR-4<sup>46,49</sup>. Uma vez que o LPS entra em contato com o organismo animal, seja a partir de uma bactéria Gram-negativa 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 endoteliais<sup>46</sup>. 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-4<sup>43</sup>. A ligação entre o TLR-4 e o LPS resulta no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, translocação do fator nuclear NF- $\kappa$ B e posteriormente a transcrição de genes que codificam mediadores inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8<sup>56,63</sup>.

Estudos em modelos animais, em sua maioria, são realizados por indução de LPS em camundongos por demonstrarem uma resposta exacerbada as citocinas pró-inflamatórias no SNC e apresentarem prejuízos comportamentais e disfunções cognitivas semelhantes a sepse. A indução de endotoxemia por LPS nas primeiras

semanas de vida reproduz algumas das complicações observadas em neonatos com sepse neonatal<sup>181</sup>.

## 2. OBJETIVOS

### 2.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de um ambiente enriquecido nos parâmetros comportamentais e moleculares em longo prazo no sistema nervoso central após AIN.

### 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos de dois protocolos de enriquecimento ambiental sobre a memória e o aprendizado em camundongos adultos submetidos à AIN.

Avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre os níveis de citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 no córtex e hipocampo de camundongos adultos submetidos à AIN.

Analisar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre os níveis de BDNF no córtex e hipocampo de camundongos adultos submetidos à AIN.

Verificar a influência do enriquecimento ambiental sobre o imunoconteúdo da proteína GSK-3 $\beta$  no córtex total e hipocampo de camundongos adultos submetidos à AIN.

Verificar a influência do enriquecimento ambiental sobre o imunoconteúdo do peptídeo  $\beta$ -amiloide no córtex total e hipocampo de camundongos adultos submetidos à AIN.

### 3. MÉTODOS

#### 3.2 TIPO DE ESTUDO

Este projeto refere-se a um estudo experimental pré-clínico, com uso de um modelo animal. Foi realizado no Laboratório de Neurociências Experimental (LaNEx) e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL).

#### 3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Para a realização deste estudo foram utilizados os materiais e equipamentos descritos no quadro 1.

Quadro 1 - Materiais e equipamentos

(Continua)

<b>Materiais e Equipamentos</b>	<b>e</b>	<b>Especificação</b>	<b>Marca</b>	<b>País</b>
LPS		026:B6L E.Coli	Sigma Aldrich	Brasil
PBS		pH 7.4	Thermo Fisher Scientific	Brasil
Gel de poliacrilamida		TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solucions	BioRad	Brasil
Membrana PVDF		Pore size 0.45 µm, sheet W x L140mmx160mm, pkg of 25 ea	Sigma Aldrich	Brasil
Anticorpo secundário		anti-rabbit e anti-mouse	Uniscience	Brasil
Fotodocumentador		Digimagem (254 nm)	Biosciences	Brasil
Thiopentax		Pó para solução injetável-1g	Cristália	Brasil
Tampão de lise RIPA		R0278-50ML	Sigma-Aldrich	EUA
Deoxicolato de sódio		CAS 302-95-4, pH 7.5 -9.0 (20g/l, H <sub>2</sub> O, 20 °C).	Merck Millipore	EUA
Fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF)			Sigma-Aldrich	EUA
Coquetel de inibidores de proteases		P2714	Sigma-Aldrich	EUA
Anticorpo anti- GSK-3β		GSK-3β (3D10) Mouse mAb	Cell Signaling Technology	EUA

Anticorpo anti- $\beta$ -amiloide	$\beta$ -amyloid (1-43 Preferred) (E8C2D) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology	EUA
$\beta$ -actina	Monoclonal AC-15	Sigma-Aldrich	EUA
Kit de quimiluminescência	Base level dection	Thermo Scientific	EUA
Kits de ELISA	R&D Systems®	Pensabio	Brasil
Aparato teste de campo aberto	40x40x40 cm	Marceneiro local	Brasil
Leitor de placas	Perlong DNM-9602	Perlong Medical	China
Cloridrato de xilazina	10ml	Ceva	Brasil
Cloridrato de dextrocetamina	50ml	Syntec	Brasil
Câmera filmadora	Hero 3+	GoPro	EUA
Aparato de enriquecimento ambiental	Safari	American Pets	Brasil
Aparato Labirinto Aquático de Morris	Confeccionado pelos pesquisadores		Brasil

### 3.3 ANIMAIS

Foram utilizados Camundongos C57BL/6 provenientes da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Foi realizado o acasalamento destes e utilizado os filhotes (machos e fêmeas), com 2 dias pós-natais. Os camundongos foram alocados em casais para o acasalamento, na proporção de uma fêmea para cada macho. Os camundongos foram mantidos em temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C), no ciclo de claro e escuro de 12 horas e comida e água *ad libitum*.

O número de animais por grupo foi calculado em  $n=8$ . A fórmula empregada para o cálculo foi a equação  $n/\text{grupo}=2[(Z\alpha/2 + Z\beta) \times d/\Delta]^2$ , 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%. Entende-se, portanto, que o número de pelo menos 8 animais foi utilizado em cada grupo experimental para garantir que as conclusões dos experimentos sejam válidas, dentro de um risco aceitável de não estar observando diferenças onde elas existam tampouco estar observando diferenças onde elas não existam. Para segurança e confiabilidade dos dados, foi utilizado 10 animais por grupo neste estudo. A mortalidade foi avaliada durante todo experimento

Foram utilizados 10 animais para cada grupo, porém são ao todo são três comportamentos e cada animal realiza apenas um comportamento, sendo assim,

foram utilizados 10 animais para cada comportamento de cada grupo, totalizando 30 animais por grupo. A literatura relata que o modelo experimental de AIN é o que mais se assemelha a sepse neonatal, pois há mortalidade de 60% nos primeiros dias de vida. Sendo assim foram utilizados um total de 312 animais. (10 cada grupo temos 3 comportamentos então 240 animais + 60% (animais da AIN) = 312 animais)

### 3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Os animais foram divididos em 8 grupos experimentais (Figura 1), onde foram utilizados machos e fêmeas. Inicialmente os animais foram divididos em dois grupos que receberam LPS ou Tampão fosfato-salino (PBS) aos dois dias de vida. Posteriormente estes mesmos animais foram novamente divididos em dois grupos: os que foram expostos ao protocolo de enriquecimento ambiental (EA) e os que não foram expostos ao enriquecimento ambiental (SEA). Finalmente após a exposição ao EA ou não, os animais foram novamente divididos em grupos para as avaliações em diferentes idades: 60 e 120 dias de vida. O tempo de EA ou SEA e os testes comportamentos foram realizados de acordo com a idade correspondente a cada grupo experimental (60 ou 120 dias).

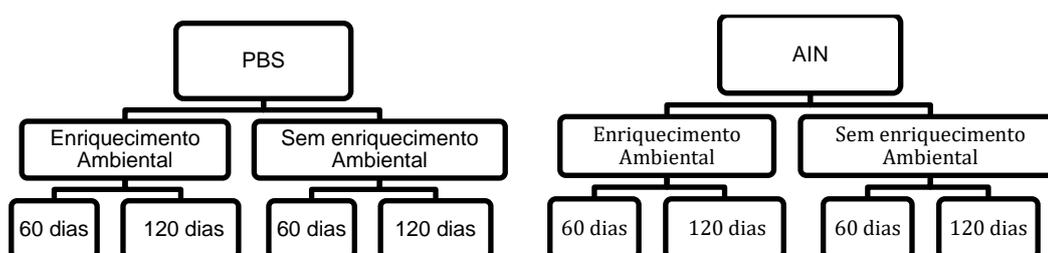


Figura 1- Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram divididos em PBS + EA e PBS + sem EA e AIN +EA e AIN + sem EA.

Ao completarem dois dias de vida, a prole foi retirada da caixa para a exposição à AIN (LPS) ou PBS (animais controles). A AIN foi induzida com uma única administração subcutânea de 25 µg/kg de LPS, que foi preparado com o auxílio de PBS para diluição. Os animais controles receberam apenas PBS no mesmo volume administrado no grupo LPS. A mortalidade foi avaliada durante todo o experimento. Após a indução, os animais retornaram para suas caixas moradias, onde

permaneceram até completarem 21 dias de vida, onde foi realizada a sexagem e os mesmos foram separados em cinco animais por gaiola. E posteriormente divididos em grupos para a exposição ou não ao protocolo de estudo, de maneira randomizada.

Quando os animais completaram 28 dias de vida (animais jovens) foram submetidos ao protocolo de EA ou no caso dos animais controles, a retirada desses das caixas moradias para outras caixas sem o enriquecimento ambiental. Os animais foram submetidos a caixa enriquecida durante 3 horas por dia, 5 dias por semana durante o período correspondente a cada grupo. Os animais controles foram trocados de caixas nos mesmos horários e pelos mesmos períodos. O fim do protocolo aconteceu de acordo com as idades correspondentes de cada grupo 60 e 120 dias. Os animais foram avaliados quando completaram 60 e 120 dias de vida<sup>182</sup>, de acordo a idade pertencente a cada grupo.

Vinte quatro horas após o último dia de EA ou SEA, os animais foram submetidos aos treinos e posteriormente aos testes comportamentais: Habituação ao Campo Aberto, Labirinto Aquático de Morris e Reconhecimento de objetos. Após os testes comportamentais, os animais foram submetidos à Morte Indolor Assistida (MIA), recebendo injeção de uma dose excessiva de cloridrato de xilazina 20 mg/kg associado a cloridrato de dextrocetamina 100mg/kg intraperitoneal de acordo com a resolução 1000, de 12/05/2012 – conselho Federal de Medicina Veterinária, sob a supervisão de médico veterinário responsável.

As estruturas córtex e hipocampo foram utilizadas, visto que estão relacionadas aos processos de memória e aprendizagem, assim como, estudos demonstram que estão envolvidas e sofrem alteração durante processo de neuroinflamação e neurodegeneração. Essas estruturas foram dissecadas, processados e armazenados em freezer -80°C para avaliação dos níveis de BDNF, e citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10) e do imunoconteúdo da proteína GSK-3 $\beta$  e do peptídeo  $\beta$ -amiloide (Figura 2).

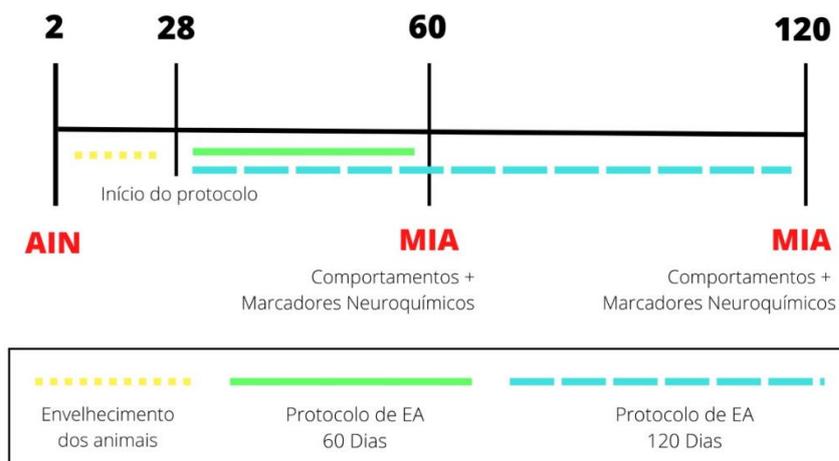


Figura 2- Delineamento do estudo

Aos 2 dias de idade, os animais foram expostos a AIN e/ou controle (PBS), aos 28 dias de idade, foram divididos em grupos experimentais (AIN+ sem EA; PSB + sem EA; AIN + EA; PBS + EE) e iniciado protocolo de EE, onde permaneceram por 3 h/dia, 5 dias/semana, por um período de 60 ou 120 dias. Vinte e quatro horas após o término dos protocolos de EE, os animais foram submetidos a treinamento e testes e ao final dos testes foram eutanasiados para coleta das estruturas cerebrais: córtex total e hipocampo, que foram imediatamente armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análise bioquímica.

### 3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS

#### 3.5.1 Modelo animal de Ativação Imune Neonatal

Para a indução da AIN foi utilizado uma única administração subcutânea (s.c.) de  $25\ \mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS, diluído em PBS (O26:B6 E. coli LPS, Sigma Chemical) nos animais aos dois de vida. O grupo controle recebeu uma injeção de PBS s.c. em volume equivalente. Após a exposição, os animais retornaram às suas gaiolas e permaneceram com suas mães até 21 dias pós-natal. Posteriormente, foi realizado a sexagem e os animais foram separados em número de cinco animais por caixa.

#### 3.5.2 Protocolo de enriquecimento ambiental

O EA é um conjunto de técnicas que modificam o ambiente, melhorando a qualidade de vida dos animais, assim como, proporcionando estímulos sensoriais e cognitivos<sup>126</sup>. No Protocolo de EA os animais foram expostos ao ambiente enriquecido 5 (cinco) vezes por semana (segunda à sexta-feira), 3(três) horas por dia (9hs às 12hs), durante o tempo correspondente a cada grupo (60 e 120 dias). Os animais que

não foram expostos ao EA foram retirados de suas caixas e colocados em uma outra caixa sem o enriquecimento ambiental, durante 5 (cinco) vezes por semana, durante o período de 3(três) horas<sup>183</sup>. O protocolo de EA consiste em uma caixa (46cm x 55cmx 34cm) com três andares, contendo uma variedade de estímulos sensoriais, como, rampas, rodas de exercício voluntário e objetos de diferentes tamanhos, texturas e cores. Uma vez por semana, mudanças de posicionamento e trocas de objetos dos quais os animais interagem foram realizadas no ambiente enriquecido. As rodas de exercício voluntário e as rampas modularam a força, propriocepção, controle motor e estimulação somatossensorial. Já os demais objetos como tubos, blocos, túneis, pedaços de madeira e bolinhas proporcionam estimulação cognitiva<sup>183</sup>. Os animais que pertenciam ao grupo sem enriquecimento ambiente permaneceram nas caixas padrões, tendo acesso livre a comida e água.

### **3.5.3 Testes de memória e aprendizado**

Os testes comportamentais foram realizados aos 60 e 120 dias de vidas, de sendo testados individualmente de acordo com os grupos experimentais. Cada animal participou de apenas um teste comportamental. Os testes aconteceram no período das 09h00min às 12h00min. Antes do início das sessões os animais foram ambientados a sala de testes por no mínimo 30 minutos. Os testes foram realizados em sala própria e por um único avaliador.

#### *3.5.3.1 Labirinto Aquático de Morris*

O labirinto aquático de Morris tem como objetivo avaliar o aprendizado e a capacidade de adquirir memória espacial usando dicas ambientais. O animal deve aprender a usar as pistas fixadas na parede da sala para navegar até a plataforma submersa na água. Durante os treinamentos o animal teve 60 s para encontrar a plataforma (10 cm<sup>2</sup>) submersa e a latência foi mensurada. Se o animal não encontrasse a plataforma ele seria gentilmente conduzido e permaneceria nela por 10 s. O treinamento acontece em dois dias seguidos, e é composto por seis baterias. No momento do teste, que aconteceu três dias depois do último dia de EA, a plataforma submersa foi retirada e o animal foi colocado na água apenas uma vez, e teve um período de três minutos para nadar e procurar a plataforma. Foi avaliado o tempo

gasto no quadrante em que a plataforma estava localizada. Para este teste foi utilizado um tanque circular localizado no centro de uma sala de 12 m<sup>2</sup>. Foi adicionado água ao tanque até que o nível ultrapassasse 2 cm da altura da plataforma. A água ficou opaca com adição de amido de milho, dificultando a visibilidade da plataforma. A aquisição da memória visuoespacial foi filmada e analisada pelo *software* ANY-Maze (Stoelting Co, USA) <sup>184</sup>.

### 3.5.3.2 *Habituação ao Campo Aberto*

Foi utilizado um aparato de campo aberto (40 × 60 x 50 cm), com o chão dividido em doze quadrantes. Cada animal foi colocado no centro do campo aberto e deixado explorar a arena por 5 min (sessão de treinamento). Imediatamente após este procedimento, os animais foram levados de volta para sua gaiola de alojamento padrão. Vinte e quatro horas depois, foram submetidos a uma segunda sessão de teste no aparato. O número de vezes que cada animal cruzou os quadrantes demarcados no chão do aparato, foi utilizado como avaliação da atividade locomotora, e os movimentos de levantamento foram avaliados como o comportamento exploratório. Uma redução no número de cruzamentos e elevações entre as duas sessões foi considerada como medida de retenção de memória. O mesmo experimentador realizou todos os testes comportamentais e a pontuação manual. O aparato foi limpo com etanol 70% entre as sessões de teste.

### 3.5.3.3 *Reconhecimento de objetos*

Esse teste foi utilizado para avaliar a memória não aversiva e não espacial. Os animais foram submetidos a uma sessão de habituação onde foram permitidos explorar livremente o aparato de campo aberto (40 × 60 x 50 cm) por 5 minutos. Nenhum objeto foi colocado na caixa durante a habituação. O treinamento foi realizado colocando os camundongos individualmente por 5 min no aparato, no qual, dois cubos idênticos (A1 e A2) foram posicionados em dois cantos adjacentes, a 10 cm das paredes do aparato. Para o teste de memória de reconhecimento de objeto, realizado 24 h após o treinamento, os animais exploraram o campo aberto por 5 min na presença do objeto familiar (A1) e um objeto novo (B, uma pirâmide com base quadrada). Os objetos tinham texturas semelhantes (suave), cor azul e peso de 150-

200 g, mas formas distintas. O índice de reconhecimento calculado para cada animal foi relatado como a razão  $TB/(TA1 + TB)$ , sendo: TA = tempo gasto explorando o objeto familiar A1; TB = tempo gasto explorando o novo objeto B. A memória de reconhecimento foi definida como cheirar (explorar o objeto a 3-5 cm de distância dele) ou tocar o objeto com o nariz e/ou patas dianteiras.

#### **3.5.4 Avaliação de citocinas e de fator neurotrófico derivado do encéfalo**

Amostras de córtex total e hipocampo foram homogeneizadas em homogeneizador Ultra-Turrax (T-18, IKA Works, Wilmington, NC, EUA) com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo Tween 20 (0,05%), PMSF (0,1 mM), EDTA (10 mM), aprotinina (2 ng/ml) e cloreto de benzetônio (0,1 mM). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 6000  $\times$ g por 15 minutos (a 4<sup>o</sup> C) e o sobrenadante coletado e armazenado a -80<sup>o</sup> C. O teor de proteína total do sobrenadante foi medido pelo método de Bradford, usando uma curva de calibração padrão com BSA (0,05 a 0,5 mg/mL). Alíquotas de 100  $\mu$ l foram utilizadas para medir as concentrações de citocinas (IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF) e BDNF por kits de ELISA para camundongos (R&D Systems, Minneapolis, MN), de acordo com as instruções do fabricante.

As concentrações de citocinas e BDNF foram medidas por interpolação de uma curva padrão de 7 pontos com leitura de ensaios colorimétricos a 450 nm em um espectrofotômetro de placa (Perlong DNM-9602, Nanjing Perlove Medical Equipment Co, Nanjing, China). Para correção de imperfeições ópticas na placa, a leitura em 540 nm foi subtraída da leitura em 450 nm. Os valores foram expressos em pg por mg de proteína.

#### **3.5.5. Ensaio Western Blotting**

As amostras de córtex total e hipocampo foram homogeneizadas manualmente com micropistilos em tampão RIPA gelado contendo 1% de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) e depois incubadas em gelo por 30 min. Os tubos contendo os lisados foram centrifugados a 10.000  $\times$ g por 20 min a 4<sup>o</sup>C, e os sobrenadantes foram coletados. A concentração de proteína foi determinada usando o método de Bradford. A separação eletroforética foi realizada usando 30  $\mu$ g de proteína por poço em eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE),

executado em um aparelho de células Mini-PROTEAN® Tetra sob uma fonte de alimentação PowerPAC™ HC (ambos da Bio-Rad, CA, EUA). As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA), bloqueadas em 5% BSA (preparado em tampão TBS-T, pH 7,4; concentração em mmol/L: 20 Tris-HCl, 137 NaCl, 0,1% Tween 20) e incubados durante a noite a 4°C com anticorpos primários para GSK-3 $\beta$  (1:1000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA),  $\beta$ -amiloide (1:1000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA) e o anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase contra  $\beta$ -actina (diluição 1:45000) foi usado como controle de carga para todas as amostras avaliadas.

Após a incubação com anticorpos primários, as membranas foram lavadas três vezes (10 minutos cada) com solução de TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário específico conjugado com peroxidase de rábano (HRP) à temperatura ambiente por 1 h. As membranas foram lavadas por mais três vezes (10 minutos cada) com solução de TBS-T e expostas ao substrato HRP (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA), e os imunocomplexos foram visualizados por quimioluminescência usando o ChemiDoc MP System (Bio-Rad Laboratories ). As bandas foram quantificadas por densitometria usando o software do fabricante (Image Lab, versão 4.1, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os valores foram normalizados usando os dados obtidos para  $\beta$ -actina e expressos como unidades arbitrárias.

### 3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 2 – Variáveis de estudo

<b>Variáveis</b>	<b>Tipo</b>	<b>Natureza</b>	<b>Proposta de utilização</b>
Enriquecimento Ambiental	Independente	Qualitativa nominal dicotômica	Sim ou Não
Modelo animal de AIN	Independente	Qualitativa nominal dicotômica	Sim ou Não
Memória Visuo-Espacial	Dependente	Quantitativa Contínua	Tempo em segundos
Memória de Habituação	Dependente	Quantitativa Discreta	Número de cruzamentos

Memória de Reconhecimento de Objetos	Dependente	Quantitativa Contínua	Tempo em segundos
Níveis de citocinas (IL-1 $\beta$ ; IL-6; IL-10; TNF- $\alpha$ )	Dependente	Quantitativa Contínua	Média e desvio padrão (pg de citocina/mg de proteína)
Níveis de BDNF	Dependente	Quantitativa Contínua	Média e desvio padrão (pg de citocina/mg de proteína)
Imunoconteúdo da proteína GSK-3 $\beta$	Dependente	Quantitativa Contínua	Média e desvio padrão (Unidades arbitrárias)
Imunoconteúdo do peptídeo $\beta$ -amiloide	Dependente	Quantitativa Contínua	Média e desvio padrão Unidades arbitrárias

### 3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados por meio do software GraphPad Prism® versão 8.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). A distribuição normal foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, e os resultados paramétricos apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) e mediana e intervalos interquartis para dados não paramétricos. O teste de habituação em campo aberto está relatado como média  $\pm$  SD (10-13 animais por grupo) e os grupos foram comparados usando análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste post-hoc de Tukey ou teste t de Student pareado para a comparação intragrupo no teste de habituação em campo aberto. Os dados do teste de reconhecimento de objetos são relatados como mediana e os intervalos interquartis (10-13 animais por grupo), e as comparações entre os grupos foram realizadas usando o teste U de Mann-Whitney. As diferenças dentro dos grupos individuais foram analisadas usando os testes de Wilcoxon. Para as análises bioquímicas, as variáveis estão apresentadas como média  $\pm$  desvio padrão (DP) de 8 animais por grupo. As comparações entre os grupos foram feitas por meio de ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Tukey. Para todas as comparações,  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### 3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Todos os procedimentos foram aprovados pela CEUA da UNISUL (19.005.4.01.IV) (ANEXO A), e realizados seguindo as diretrizes brasileiras do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e em conformidade com as diretrizes do *National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (publicação do NIH nº 80-23), revisada em 1996. Em consonância à DBCA, foram adotados os procedimentos que visam evitar, terminar, minimizar ou reduzir a dor, desconforto ou distresse do animal, utilizando assim ações como: i) adoção de tratamento para aliviar a dor, o desconforto ou o distresse; ii) interrupção de um procedimento doloroso; iii) exclusão do animal do estudo; ou iv) morte humanitária do animal realizado por médico veterinário responsável.

#### 4. ARTIGO

A seguir está inserido o artigo científico fruto dessa tese de Doutorado, que será submetido para a revista científica *Molecular Neurobiology* com fator de impacto de 5.682 (A1 Med II).

#### **EFFECTS OF ENVIRONMENTAL ENRICHMENT ON LONG-TERM BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL PARAMETERS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AFTER NEONATAL IMMUNE ACTIVATION**

Paula Dias<sup>1,2,\*</sup>, Matheus L. Dutra<sup>1,2</sup>, Viviane Freiburger<sup>1,2</sup>, Letícia Ventura<sup>1,2</sup>, Clarissa M. Comim<sup>1</sup>, Franciane Bobinski<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research group on neurodevelopment of childhood and adolescence.

<sup>2</sup> Experimental Neuroscience Laboratory (LaNEx), Postgraduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina (UNISUL), Palhoça, SC, Brazil.

\* Corresponding Author: Paula Dias. Research group on neurodevelopment of childhood and adolescence, Laboratory of Experimental Neuroscience, Postgraduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária Pedra Branca, 88137-270, Palhoça, SC, Brazil. E-mail: paulinhapsi10@hotmail.com; Phone: +55 48 3279 1167

**Abstract**

**Introduction:** Neonatal immune activation (NIA) promotes long-term behavioral and neurochemical changes in the central nervous system (CNS). Environmental enrichment (EE) has been a promising alternative in modulating such changes caused by NIA. **Objective:** To evaluate the effects of the EE on long-term behavioral and neurochemical parameters after AIN. **Methods:** To this aim, two days old C57BL/6 mice received PBS or LPS. When completed 28 days of age, the mice were submitted to the EE protocol of 3 hours/day for 5 days/week until 60 or 120 days old. After completing the EE protocols, memory, neuroinflammation, BDNF levels, and the immunocontent of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) and  $\beta$ -amyloid proteins in the hippocampus and cortex of the animals were evaluated. **Results:** EE improved memory capacity at 60 and 120 days old, increased BDNF levels, decreased interleukin (IL)-1 $\beta$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  levels at 60 and 120 days in cortex and hippocampus. The EE up to 60 days reduced the immunocontent of (GSK-3 $\beta$ ) in the hippocampus and the EE 120 days reduced GSK-3 $\beta$  in the hippocampus and cortex. **Conclusion:** The present results demonstrate the importance of EE protocol, aiming to minimize long-term damage after AIN, translating this to clinical aspects, EE can be used as an experimental, non-invasive prevention strategy in neonates after neuroinflammation process.

**Keywords:** Neonatal Immune Activation. Environmental Enrichment. Memory. Cytokines. Neurotrophins. Neurodegeneration

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou que os animais que passaram pelo processo de AIN aos dois dias de vida apresentaram prejuízo no processo de aquisição de memória de curto e longo prazo, assim como, diminuição nos níveis de BDNF aos 60 e 120 dias, no córtex e no hipocampo. A AIN colaborou para a aumento nos níveis das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e diminuição de IL-10 aos 120 dias de vida, no córtex e hipocampo, e aos 60 dias aumentou o nível de IL-1 $\beta$  e IL-10 também em ambas as estruturas cerebrais, inda, a AIN causou aumento no imunocontéudo da proteína GSK-3 $\beta$  aos 60 dias, no hipocampo e aumento no imunocontéudo de GSK-3 $\beta$ , aos 120 dias, no córtex e hipocampo.

No entanto o EA conseguiu reverter tais alterações, preveniu os prejuízos no processo de memória, aos 60 e 120 dias o EA preveniu a redução dos níveis de BDNF e preveniu o aumento da citocina IL-1 $\beta$  no córtex e hipocampo, assim como, aos 60 dias preveniu o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , no córtex e hipocampo. Com relação ao imunocontéudo da proteína GSK-3 $\beta$ , o protocolo de EA que perdurou até os 60 dias de vida preveniu o aumento do imunocontéudo dessa proteína, no hipocampo e aos 120 dias no córtex e hipocampo, prevenindo o dano que a AIN havia causado.

Diante do apresentado acima, demonstra-se que a AIN traz prejuízos significativos para o desenvolvimento a curto e longo prazo, assim como, o EA pode prevenir as alterações comportamentais em específico no processo de memória, assim como, ao nível molecular, demonstrando a importância de se utilizar um ambiente enriquecido em longo prazo após um processo de AIN.

O presente estudo poderá estimular novas discussões sobre o assunto, buscando melhores esclarecimentos sobre o efeito e importância do EA. O melhor entendimento dos efeitos de técnicas terapêuticas não invasivas como o EA pode auxiliar na prevenção e/ou tratamento de alterações encefálicas decorrentes de doenças neuroinflamatórias e contribuir para futuros estudos clínicos.

Do ponto de vista acadêmico e científico, os resultados desta pesquisa resultarão em publicações em periódicos internacionais e servirão para a padronização de metodologias para o desenvolvimento de estudos futuros pré-clínicos, e como base para estudos clínicos.

No âmbito social, os resultados do presente estudo representam a possibilidade do desenvolvimento de uma alternativa terapêutica acessível, não farmacológica e não invasiva.

## REFERÊNCIAS

1. Sankowski R, Mader S, Valdés-Ferrer SI. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. *Front Cell Neurosci.* 2015; 2:9-28.
2. Gemma C. Neuroimmunomodulation and Aging. *Aging Dis.* 2010; 1(3):169–172.
3. Adams-Chapman I, Stoll BJ. Neonatal infection and long-term neurodevelopmental outcome in the preterm infant. *Curr Opin Infect Dis.* 2006; 19(3):290–297.
4. Comim CM, Bussmann RM, Simão SR, Ventura L, Freiberger V, Patricio JJ, et al. Experimental Neonatal Sepsis Causes Long-Term Cognitive Impairment. *Mol Neurobiol.* 2016; 53(9):5928-5934.
5. Majidi-Zolbanin J, Azarfarin M, Samadi H, Enayati M, Salari AA. Adolescent fluoxetine treatment decreases the effects of neonatal immune activation on anxiety-like behavior in mice. *Behav Brain Res.* 2013, 250:123-32.
6. Dias P, Freiberger V, Ventura L, Bragagnolo D, Dutra ML, Horewicz VV, Comim CM. Late Brain Involvement after Neonatal Immune Activation. *Biomed Res Int.* 2019 Aug 5;2019:9573248.
7. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res.* 2001; 7(3):167–202.
8. Whitlock JR, Sutherland RJ, Witter MP, Moser MB, Moser EL. Navigating from hippocampus to parietal cortex. *Proc Natl Acad Sci.* 2008; 105 (39): 14755-62.
9. Torrealba F, Valdés JL. The parietal association cortex of the rat. *Biol Res.* 2008; 41(4):369-77.
10. Anderson JR. *Aprendizagem e memória: uma abordagem integrada.* 2ed. Rio de Janeiro: LTC; 2005.
11. Squire LR, Zola-Morgan JT. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu Rev Neurosci.* 2011; 34:259-88.
12. Caramellia P, Barbosa MT. How to diagnose the four most frequent causes of dementia? *Rev Bras Psiquiatr.* 2002; 24:7–10.
13. Lorntz B, Soares AM, Moore SR, Pinkerton R, Gansneder B, Bovbjerg VE, et al. Early childhood diarrhea predicts impaired school performance. *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25(6):513–520.
14. Falção AS, Fernandes A, Brito MA, Silva RF, Brites D. Bilirubin-induced

- inflammatory response, glutamate release, and cell death in rat cortical astrocytes are enhanced in younger cells. *Neurobiol Dis.* 2005; 20 (2): 199206.
15. Lamar CD, Hurley RA, Taber KH. Sepsis-associated encephalopathy: review of the neuropsychiatric manifestations and cognitive outcome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2011; 23(3): 237-41.
  16. Granja C, Dias C, Costa-Pereira A, Sarmiento A. Quality of life of survivors from severe sepsis and septic shock may be similar to that of others who survive critical illness. *Crit Care.* 2004; 8(2):91-98.
  17. Millett CM, Phillips BE, Saunders EFH. The sex-specific effects of LPS on depressive-like behavior and oxidative stress in the hippocampus of the mouse. *Neuroscience.* 2018; 399:77-88
  18. Custódio CS, Mello BSF, Filho AJMC, de Carvalho Lima CN, Cordeiro RC, Miyajima F, et al. Neonatal Immune Challenge with Lipopolysaccharide Triggers Long-lasting Sex- and Age-related Behavioral and Immune/Neurotrophic Alterations in Mice: Relevance to Autism Spectrum Disorders. *Mol Neurobiol.* 2018; 55(5):3775-3788.
  19. Dugger BN, Dickson DW (2017) Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5;9(7):a028035.
  20. Paula VJR, Guimarães FM, Diniz BS, Forlenza OV. Neurobiological pathways to Alzheimer's disease Amyloid-beta, TAU protein or both?. *Dement Neuropsychol.* 2009;3(3):188–194.
  21. Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP. Increased level of active GSK-3 beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2007; 33(1):43-55.
  22. Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW. Incipient Alzheimer's disease: Microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101(7):2173–2178.
  23. Chen DC, Wang J, Wang B, Yang SC, Zhang CX, Zheng YL, et al. Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in drug-naïve first-episode schizophrenia: relationship to clinical phenotypes. *Psychopharmacology.* 2009; 207:375–380.
  24. Jiao SS, Shen LL, Zhu C, Bu XL, Liu YH, Liu CH, et al. Brain-derived neurotrophic factor protects against tau-related neurodegeneration of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry.* 2016; 6:e907.
  25. Fares RP, Belmeguenai A, Sanchez PE, Kouchi HY, Bodennec J, Morales A, et al. Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats.

- PLoS One. 2013; 8(1):e53888.
26. Rojas JJ, Deniz BF, Miguel PM, Diaz R, Hermel Edo E, Achaval M, et al. Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Exp Neurol*. 2013; 241:25-33.
  27. Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci*. 2006; 24(7):1850-6.
  28. Gobbo OL, O'Mara SM. Impact of enriched environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. *Behav Brain Res*. 2004; 152(2):231-41.
  29. Williamson R, Scales T, Clark BR, Gibb G, Reynolds CH, Lellie S, et al. Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid-beta peptide exposure: involvement of Src family protein kinases. *J Neurosci*. 2002; 22(1):10-20.
  30. Stiles J, Terry LJ. The Basics of Brain Development. *Neuropsychol Rev*. 2010; 20(4):327–348.
  31. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Dsm-5): Washington, DC; 2013. p.9-50.
  32. de Lahunta A, Glass EN, Kent M (2016) Embryonic Development of the Central Nervous System, *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 46(2): 193-216.
  33. Cayre M, Canoll P, Goldman JE. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Progress in Neurobiology*. 2009; 88(1):41–63.
  34. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*. 2011; 333(6048):1456-8.
  35. de Graaf-Peters VB, Hadders-Algra M. Ontogeny of the human central nervous system: What is happening when? *Early Human Development*. 2006; 82:257– 266.
  36. Miler Dj, Duka T, Stimpson Dc, Schapiro SJ, et al. Prolonged myelination in human neocortical evolution. *Proc Natl AcadSci USA*. 2012; 109:16480–85.
  37. Wong CT, Wais J, Crawford DA. Prenatal exposure to common environmental factors affects brain lipids and increases risk of developing autism spectrum disorders. *Eur J Neurosci*. 2015; 42: 2742–60.

38. Fox E, Amaral D, Van de Water J. Maternal and fetal antibrain antibodies in development and disease. *Dev Neurobiol.* 2012; 72:1327-34.
39. Ornoy A, Weinstein-Fudim L, Ergaz Z. Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). *Reproductive toxicology.* 2015; 09:155 – 69.
40. Murphy K, Weaver C. *Janeway's Immunobiology.* 8 ed. Washingtn Univ Sch med. St louis. Kindle Edition. 2016.
41. Glaser MA, Hughes LM, Jnah A, Newberry D. Neonatal Sepsis: A Review of Pathophysiology and Current Management Strategies. *Advances in Neonatal Care.* 2021; 21: 49-60.
42. Campebell RC, Peiró JR, Rosa PCS, Valadão CAA, Bechara GH. Endotoxemia por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, em eqüinos: efeitos de antiinflamatórios nas concentrações sérica e peritoneal do fator de necrose tumoral alfa (TNF-a) *Arq bras med vet zootec.* 2007; 59 (4) :837-84.
43. Wang X, Rousset CI, Hagberg H, Mallard C. Lipopolysaccharide- induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin fetal neonatal med.* 2006; 11(5):343-53.
44. Abbas AK, Lichtman AH, Pillal S. *Imunologia celular e molecular.* 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
45. Weizman R, Laor N, Karp I, Dagan E, Reiss A, Dar DE, Wolmer Lgm. Alteration of platelet benzodiazepine receptors by stress of war. *Am j psychiatry.* 1994;15:766-7.
46. Hanke ML, Kielian T. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin sci.* 2011;121:367-87.
47. Boonen B, Alpizar YA, Sanchez A, Lopez-Requena A, Voets, T, Talavera K. Differential effects of lipopolysaccharide on mouse sensory TRP channels. *Cell Calcium.* 2018; 73:72–81.
48. Alpizar YA, Boonen B, Sanchez A, Jung C, Lopez-Requena A, Naert R, et al. TRPV4 activation triggers protective responses to bacterial lipopolysaccharides in airway epithelial cells. *Nat. Commun.* 2017; 8:1059
49. Meseguer V, Alpizar YA, Luis E, Tajada S, Denlinger B, Fajardo O, et al. TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nat. Commun.* 2014; 5:3125.
50. Dantzer R, Wollman EE. Relationships between the brain and the immune system. *J soc biol.* 2003;197(2):81-8.
51. Mansur RB, Zugman A, Asevedo M, Cunha GR, Bressan RA. Cytokines in

- schizophrenia: possible role of anti-inflammatory medications in clinical and preclinical stages. *Psychiatry clin neurosci*. 2012; 66:247-60.
52. Alshaikh B, Yusuf K, Sauve R. Neurodevelopmental outcomes of very low birth weight infants with neonatal sepsis: systematic review and meta-analysis. *J perinatol*. 2013; 33(7):558-64.
  53. Pavón I, Besedosky H, Bottasso O, Velasco-velázquez MA. Clinical and experimental immunomodulation. *J immunol res*. 2017; 2017:31529.
  54. Chistyakov DV, Azbukina NV, Lopachev AV, Kulichenkova KN, Astakhova AA, Sergeeva MG. Rosiglitazone as a Modulator of TLR4 and TLR3 Signaling Pathways in Rat Primary Neurons and Astrocytes. *Int. J. Mol. Sci*. 2018; 2: 19(1).
  55. Fu H, Yang T, Xiao W, Fan I, Wu Y, Terrando N, Wang TL. Prolonged neuroinflammation after lipopolysaccharide exposure in aged rats. *Plos one*. 2014; 9(8):e106331.
  56. Dammann O, O'shea M. Cytokines and perinatal brain damage. *Clin Perinatol*. 2008;35(4):643-63.
  57. Kuypers E, Ophelders D, Jellema RK, Kunzmann S, Gavilanes AW, Kramer BW. White matter injury following fetal inflammatory response syndrome induced by chorioamnionitis and fetal sepsis: lessons from experimental ovine models. *Early Hum Dev*. 2012;88(12):931-6.
  58. Basu S, Agarwal P, Anupurba S, Shukla R, Kumar A. Elevated plasma and cerebrospinal fluid interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha concentration and combined outcome of death or abnormal neuroimaging in preterm neonates with early-onset clinical sepsis. *J Perinatol*. 2015; 35(10):855-61.
  59. Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *ScienceDirect*. 2007; 28(1):5-11.
  60. Kahn MM. *Immunopharmacology*. 2nd ed. Cham, Switzerland: Springer International. 2016.
  61. Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol*. 2007; 28(1):12-8.
  62. Strunk T, Inder T, Wang X, Burgner D, Mallard C, Levy O. Infection-induced inflammation and cerebral injury in preterm infants. *Lancet infect dis*. 2014; 14(8):751-762.
  63. Favrais G, van de Looji Y, Fleiss B, Ramanantsoa N, Bonnin P, Stoltenburg-Didinger G, et al. Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. *American Neurological Association*. 2011; 70(4):550-65.

64. Xie D, Shen F, He S, Chen M, Han Q, Fang M, et al. Il-1 $\beta$  induces hypomyelination in the periventricular white matter through inhibition of oligodendrocyte progenitor cell maturation via FYN/MEK/ERK signaling pathway in septic neonatal rats. *Glia*. 2016; 64(4):583-602.
65. Manning SM, Talos DM, Zhou C, Selip DB, Park HK, Park CJ, et al. NMDA receptor blockade with memantine attenuates white matter injury in a rat model of periventricular leukomalacia. *J Neurosci*. 2008; 25;28(26):6670-8.
66. Czirr E, Wyss-Coray T. The immunology of neurodegeneration. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1156-63.
67. Faulkner jr. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J neurosci*. 2004; 24(9):2143-2155.
68. Falck M, Osredkar D, Wood TR, Maes E, Flatebø T, Sabir H, et al. Neonatal systemic inflammation induces inflammatory reactions and brain apoptosis in a pathogen-specific manner. *Neonatology*. 2018;113(3):212-220.
69. Falcão AS, Silva RFM, Vaz AR, Gomes C, Fernandes A, Barateiro A, et al. Cross-talk between neurons and astrocytes in response to bilirubin: adverse secondary impacts. *Neurotox Res*. 2014;26(1):1–15.
70. Bhalala US, koehler RC, Kannan S. Neuroinflammation and neuroimmune dysregulation after acute hypoxic-ischemic injury of developing brain. *Front pediatr*. 2014; 2: 144.
71. Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat. Med*. 2017; 23:1018–1027.
72. Sheppard O, Coleman MP, Durrant CS. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation induces presynaptic disruption through a direct action on brain tissue involving microglia-derived interleukin 1 beta. *J Neuroinflammation*. 2019: 16(1):106.
73. Moraes CA, Santos G, de Sampaio e Spohr TC, D'Avila JC, Lima FR, Benjamim CF, et al. Activated microglia-induced deficits in excitatory synapses through IL-1 $\beta$ : implications for cognitive impairment in sepsis. *Mol Neurobiol*. 2015;52:653–63.
74. Han Q, Lin Q, Huang P, Chen M, Hu X, Fu H, et al. Microglia-derived IL-1 $\beta$  contributes to axon development disorders and synaptic deficit through p38-MAPK signal pathway in septic neonatal rats. *J Neuroinflammation*. 2017; 14:14(1):52.
75. Terada T, Yokokura M, Obi T, Bunai T, Yoshikawa E, Ando I, et al. In vivo direct relation of tau pathology with neuroinflammation in early Alzheimer's disease. *J Neurol*. 2019; 266(9):21862196.
76. Heneka MT, Carson MJ, Khoury JEL, Landreth GE, Brosseron F,

- Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Lancet Neurol.* 2015; 14(4): 388–405.
77. Bostanciklioğlu M. An update on the interactions between Alzheimer's disease, autophagy and inflammation. *Gene.* 2019; 705:157-166.
78. Laske C, Schmohl M, Leyhe T, Stransky E, Maetzler W, Berg D, et al. Immune profiling in blood identifies sTNF-R1 performing comparably well as biomarker panels for classification of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis.* 2013; 34(2):367-75.
79. Thambisetty M, Lovestone S. Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible. *Biomark Med.* 2010;4(1):65-79.
80. Sharma N, Singh AN. Exploring Biomarkers for Alzheimer's Disease. *J Clin Diagn Res.* 2016; 10(7):01-06.
81. Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: The role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015; 16: 358–372.
82. Batista CRA, Gomes GF, Candelario-Jalil E, Fiebich BL, de Oliveira ACP. Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. *Int J Mol Sci.* 2019; 9:20-29.
83. Zhao Y, Lukiw WJ. Bacteroidetes Neurotoxins and Inflammatory Neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 2018; 55:9100–9107.
84. Zhan X, Stamova B, Sharp FR. Lipopolysaccharide Associates with Amyloid Plaques, Neurons and Oligodendrocytes in Alzheimer's Disease Brain: A Review. *Front. Aging Neurosci.* 2018; 22:10-42.
85. Zhan X, Stamova B, Jin LW, DeCarli C, Phinney B, Sharp FR. Gram-negative bacterial molecules associate with Alzheimer disease pathology. *Neurology* 2016; 87:2324–2332.
86. Behairi N, Belkhef M, Rafa H, Labsi M, Deghbar N, Bouzid N, Mesbah-Amroun H, et al., All-trans retinoic acid (ATRA) prevents lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, amyloidogenesis and memory impairment in aged rats. *J. Neuroimmunol.* 2016; 300: 21–29.
87. Zhao Y, Cong L, Jaber V, Lukiw WJ. Microbiome-Derived Lipopolysaccharide Enriched in the Perinuclear Region of Alzheimer's Disease Brain. *Front. Immunol.* 2017; 8:1064.
88. Zhao Y, Jaber V, Lukiw WJ. Secretory Products of the Human GI Tract Microbiome and Their Potential Impact on Alzheimer's Disease (AD): Detection of Lipopolysaccharide (LPS) in AD Hippocampus. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017; 7:318.

89. Sly LM, Krzesicki RF, Brashler JR, Buhl AE, McKinley DD, Carter DB, Chin JE. Endogenous brain cytokine mRNA and inflammatory responses to lipopolysaccharide are elevated in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* 2001; 56:581–588.
90. Wang LM, Wu Q, Kirk RA, Horn KP, Salem AH, Hoffman JM, Yap JT, Sonnen JA, Towner RA, Bozza FA, et al. Lipopolysaccharide endotoxemia induces amyloid-beta and p-tau formation in the rat brain. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2018; 8:86–99.
91. Ma L, Zhang H, Liu N, Wang PQ, Guo WZ, Fu Q, Jiao LB, Ma YQ, Mi WD. TSPO ligand PK11195 alleviates neuroinflammation and beta-amyloid generation induced by systemic LPS administration. *Brain Res. Bull.* 2016; 121: 192–200.
92. Roe AD, Staup MA, Serrats J, Sawchenko PE, Rissman RA. Lipopolysaccharide-induced tau phosphorylation and kinase activity–modulation, but not mediation, by corticotropin-releasing factor receptors. *Eur. J. Neurosci.* 2011; 34:448–456
93. Behairi N, Belkhef M, Rafa H, Labsi M, Deghbar N, Bouzid N, et al. All-trans retinoic acid (ATRA) prevents lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, amyloidogenesis and memory impairment in aged rats. *J. Neuroimmunol.* 2016; 300:21–29
94. Marottoli FM, Katsumata Y, Koster KP, Thomas R, Fardo DW, Tai LM. Peripheral Inflammation, Apolipoprotein E4, and Amyloid- $\beta$  Interact to Induce Cognitive and Cerebrovascular Dysfunction. *ASN Neuro* 2017; 9(4):1759091417719201.
95. Maher A, El-Sayed NS, Breitinger HG, Gad MZ. Overexpression of NMDAR2B in an inflammatory model of Alzheimer's disease: Modulation by NOS inhibitors. *Brain Res. Bull.* 2014; 109:109–116.
96. Milbrandt E, Derek C. Bench-to-bedside review: critical illness-associated cognitive dysfunction – mechanisms, markers, and emerging therapeutics. *Crit care.* 2006; 10(6):238.
97. Cortese f, scicchitano p, gesualdo m, et al. Early and late infections in newborns: where do we stand? A review. *Pediatr neonatol.* 2015;57(4):265-273.
98. Cortese F, Scicchitano P, Gesualdo M, Filaninno A, De Giorgi E, Schettini F, et al. Early and Late Infections in Newborns: Where Do We Stand? A Review. *Pediatr Neonatol.* 2016; 57(4):265-73.

99. Thornton C, Rousset CI, Kichev A, Miyakuni Y, Vontell R, Baburamani AA, et al. Molecular mechanisms of neonatal brain injury. *Neurology Res Int*. 2012; 2012:506320.
100. Cowan CS, Callaghan BL, Kan JM, Richardson R. The lasting impact of early-life adversity on individuals and their descendants: potential mechanisms and hope for intervention. *Genes Brain Behav*. 2016;15(1):155-68.
101. Gisslen T, Singh G, Georgieff MK. Fetal inflammation is associated with persistent systemic and hippocampal inflammation and dysregulation of hippocampal glutamatergic homeostasis. *Pediatr Res*. 2019;85(5):703-710.
102. Zhan Y, Paolicelli RC, Sforazzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, et al. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat neurosci*. 2014;17(3):400-406.
103. Kirsten TB, Lippi LL, Bevilacqua E, Bernardi MM. LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases il-1 $\beta$  levels in adult rat offspring: relevance to autism. *Plos one*. 2013; 8(12):e82244.
104. Wang KC, Fan IW, Kaizaki A, Pang Y, Cai Z, Tien IT. Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. *Neuroscience*. 2013; 234:146-157.
105. Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B, et al. Neurodevelopmental and Growth Impairment Among Extremely Low-BirthWeight Infants With Neonatal Infection. *JAMA*. 2004. 292(19):2357–65.
106. Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in alzheimer's disease. *Neuron*. 2004; 44(1):181-193.
107. Campbell IL, Krucker T, Steffensen S, Akwa Y, Powell HC, Pista T, et al. Structural and functional neuropathology in transgenic mice with CNS expression of IFN-alpha. *Res*. 1999; 835: 46-61.
108. Fuentes D, Malloy-diniz IF, Camargo CHP, Consenza RM. *Neuropsicologia - teoria e prática*. 2. Ed. Porto alegre. Artemed; 2014.
109. Alberto C, Junior M. Integração de três conceitos: função executiva, memória de trabalho e aprendizado. *Psicol teor e pesqui*. 2011;27(3):309-314.
110. Ivan izquierdo. *Memória*. 2nd ed. Porto alegre; 2011.
111. Majd S, Power JH, Grantham HJM. Neuronal response in alzheimer's and parkinson's disease: the effect of toxic proteins on intracellular pathways. *Bmc neurosci*. 2015;16:69.
112. Bloom GS. Amyloid- $\beta$  and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol*. 2014; 71: 505–508.

113. Yuksel M, Tacal O. Trafficking and proteolytic processing of amyloid precursor protein and secretases in Alzheimer's disease development: An up-to-date review. *Eur J Pharmacol.* 2019;24:172415.
114. Korczyn AD. The amyloid cascade hypothesis. *Alzheimers Dement.* 2008;4(3):176-8.
115. Jiang S, Li Y, Zhang X, Bu G, Xu H, Zhang YW. Trafficking regulation of proteins in alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2014; 11;9-6.
116. Kikkawa M, Ishikawa T, Nakat T, Wakabayashi T, Hirokawa N. Direct visualization of the microtubule lattice seam both in vitro and in vivo. *J Cell Biol.* 1994; 127:1965-71.
117. Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 2018; 30;12-25.
118. Chen L, Wang H, Zhang Z, Li Z, He D, Sokabe M, Chen L. DMXB (GTS21) ameliorates the cognitive deficits in beta amyloid(25-35(-) ) injected mice through preventing the dysfunction of alpha7 nicotinic receptor. *J Neurosci Res.* 2010;1784–1794.
119. Vickers JC, Dickson TC, Adlard PA, Saunders HL, King CE, McCormack G. The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 2000; 60(2): 139-65.
120. Kapaki E, Paraskevas GP, Zalonis IZC. CSF tau protein and beta-amyloid (142) in alzheimer's disease diagnosis: discrimination from normal ageing and other dementias in the greek population. *Eur j neurol.* 2003;10(2):119-28.
121. Naseri NN, Wang H, Guo J, Sharma M, Luo W. The complexity of tau in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2019; 705:183-194.
122. Buée I, Bussièrè T, Buée-scherrer V, Delacourte HP. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev.* 2000; 33(1):95-1.
123. Doble BW. Woodgett JR. Role of glycogen synthase kinase-3 in cell fate and epithelial–mesenchymal transitions. *Cells Tissues Organs.* 2007;185 73–84.
124. Forde JE, Dale TC. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64: 1930–19.
125. Hugon J, Mouton-Liger F, Cognat E, Dumurgier J, Paquet C. Blood-Based Kinase Assessments in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2018; 14:10-338.
126. Brown GC, Bal-Price A. Inflammatory Neurodegeneration Mediated by Nitric Oxide, Glutamate, and Mitochondria. *Mol Neurobiol.* 2003; 27(3):325–355.

127. Goold RG, Gordon-Weeks PR. Microtubule-associated protein 1b phosphorylation by glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is induced during pc12 cell differentiation. *J Cell Sci.* 2001;114:4273-84.
128. Turenne GA, Price BD. Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity. *BMC Cell Biol.* 2001; 2:12.
129. Hooper C, Markevich V, Plattner F, Killick R, Schofield E, Engel T, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation western blotting. *Eur J Neurosci.* 2007;25(1):81-6.
130. Hernández F, Borrell J, Guaza C, Avila J, Lucas JJ. Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express gsk-3beta in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem.* 2002; 83(6):1529-33.
131. King MK, Pardo M, Cheng Y, Downey K, Jope RS, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors: rescuers of cognitive impairments. *Pharmacol Ther.* 2014;141(1):1-12.
132. Galera C, Garcia RB, Vasques R. Componentes funcionais da memória visuoespacial. *Estud avançados.* 2013; 27(77):29-43.
133. Fuster-Matanzo A, Llorens-Martín M, de Barreda EG, Ávila J, Hernández F. Different susceptibility to neurodegeneration of dorsal and ventral hippocampal dentate gyrus: a study with transgenic mice overexpressing GSK3 $\beta$ . *Plos one.* 2011;6(11):e27262.
134. Llorens-Martín M, Fuster-Matanzo A, Teixeira CM, Jurado-Arjona J, Ulloa F, Defelipe J, et al. GSK-3 $\beta$  overexpression causes reversible alterations on postsynaptic densities and dendritic morphology of hippocampal granule neurons in vivo. *Mol Psychiatry.* 2013;18: 451–460.
135. Takashima A. GSK-3 is essential in the pathogenesis of alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2006; 9:309-17.
136. Wozniak MA, Itzhaki RF, Shipley SJ, Dobson CB. Herpes simplex virus infection causes cellular  $\beta$ -amyloid accumulation and secretase upregulation. *Neurosci Lett.* 2007; 429:95-100.
137. Miklossy J, Kis A, Radenovic A, Miller L, Forro L, Martins R, et al. Beta-amyloid deposition and alzheimer's type changes induced by borrelia spirochetes. *Neurobiol Aging.* 2006; 27(2):228-236.
138. Bekinschtein P, Cammarota M, Medina JH. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology.* 2014; 76:677-83.
139. Peng S, Wu J, Mufson E, Fahnstock M. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *Journal of*

- Neurochemistry. 2005; 93:1412-1421.
140. Comim CM, Cassol OJ Jr, Constantino LC, Constantino LS, Petronilho F, Tuon L, et al. Oxidative variables and antioxidant enzymes activities in the mdx mouse brain. *Neurochem Int.* 2009; 55(8):802-805.
  141. Taccone FS, Su F, Pierrakos C, He X, James S, Dewitte O, et al. Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: an experimental study. *Crit Care.* 2010; 14(4):R140
  142. Semmler A, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T, et al. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp neurol.* 2007;204(2):733-740.
  143. Mawanda F, Wallace R. Can infections cause alzheimer's disease? *Epidemiol rev.* 2013;35(1):161-180.
  144. Chen WW, Zhang X, Huang W. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol Med Rep.* 2016; 13(4): 3391–3396.
  145. Simpson J, Kelly JP. The impact of environmental enrichment in laboratory rats--behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res.*2011;222(1):246-64.
  146. Diamond MC. Response of the brain to enrichment. *Acad bras ciências.* 2001; 73 (2).
  147. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Rev Neurosci.* 2000; 1(3):191-8.
  148. Varty GB, Paulus MP, Braff DL, Geyer MA. Environmental enrichment and isolation rearing in the effects on locomotor behavior and startle response plasticity. *Biol Psychiatry.* 2000;47: 864-87.
  149. Rosenzweig MR, Bennett EL, Diamond M. Brain changes in response to experience. *Sci am.* 1972;226, 22-29.
  150. Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B. Environmental enrichment and the brain. *Prog Brain Res.* 2002;138:109-1.
  151. Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, et al. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res.* 2005; 163(1):78-90.
  152. Swerdlow NR, Braff DL, Geyer MA. Animal models of deficient sensorimotor gating: what we know, what we think we know, and what we hope to know soon. *Behav Pharmacol.* 2001;11:185-20.

153. Gong WG, Wang YJ, Zhou H, Li XL, Bai F, Ren QG, Zhang ZJ. Citalopram Ameliorates Synaptic Plasticity Deficits in Different Cognition-Associated Brain Regions Induced by Social Isolation in Middle-Aged Rats. *Mol Neurobiol.* 2017; 54(3):1927-1938.
154. Wang L, Cao M, Pu T, Huang H, Marshall C, Xiao M. Enriched Physical Environment Attenuates Spatial and Social Memory Impairments of Aged Socially Isolated Mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2018; 21(12): 11114–1127
155. Dong S, Li C, Wu P, Tsien JZ, Hu Y. Environment enrichment rescues the neurodegenerative phenotypes in presenilins-deficient mice. *Eur j neurosci.* 2007;26(1):101-12.
156. Woodcock EA, Richardson R. Effects of environmental enrichment on rate of contextual processing and discriminative ability in adult rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2000;73, 1–10.
157. Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci.* 2005;21(2):513-21.
158. Marashi V, Barnekow A, Ossendorf E, Sachser N. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Horm Behav.* 2003;281-292.
159. Ambrogini P, Cuppini R, Cuppini C, Ciaroni S, Cecchini T, Ferri P, et al. Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett.* 2000;286:21-4.
160. Lambert TJ, Fernandez SM, Frick KM.. Different types environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2005;83: 206-21.
161. Stewart LS, Cortez MA, Snead OC. Environmental enrichment improves behavioral outcome in the ay-9944 model of childhood atypical absence epilepsy. *Int J Neurosci.* 2012;122: 449–4.
162. Bezzina C, Verret L, Halley H, Dahan L, Claire R. Environmental enrichment does not influence hypersynchronous network activity in the tg2576 mouse model of alzheimer's disease. *Aging neurosci.* 2015;7:178.
163. Greifzua F, Pielecka-Fortunaa JK, Kremplerb K, Favaroc PD, Schlütercom E, et al. Environmental enrichment extends ocular dominance plasticity into adulthood and protects from stroke-induced impairments of plasticity. *Pnas.* 2014;111(3)1150.
164. Selvi Y, Gergerlioglu HS, Akbaba N, Oz M, Kandeger A, Demir EA, et al. Impact of enriched environment on production of tau, amyloid precursor protein and, amyloid- $\beta$  peptide in high-fat and high-sucrose-fed rats. *Acta*

- Neuropsychiatr. 2017;29(5):291-298.
165. Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol*. 2000;164(1):45-52.
  166. Angelucci F, De Bartolo P, Gelfo F, Foti F, Cutuli D, Bossù P, et al. Increased concentrations of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat cerebellum after exposure to environmental enrichment. *Cerebellum*. 2009;8(4):499-506.
  167. Cechetti F, Worm PV, Lovatel G, Moysés F, Siqueira IR, Netto CA. Environmental enrichment prevents behavioural deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hyperfusion in the rat. *Life Sci*. 2012; 91:29–36.
  168. McQuaid RJ, Audet MC, Jacobson-Pick S, Anisman H. Environmental enrichment influences brain cytokine variations elicited by social defeat in mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2013; 38: 987–996.
  169. Zhu SW, Yee BK, Nyffeler M, Winblad B, Feldon J, Mohammed AH. Influence of differential housing on emotional behavior and neurotrophin levels in mice. *Behavioural brain research*. *Behav Brain Res*. 2006;169:10–20.
  170. Giacobbo BL, de Freitas BS, Vedovelli K, Schlemmer LM, Pires VN, Antoniazzi V, et al. Long-term environmental modifications affect BDNF concentrations in rat hippocampus, but not in serum. *Behav Brain Res*. 2019;21:111965.
  171. Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann K, Blankenship A, Overall R, Staufenbiel M, et al. Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2006;60:1314-23.
  172. Gjumrakch A, Palacios HH, Gasimov E, Obrenovich ME, Morales L, Leszek J, et al. Oxidative stress induced mitochondrial failure and vascular hypoperfusion as a key initiator for the development of Alzheimer disease. *Pharmaceuticals*. 2010;3(1):158-187.
  173. Griñan-Ferré C, Pérez-Cáceres D, Gutiérrez-Zetina SM, Camins A, Palomera-Avalos V, Ortuño-Sahagún D, et al. Environmental enrichment improves behavior, cognition, and brain functional markers in young senescence-accelerated prone mice (SAMP8). *Mol Neurobiol*. 2016; 53:2435-2450.
  174. Shilpa BM, Bhagya V, Harish G, Srinivas Bharath MM, Shankaranarayana Rao BS. Environmental enrichment ameliorates chronic immobilisation stress-induced spatial learning deficits and restores the expression of BDNF, VEGF, GFAP and glucocorticoid receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017; 76:88-100.

175. Hu Y-S, Xu P, Pigino G, Brady ST, Larson J, Lazarov O. Complex environment experience rescues impaired neurogenesis, enhances synaptic plasticity, and attenuates neuropathology in familial Alzheimer's disease-linked APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 mice. *FASEB Journal*. 2010;24: 1667–1681.
176. Mainardi M, di Garbo A, Caleo M, Berardi N, Sale A, Maffei L. Environmental enrichment strengthens corticocortical interactions and reduces amyloid- $\beta$  oligomers in aged mice. *Front Aging Neurosci* 2014;6:1–11.
177. Milgram NW, Siwak-Tapp CT, Araujo J, Head E. Neuroprotective effects of cognitive enrichment. *Ageing Res Rev*. 2006; 5: 354-369.
178. Baumans V, Van Loo PL. How to improve housing conditions of laboratory animals: the possibilities of environmental refinement. *Vet J*. 2013;195(1):24-32.
179. Boca SM, Nishida M, Harris M, Rao S, Cheema AK, Gill K et al. Discovery of metabolic biomarkers for duchenne muscular dystrophy within a natural history study. *Plos one*. 2016;11(4):e0153461.
180. Zhang G, Ghosh S. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotoxin Res*. 2000. 6(6):453-7
181. Singh K, Zhang LX, Bendelja K, Heath R, Murphy S, Sharma S, et al. Interleukin-10 administration improves survival from neonatal sepsis in mice. *Pediatr Res*. 2010. 68 (3):242–7.
182. Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, Feier G, Reinke A, Moreira JC, et al. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*. 2006;34:886-9.
183. Cardoso FL, Herz J, Fernandes A, Rocha J, Sepodes B, Brito MA, et al. Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects. *J neuroinflammation*. 2012;12:18 -3.
184. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982; 297: 681

## ANEXO A- Parecer Aprovação da Comissão de Ética



Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação  
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 13 de maio de 2019  
Registro na CEUA (código): 19.005.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Clarissa Martinelli Comim Cassol

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Efeitos do enriquecimento ambiental a longo prazo no Sistema Nervoso Central após ativação imune", registrada com o 19.005.4.01.IV, sob a responsabilidade de Clarissa Martinelli Comim Cassol - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta instituição, em reunião de 13 de maio de 2019.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal; enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,

  
Prof. Sérgio Melem Spratt  
Coordenador da Comissão

## ANEXO B – Produção científica publicada durante o período do Doutorado

Ano da publicação	Artigos
2019	<p>Published: 10 May 2019</p> <h3>Neurocognitive Impairment in mdx Mice</h3> <p>Clarissa M. Comim , Leticia Ventura, Viviane Freiberger, Paula Dias, Daiane Bragagnolo, Matheus L. Dutra, Ricardo A. Amaral, Ana Lucia S. Camargo-Fagundes, Patricia A. Reis, Hugo C. Castro-Faria-Neto, Mariz Vainzof &amp; Maria L. Bosa</p> <p><i>Molecular Neurobiology</i>, <b>56</b>, 7608–7616(2019)   <a href="#">Cite this article</a></p> <p>405 Accesses   2 Citations   2 Altmetric   <a href="#">Metrics</a></p> <p><b>Abstract</b></p> <p>Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a neuromuscular disorder that affects muscles and also the brain, resulting in memory and behavioral problems. In the pathogenesis of DMD, inflammation is an important factor during the degenerative process. However, the involvement of the brain is still unclear. Therefore, the objective of this study is to evaluate the cognitive involvement, BDNF levels, cytokine levels through the levels of TNF-<math>\alpha</math> and IL-<math>1\beta</math>, the myeloperoxidase (MPO) activity, and the expression of proteins postsynaptic density (PSD)-95</p>
2019	<p><i>Research Article</i></p> <h3>Late Brain Involvement after Neonatal Immune Activation</h3> <p><b>Paula Dias, Viviane Freiberger, Leticia Ventura, Daiane Bragagnolo, Matheus L. Dutra, Verônica V. Horewicz, and Clarissa M. Comim</b> </p> <p><i>Research Group on Neurodevelopment of Childhood and Adolescence, Laboratory of Experimental Neuroscience, Postgraduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Palhoça, SC, Brazil</i></p> <p>Correspondence should be addressed to Clarissa M. Comim; <a href="mailto:clarissamc@gmail.com">clarissamc@gmail.com</a></p> <p>Received 12 March 2019; Accepted 7 June 2019; Published 5 August 2019</p> <p>Guest Editor: Mohan K. M. Karuppan</p> <p>Copyright © 2019 Paula Dias et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.</p> <p>The neonatal immune system is still immature, which makes it more susceptible to the infectious agents. Neonatal immune activation is associated with increased permeability of the blood-brain barrier, causing an inflammatory cascade in the CNS and altering behavioral and neurochemical parameters. One of the hypotheses that has been studied is that neuroinflammation may be involved in neurodegenerative processes, such as Alzheimer's disease (AD). We evaluate visuospatial memory, cytokines levels, and the expression of tau and GSK-<math>3\beta</math> proteins in hippocampus and cortex of animals exposed to neonatal endotoxemia. C57BL/6 mice</p>
2019	<p><b>Research Article</b></p> <h3>Neonatal Immune Activation May Provoke Long-term Depressive Attributes</h3> <p><b>Author(s):</b> Simone H. Scheider-Marzzani, Paula Dias, Viviane Freiberger, Leticia Ventura, Bruna B. Silva, Matheus L. Dutra, Franciane Bobinski, Aline D. Schindwein, Omar J. Cassol, Clarissa M. Comim* </p> <p><b>Journal Name:</b> Current Neurovascular Research</p> <p><b>Volume 16 , Issue 4 , 2019</b>      <b>DOI :</b> 10.2174/1567202616666191007125502</p> <p><a href="#">Journal Home</a></p>

2020	<p><b>Involvement of NLRP3 inflammasome in schizophrenia-like behaviour in young animals after maternal immune activation</b></p> <p>Leticia Ventura <sup>(a1)</sup>, Viviane Freiburger <sup>(a1)</sup>, Vinicius B. Thiesen <sup>(a1)</sup>, Paula Dias <sup>(a1)</sup> ... </p> <p>DOI: <a href="https://doi.org/10.1017/neu.2020.27">https://doi.org/10.1017/neu.2020.27</a> Published online by Cambridge University Press: 14 July 2020</p> <hr/> <p><b>Abstract</b></p> <p><b>Objective:</b> To evaluate the involvement of nod-like receptor pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome in schizophrenia-like behaviour in young animals exposed to maternal immune activation (MIA).</p> <p><b>Methods:</b> To this aim, on the 15th gestational day, the females received an injection of lipopolysaccharides. When the animals completed 7, 14 and 45 postnatal days, they were killed and the whole brain was dissected for biochemical analysis. Animals with 45 postnatal days were submitted to behavioural tests of locomotor activity, social interaction and stereotyped movements.</p> <p><b>Results:</b> It was observed that the animals presented schizophrenia-like behaviour at 45 postnatal days associated with the increase of NLRP3 inflammasome expression and IL-1<math>\beta</math> levels on 7, 14 and 45 postnatal days.</p>
2020	<p style="text-align: right;"> oat open access text</p> <p style="text-align: center;"><b>Journal of Systems and Integrative Neuroscience</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Research Article</b> <span style="float: right;">ISSN: 2059-9781</span></p> <p style="text-align: center;"><b>Effect of mild sepsis on behavioral and biochemical changes on the stress-induced animal model of depression</b></p> <p style="text-align: center;">Clarissa M. Comim<sup>1*</sup>, Napoleão C. Silva<sup>2</sup>, Paula Dias<sup>1</sup>, Bruna P. Mendonça<sup>2</sup>, Gislaïne Z. Réus<sup>2</sup>, Tatiana Barichello<sup>2,4</sup>, Felipe Dal-Pizzol<sup>5</sup> and João Quevedo<sup>2,4,6</sup></p> <p><sup>1</sup>Research Group in neurodevelopment of childhood and adolescence, Laboratory of Experimental Neuroscience, Postgraduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Avenida Pedra Branca, 25 Pedra Branca, 88137-270 Palhoça, SC, Brazil</p> <p><sup>2</sup>Translational Psychiatry Laboratory, Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina (UNESC), Criciúma, SC, Brazil</p> <p><sup>3</sup>Translational Psychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX, USA</p> <p><sup>4</sup>Neuroscience Graduate Program, The University of Texas MD Anderson Cancer Center UTHealth Graduate School of Biomedical Sciences, Houston, TX, USA</p> <p><sup>5</sup>Laboratory of Experimental Physiopathology, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Avenida Universitária, 1105, Pinheirinho, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil</p> <p><sup>6</sup>Center of Excellence on Mood Disorders, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX, USA</p> <hr/> <p><b>Abstract</b></p> <p>The systemic inflammation that occurs during severe sepsis can be the cause of long-term consequences. Studies have demonstrated a possible correlation between the neuroinflammatory process and depression. However, the effects of mild sepsis as a tolerant factor for some depressive parameters have not been described. Thus, the objective of this study is to evaluate the effect of mild sepsis on behavioral and biochemical changes on the stress-induced animal model of depression. To this aim, adult male Wistar rats were submitted to cecal ligation and perforation and after 30 days it was submitted to the chronic mild stress protocol (CMS). The animals were submitted to stressors for 40 days. To evaluate the efficacy of CMS induction anhedonia was determined as the amount of sweet food consumption. The levels of neurotrophins and oxidative damage were also evaluated in the hippocampus. It is observed that mild sepsis improved depressive-like parameters after CMS protocol associated with an increase of neurotrophins levels and a decrease of oxidative damage in the hippocampus. In conclusion, our data suggest that a previous mild systemic inflammation caused by the induction of mild sepsis could decrease consequences in the central nervous system (CNS) induced by CMS protocol.</p>
2021	<p style="text-align: center;"> <b>World Journal of Clinical Cases</b></p> <p style="text-align: center;">Submit a Manuscript: <a href="https://www.f6publishing.com">https://www.f6publishing.com</a> <span style="float: right;">World J Clin Cases 2021 July 16; 9(20): 5358-5371</span></p> <p style="text-align: center;">DOI: 10.12998/wjcc.v9.i20.5358 <span style="float: right;">ISSN 2307-8960 (online)</span></p> <p style="text-align: right;"><i>REVIEW</i></p> <p style="text-align: center;"><b>Obesity in people with diabetes in COVID-19 times: Important considerations and precautions to be taken</b></p> <p style="text-align: center;">Adriano Alberti, Fabiana Schuelter-Trevisol, Betine Pinto Moehlecke Iser, Eliane Traebert, Viviane Freiburger, Leticia Ventura, Gislaïne Tezza Rezin, Bruna Becker da Silva, Fabiana Meneghetti Dallacosta, Leoberto Grigollo, Paula Dias, Gracielle Fin, Josiane Aparecida De Jesus, Fabiane Pertille, Carina Rossoni, Ben Hur Soares, Rudy José Nodari Júnior, Clarissa Martinelli Comim</p>

2022

Neurological Sciences (2022) 43:4493–4502  
<https://doi.org/10.1007/s10072-022-05928-w>

ORIGINAL ARTICLE



## Effects of low-intensity training on the brain and muscle in the congenital muscular dystrophy 1D model

Clarissa M. Comim<sup>1</sup> · Jaime A. Soares<sup>1</sup> · Adriano Alberti<sup>1</sup> · Viviane Freiburger<sup>1</sup> · Leticia Ventura<sup>1</sup> · Paula Dias<sup>1</sup> · Aryadne L. Schactae<sup>1</sup> · Leoberto R. Grigollo<sup>1</sup> · Amanda V. Steckert<sup>2</sup> · Daniel F. Martins<sup>1</sup> · Rudy J. Nodari Junior<sup>6</sup> · Mariz Vainzof<sup>2</sup> · João Quevedo<sup>3,4,5,7</sup>

Received: 5 May 2021 / Accepted: 3 February 2022 / Published online: 19 February 2022  
© Fondazione Società Italiana di Neurologia 2022, corrected publication 2022

### Abstract

**Introduction** Congenital Muscular Dystrophy type 1D (MDC1D) is characterized by a hypoglycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan protein ( $\alpha$ -DG), and this may be strongly implicated in increased skeletal muscle tissue degeneration and abnormal brain development, leading to cognitive impairment. However, the pathophysiology of brain involvement is still unclear. Low-intensity exercise training (LIET) is known to contribute to decreased muscle degeneration in animal models of other forms of progressive muscular dystrophies.

**Aim** The objective of this study was to analyze the effects of LIET on cognitive involvement and oxidative stress in brain tissue and gastrocnemius muscle.

**Methods** Male homozygous ( $Large^{myd-/-}$ ), heterozygous ( $Large^{myd+/-}$ ), and wild-type mice were used. To complete 28 days of life, they were subjected to a low-intensity exercise training (LIET) for 8 weeks. After the last day of training, 24 h were expected when the animals were submitted to inhibitory avoidance and open-field test. The striatum, prefrontal cortex, hippocampus, cortex, and gastrocnemius were collected for evaluation of protein carbonylation, lipid peroxidation, and catalase and superoxide dismutase activity.