



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS MÉDICAS**

**MODELO MURINO DO ESPECTRO AUTISTA
EMPREGANDO O ÁCIDO VALPROICO DURANTE A
GRAVIDEZ: MUDANÇAS COMPORTAMENTAIS E
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS**

Dilza Nazaré Colares de Souza

**Belém - PA
2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS MÉDICAS**

**MODELO MURINO DO ESPECTRO AUTISTA
EMPREGANDO O ÁCIDO VALPROICO DURANTE A
GRAVIDEZ: MUDANÇAS COMPORTAMENTAIS E
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Aluna: Dilza Nazaré Colares de Souza

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guerreiro Diniz

Coorientador: Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz

**Belém - PA
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da Unidade Hospitalar João de Barros Barreto (UHJBB/UFPA/EB SERH)

Souza, Dilza Nazaré Colares de, 1970-

Modelo murino do espectro autista empregando o ácido valproico durante a gravidez: mudanças comportamentais e citocinas pró-inflamatórias. / Dilza Nazaré Colares de Souza; Orientador, Prof. Dr. Daniel Guerreiro Diniz. — 2018.

44 f. : il. ; color. : 30 cm.

Inclui bibliografias.

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Pará, Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, Belém, 2018.

1. Autismo. 2. Ácido valproico. 3. BALB/c. I. Diniz, Daniel Guerreiro, *orient.* II. Título.

CDD - 23. ed. 616.85882

Dilza Nazaré Colares de Souza

**MODELO MURINO DO ESPECTRO AUTISTA
EMPREGANDO O ÁCIDO VALPROICO DURANTE A
GRAVIDEZ: MUDANÇAS COMPORTAMENTAIS E
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

Data da Aprovação: 31/10/2018

Banca Examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guerreiro Diniz
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. José Antônio Picanço Diniz
Instituto Evandro Chagas

Profa. Dra. Marcia Consentino Kronka Sosthenes
Universidade Federal do Pará

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos, por todo o amor, exemplo, orientação e incentivo para os estudos e, em especial, ao meu marido Luciano e aos meus filhos Felipe e Paolo, que foram meus maiores incentivadores e fonte de inspiração.”

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Guerreiro Diniz, por todo o tempo e ajuda dispensados durante o processo de realização deste trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Cristovam W. Picanço Diniz, que me recebeu com todo carinho e respeito em seu laboratório e que proporcionou as condições e apoio necessários para que eu alcançasse meus objetivos.

E enfim, a todos que contribuíram para a realização desta dissertação, seja de forma direta ou indireta, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O presente trabalho avaliou, em testes comportamentais, as atividades exploratória e locomotora de camundongos BALB/c adultos jovens que foram expostos ao ácido valproico durante a gestação e mediu a concentração de citocinas pró-inflamatórias no sangue periférico. Com essa finalidade, todas as fêmeas no dia 12,5 de gestação receberam 0,2 mL de VPA diluído em soro fisiológico (600 mg / kg de peso corporal) ou igual volume de solução salina. Os filhotes foram desmamados no 21^o dia pós-natal e os machos foram mantidos ou no ambiente empobrecido de gaiolas padrão de laboratório (AP) ou em uma gaiola enriquecida (AE). Quatro grupos experimentais independentes de acordo com a condição experimental e ambiente (Ctrl/AE, Ctrl/AP, VPA/AE, VPA/AP) foram organizados. Aos 5 meses de idade, todos os animais submetidos aos testes comportamentais de Campo Aberto (CA), Memória Episódica (ME), *Burrowing* e Labirinto em Cruz Elevado (LCE), tiveram seu sangue periférico coletado e foram perfundidos com solução salina, seguida de fixadores aldeídicos. *Two-way* ANOVA revelou influências significativas da condição experimental (VPA vs. Salina) e ambiente (AE vs. AP) nos resultados comportamentais e na concentração periférica de citocinas pró-inflamatórias. No Campo Aberto, os grupos do ácido valproico, independente do ambiente onde foram mantidos, reverteram a tendência natural de evitar o centro da arena, $F(1,54) = 5,59$, $p = 0,022$. Da mesma forma, no Labirinto em Cruz Elevado, os grupos do ácido valproico, independente dos ambientes em que os animais foram mantidos, apresentaram influência significativa no tempo gasto no centro da plataforma, reduzindo-o significativamente, $F(1,51) = 7,57$, $p = 0,0082$. *Two-way* ANOVA também demonstrou influência significativa da condição experimental (VPA vs. Salina) na resposta imune, reduzindo a IL-1 β , $F(1,49) = 26,24$, $p < 0,0001$ e aumentando a IL-6, $F(1,46) = 16,96$, $p = 0,0002$ dos grupos ácido valproico. Camundongos BALB/c expostos ao ácido valproico durante a gestação mostram mudanças significativas em seu comportamento para explorar novos ambientes e avaliar o risco na idade adulta, e isso está associado a alterações periféricas de citocinas pró-inflamatórias. A estimulação somatossensorial e cognitiva do enriquecimento ambiental parece não ser suficiente para reverter as alterações.

Palavras-chave: Autismo, BALB/c, Ácido valproico, Comportamento, Interleucinas

ABSTRACT

The present study evaluated, in behavioral tests, the exploratory and locomotor activities of young adult BALB/c mice that were exposed to valproic acid during pregnancy and measured their proinflammatory cytokines concentration in peripheral blood. To this end, we exposure females to males and on day 12.5 of gestation, females received 0.2 mL of VPA diluted in saline (600 mg / kg body weight) or equal volume of saline solution. The pups were weaned on the 21st postnatal day and the males were kept either in the impoverished environment of standard laboratory cages (IE) or in an enriched cage (EE). Four independent experimental groups according to experimental condition and environment (Ctrl / EE, Ctrl / IE, VPA / EE, VPA / IE) were organized. At 5 months of age, all animals were submitted to Open Field (OF), Episodic Memory (EM), Burrowing and Elevated Plus Maze (EPM) tests and had their peripheral blood collected and then perfused with saline followed by aldehyde fixatives. Two-way ANOVA revealed significant influences of experimental condition (VPA vs. Saline) and environment (EE vs IE) on behavioral outcomes and on proinflammatory cytokines peripheral concentrations. In the open field, the valproic acid groups, regardless of the environment where they were kept, reversed the natural tendency to avoid the center of the arena, $F(1,54) = 5.59$, $p = 0.022$. Similarly, in the elevated plus maze, the valproic acid groups, independent of the environment where the animals were kept, showed a significant influence on the time spent in the central platform, reducing it significantly, $F(1,51) = 7.57$, $p = 0.0082$. Two-way ANOVA also demonstrated a significant influence of the experimental condition (VPA vs. Saline) on the immune response reducing IL-1 β , $F(1.49) = 26.24$, $p < 0.0001$ and increasing IL-6, $F(1.46) = 16.96$, $p = 0.0002$ of the valproic acid groups. BALB/c mice exposed to valproic acid during pregnancy shows significant changes on their behavior to explore novel environments and to assess risk at adulthood, and this is associated with proinflammatory cytokines peripheral changes. Somatosensory and cognitive stimulation of environmental enrichment seems to be not enough to reverse it.

Keywords: Autism, BALB/c, Valproic acid, Behavior, Interleukins

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Transtorno do espectro do autismo, fatores ambientais e ácido valproico.....	1
1.2	Fatores de Risco e Transtornos do Espectro Autista.....	4
1.3	Modelo experimental do ácido valproico (VPA) para investigação das bases celulares e moleculares do autismo	6
1.4	Inflamação e autismo	8
1.5	Alterações hipocâmpais no autismo	10
1.6	Alterações microgliais no autismo	11
2.	OBJETIVOS	12
2.1	Geral	12
2.2	Específicos	12
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1	Animais e grupos experimentais	13
3.2	Alojamentos dos grupos experimentais	14
3.3	Testes comportamentais	15
3.4	Perfusões	17
3.5	Citocinas	19
3.6	Análises estatísticas	20
4.	RESULTADOS	21
5.	DISCUSSÃO	28
6.	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS.....	32
	ANEXOS	40
	Anexo 1 - Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPA	40

Anexo 2 - 11º FENS Forum de Neurociência - Federação da Sociedade de Neurociência Européia 2018.....	41
Anexo 3 - XLI Reunião Anual da SBNeC - Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento 2018	42
Anexo 4 - XLI Reunião Anual da SBNeC - Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento 2018	43
Anexo 5 - Nota Curta submetida ao Autism Research.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC - Lista de checagem de comportamento autístico (Autism Behavior Checklist)
ADDM - Monitoramento de Deficiências no Desenvolvimento e Autismo dos Estados Unidos (Autism and Developmental Disabilities Monitoring)
ADI - Entrevista Diagnóstica de Autismo
ADOS - Sistema Diagnóstico de Observação do Autismo
AE - Ambiente enriquecido
AP - Ambiente empobrecido
CA1 - Região 1 do corno de Amon
CARS - Escala de avaliação para autismo infantil (Childhood Autism Rating Scale)
CBA - Citometria de fluxo (Cytometric beads array)
CMV - Citomegalovírus
Ctrl - Controle
DAB - Diaminobenzidina
DSM-4 - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 4ª edição
DSM-5 - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5ª edição
IEC - Instituto Evandro Chagas
IFN- γ - Interferon gama
IgG - Imunoglobulina G
IL-1 - Interleucina 1
IL-1 β - Interleucina 1 beta
IL-4 - Interleucina 4
IL-6 - Interleucina 6
kDa - kilodalton
LCR - Líquido céfalo-raquidiano
LPS - Lipopolissacarídeo
MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos -1
PET - Tomografia com emissão de pósitron
Poli I:C - Ácido poliinosínico-policitidílico
PVC - Policloreto de Vinila
RCIU - Restrição do crescimento intrauterino
RDS - Síndrome do desconforto respiratório
RMF - Ressonância magnética funcional
SNC - Sistema nervoso central
SPECT - Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
TEA - Transtorno do espectro do autismo
TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
TNF- β - Fator de necrose tumoral beta
VPA - Ácido valproico

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transtorno do espectro do autismo, fatores ambientais e ácido valproico

O transtorno do espectro do autismo (TEA) é definido pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 5ª edição (DSM-5) como um distúrbio neurocomportamental manifestado por déficits na comunicação social, por interesses específicos e comportamentos repetitivos (APA, 2013).

O TEA é classificado atualmente pela severidade em três níveis, como leve, moderado e grave, o que irá definir o “nível de suporte” indicado para cada indivíduo, ou seja, Nível 1 (“Suporte Necessário”), Nível 2 (“Requerendo suporte substancial”) e Nível 3 (“Requerendo suporte muito substancial”), conforme o DSM-5 (APA, 2013).

Sua prevalência tem aumentado sensivelmente com o tempo e segundo alguns autores, houve registro de 4 a 5 casos por 10.000 em 1966 evoluindo com abrangência de cerca de 1 em 150 no ano 2000 para 1 em 88 no ano 2008 (KOGAN et al., 2009; TCHACONAS e ADESMAN, 2013).

Em 2014, a Rede de Monitoramento de Deficiências no Desenvolvimento e Autismo dos Estados Unidos (Autism and Developmental Disabilities Monitoring - ADDM) informou que cerca de 1 em 68 crianças tinham TEA (com base em dados de 11 comunidades em 2010).

Ainda não está totalmente esclarecido até onde esse aumento é real ou se é decorrente de mudanças nos critérios diagnósticos para o TEA (TCHACONAS e ADESMAN, 2013).

O TEA, por ser complexo e de grande heterogeneidade, permanece com a fisiopatologia obscura e o desenvolvimento de modelos animais refletindo aspectos comportamentais, neuropatológicos e genéticos é fundamental (CHEH et al., 2006) e pode estabelecer uma conexão entre a compreensão das características moleculares da doença e o desenvolvimento de agentes terapêuticos (LEBLANC e FAGIOLINI, 2011).

O diagnóstico do TEA é clínico e podem ser empregadas diversas avaliações, como a Entrevista Diagnóstica de Autismo (ADI) e o Sistema Diagnóstico de Observação do Autismo (ADOS), representando uma entrevista estruturada bastante completa e um método de observação para avaliar objetivamente as habilidades sociais, de comunicação e de comportamento, abrigando todos os

níveis do espectro possível. (SCHOPLER et al., 1980; KRUG, ARICK e ALMOND, 1980).

Há evidências, ainda, que muitas crianças e adultos previamente diagnosticados como tendo retardo mental se encaixavam nos critérios diagnósticos de TEA segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 4ª edição (DSM-4) e o DSM-5 (SHATTUCK, 2006; ELSABBAGH et al., 2012).

São aplicados também, instrumentos validados para população brasileira como a Escala de Avaliação para Autismo Infantil (Childhood Autism Rating Scale, ou CARS) e a Lista de checagem de comportamento autístico (Autism Behavior Checklist ou ABC), que auxiliam na identificação de características autísticas (SCHOPLER et al., 1980; KRUG, ARICK e ALMOND, 1980).

Os sintomas do TEA devem estar presentes na primeira infância e interferir com as atividades diárias, sendo 4 vezes mais prevalentes em homens do que em mulheres (THEOHARIDES, KEMPURAJ e REDWOOD, 2009).

A etiologia é variada, em grande parte desconhecida e parece ser o resultado da interação de fatores genéticos complexos e influências ambientais. É comum entre as crianças com este transtorno, algum grau de deficiência mental e uma variedade de alterações de aprendizagem e comportamentais (TCHACONAS e ADESMAN, 2013).

Alterações epigenéticas no mecanismo do TEA também têm sido propostas (ORNOY, WEINSTEIN-FUDIM e ERGAZ, 2015), assim como a desregulação imunitária que incluem níveis anormais de citocinas e fatores de crescimento e vários anticorpos materno e fetal para o tecido cerebral (ROSSIGNOL e FRYE, 2012).

É citado, ainda, o aumento do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, anormalidades na serotonina no cérebro, a conectividade da substância branca anormal, diminuição no número de células de Purkinje do cerebelo, neuroinflamação (HERBERT, 2010) e defeitos de migração neuronal (BILLECI et al., 2012; GRABRUCKER, 2012; ROSSIGNOL e FRYE, 2012).

Em publicação de Bauman e Kemper (2005), estes autores também relatam a ocorrência de uma significativa diminuição no número de células de Purkinje no cerebelo. A amígdala e as áreas pré-frontais são citadas, em outros trabalhos, como as regiões cerebrais com maior potencial de envolvimento, sendo a amígdala a estrutura com maior comprometimento em metade das crianças com autismo

(BUGALHO, CORREA e VIANA-BAPTISTA, 2006; SALMOND et al., 2003).

Outros autores sugerem que os comportamentos estereotipados e repetitivos típicos dos autistas são decorrentes de alterações no córtex orbito-frontal e núcleo caudado, assim como em regiões associadas ao distúrbio obsessivo-compulsivo (AMARAL, SCHUMANN e NORDAHL, 2008).

No trabalho publicado por Zilbovicius, Meresse e Boddaert (2006), as estruturas cerebrais relacionadas ao autismo incluem o cerebelo, a amígdala, o hipocampo, o corpo caloso e o cíngulo.

Em ressonância magnética com volumetria, foram observadas alterações principalmente no volume cerebral sugerindo que áreas, como giro cingulado, caudado, cerebelo, giro fusiforme, giro frontal superior e inferior, giro temporal superior, tálamo, ínsula e cortex occipital, apresentam aumento de substância cinzenta e redução de substância branca, o que pode justificar o déficit da conectividade entre as diferentes regiões (BONILHA et al., 2008; COURCHESNE e PIERCE, 2005).

As disfunções corticais presentes nas crianças com autismo, passaram a ser estudadas com o advento de técnicas funcionais como tomografia com emissão de pósitron (PET), tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) e ressonância magnética funcional (RMF) (BODDAERT e ZILBOVICIUS, 2002).

Alguns pesquisadores identificaram hipoperfusão da região temporal, incluindo giro temporal superior e sulco temporal superior, através de estudos de PET ou SPECT, o que sugerem uma conexão entre disfunção do lobo temporal, autismo e patologias do lobo temporal (YANG et al, 2011; OHNISHI et al., 2000; ZILBOVICIUS et al., 2000) com desorganização das redes corticais (BODDAERT e ZILBOVICIUS, 2002).

Tem sido também observado em autistas níveis elevados de serotonina nas plaquetas, sendo um fator neuroquímico consistente que pode explicar as dificuldades nas relações interpessoais e a apatia frente a estímulos (GADIA, TUCHMAN e ROTTA, 2004).

As funções executivas estão prejudicadas no autismo, causam dificuldades no planejamento e manutenção de um objetivo na execução de uma tarefa, podendo também gerar déficits no aprendizado por meio de *feedback* e uma falta de inibição de respostas irrelevantes e ineficientes (KLIN, 2006).

Essas funções executivas não são restritas apenas aos lobos frontais. Outras

estruturas apresentam uma ligação na execução dos comportamentos como o lobo parietal, que participa da atenção espacial, e o hipocampo, que pode ser visto como um sistema de coordenação executiva que liga representações através das áreas corticais. Alguns estudos evidenciam a cognição ligada ao cerebelo e núcleos da base, sendo possível haver formação em rede com o córtex pré-frontal (GAZZANIGA, IVRY e MANGUN, 2006).

1.2 Fatores de Risco e Transtornos do Espectro Autista

Os fatores de risco mais reconhecidos para o TEA são as exposições ambientais pré-natal e perinatal que possivelmente afetam a programação fetal, fatores genéticos. O ambiente pré-natal inclui o uso materno de medicamentos, infecção materna e inflamações - com mudanças em uma variedade de citocinas inflamatórias (ATLADÓTTIR et al., 2010; BERNARDI, KIRSTEN e TRINDADE, 2012; TCHACONAS e ADESMAN, 2013) e anticorpos que atravessam a placenta podendo afetar o encéfalo do feto - e exposição pré-natal ou perinatal a diversas substâncias como álcool e pesada poluição do ar, com especial relevância para a prematuridade e diabetes (ORNOY, WEINSTEIN-FUDIM e ERGAZ, 2016).

Em concordância com o acima exposto, são apontados produtos químicos ambientais (ácido valproico (VPA), talidomida, misoprostol, álcool, cocaína e metais tóxicos), por exposição a partículas em suspensão com poluição do ar de até 2,5 microm de diâmetro (PM 2,5), infecções maternas durante a gravidez (rubéola, citomegalovírus (CMV)), condição materna e fetal de inflamação (FOX et al., 2012) e doenças maternas como diabetes mellitus, doenças auto-imunes (BROWN et al., 2015) ou de doenças alérgicas, tais como asma (CROEN et al., 2005).

Fatores perinatais, como asfixia, restrição do crescimento intrauterino (RCIU), síndrome do desconforto respiratório (RDS) e outros, também são associados por alguns autores com um aumento da prevalência de TEA (GARDENER et al., 2011).

Contudo, de acordo com Yang e colaboradores (2011), apesar de diversas alterações terem sido associadas ao autismo, as anormalidades inflamatórias, neuroquímicas e de hipoperfusão neural parecem ser as mais consistentes.

Pesquisadores demonstraram neuroinflamação no encéfalo e líquido céfalo-raquidiano (LCR) de crianças com autismo, através de imunohistoquímica e ELISA, sendo observado em ambos, um nível consistente e significativamente maior de subconjuntos de citocinas quando comparado aos controles, com aumento

importante da citocina pró-inflamatória interleucina-6 (IL-6) no LCR, no giro médio-frontal e giro cingulado anterior (Figura 1), dentre outras (PARDO, VARGAS e ZIMMERMAN, 2005; VARGAS et al., 2005).

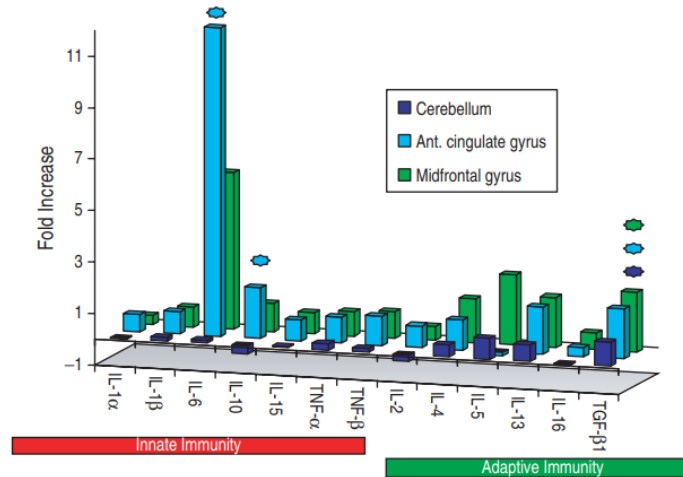


Figura 1. Perfil de citocinas em tecidos cerebrais de pacientes autistas, obtidos usando metodologia de matriz de proteína citocina. Curiosamente, um maior espectro de aumento de citocinas pró-inflamatórias e modulatórias foi observado no giro cingulado anterior, onde houve um aumento significativo na interleucina-6 (IL-6) (VARGAS et al., 2005).

Li e colaboradores (2009) também descreveram a atividade imunológica no cérebro de autistas com aumento das citocinas pró-inflamatórias e resultados semelhantes aos de Vargas et al., (2005).

As citocinas são proteínas que controlam a natureza, duração e intensidade de uma resposta imune, atuam como facilitadoras da comunicação entre os sistemas imune e neural, sendo que alguns autores relacionam as citocinas IL-1 β (interleucina 1 beta), IL-6 (interleucina 6), IL-4 (interleucina 4), IFN- γ (interferon gama) e TGF- β (fator de transformação do crescimento beta) ao TEA. São fontes primárias de citocinas células imunitárias, incluindo as células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, células T e células B, além de neurônios que produzem e respondem a elas as quais influenciam tanto o desenvolvimento quanto a função do sistema nervoso (DEVERMAN e PATTERSON, 2009).

A concentração de citocinas varia de acordo com o tempo, duração e intensidade da interação neuro-imunes, influenciando no desenvolvimento do encéfalo e sendo benéficas numa determinada concentração, enquanto prejudicial noutra. Influenciam em aspectos normais do neurodesenvolvimento, tais como a

diferenciação de células progenitoras, a localização celular / migração dentro do sistema nervoso, e a formação da rede sináptica (DEVERMAN e PATTERSON, 2009).

Algumas alterações imunes observadas em indivíduos autistas podem ter, como fatores subjacentes, alguns processos inflamatórios de longa duração, e são também propensos a sofrer de distúrbios gastrointestinais crônicos (HORNIG et al., 2008; PARRACHO et al., 2005; WANG, TANCREDI e THOMAS, 2011).

A ativação imune materna pode alterar o comportamento da prole, reduzir a sociabilidade e induzir a outros comportamentos relacionados ao autismo, o que foi demonstrado em estudos em camundongos (MALKOVA et al., 2012). Hsiao et al. (2012) observaram também, uma desregulação imune nestes animais.

Alguns trabalhos relatam que quando o fármaco anticonvulsivo, ácido valproico, é administrado a mulheres durante o primeiro trimestre de gestação, elas são muito mais propensas a ter crianças com TEA e deficiência intelectual (MOORE et al., 2000; RASALAM et al., 2005).

Esta droga é usada contra vários tipos de epilepsia e como um estabilizador do humor. Uma das suas ações é o aumento no nível do ácido gama-aminobutírico (GABA) no cérebro (CHEH et al., 2006).

Segundo Alsdorf e Wyszynski (2005), o VPA pode produzir efeito teratogênico se administrado em grandes doses únicas, causando altos níveis de pico no soro fetal, resultando em potenciais efeitos deletérios, como anormalidades comportamentais e alterações em órgãos dos sistemas respiratório, cardiovascular, geniturinário, gastrintestinal, endócrino e esquelético.

1.3 Modelo experimental do ácido valproico (VPA) para investigação das bases celulares e moleculares do autismo

Um modelo animal, para atingir seus objetivos como um modelo adequado para determinada pesquisa, deve se qualificar em vários critérios, como os de validade de constructo, validade de face e validade preditiva (NESTLER e HYMAN, 2010).

O VPA induz ao TEA tanto em humanos como em outros mamíferos, essa equivalência etiológica, que pode ser por mecanismos diversos, em grupos diferentes, constitui a validade de constructo. A validade de face irá avaliar se há dados correspondentes, nos modelos não humanos, com os fenótipos e marcadores

biológicos do TEA em humanos. Ao passo que, a validade preditiva avalia a resposta do modelo não humano ao tratamento, com a identificação de fármacos benéficos para a saúde humana, com o objetivo de avaliar a sua semelhança com a resposta no ser humano (MABUNGA et al., 2015).

Roulet, Lai e Foster (2013) relataram outros quatro fatores como componentes essenciais do modelo animal exposto intra-utero ao VPA, após extensa revisão de estudos clínicos, ou seja, dose, frequência de exposição, janela de tempo de tratamento e diferenças de gênero.

Num trabalho de revisão, foi delineada a evidência epidemiológica que liga VPA ao TEA. Nesse estudo foi descrito como a exposição pré-natal ao VPA poderia levar ao crescimento acelerado ou precoce do encéfalo e ao desenvolvimento de neurônios hiperexcitáveis (CHOMIAK, TURNER e HU, 2013).

Em trabalho publicado por Moore et al. (2000), foram observadas evidências clínicas que também associaram a exposição pré-natal ao fármaco anti-epiléptico VPA a uma elevada incidência de autismo. Crianças pré-expostas ao VPA mostraram déficits nas interações sociais e habilidades de comunicação.

Posteriormente, diferentes estudos destacaram que a exposição pré-natal a 600 mg/kg de VPA no dia 12,5 de gestação (DG) produz redução da sociabilidade em modelos murinos (KIM et al., 2011; SCHNEIDER e PRZEWLOCKI, 2005; WAGNER et al., 2006).

A exposição de ratas prenhas ao ácido valproico no nono dia gestacional parece afetar a migração de neurônios como os serotoninérgicos ou, no 12º dia de gestação, pode afetar a diferenciação neural, sem produzir anormalidades neuroanatômicas; no entanto os filhotes apresentam distúrbios comportamentais, como o aumento de tempo gasto em atividades estereotipadas semelhantes aos pacientes autistas (SCHNEIDER, 2006).

Segundo os achados de Schneider et al., (2008), as funções comportamentais, imunológicas e endócrinas no autismo estão relacionadas ao gênero e durante o desenvolvimento precoce do encéfalo, machos e fêmeas respondem de forma diferente a agentes teratogênicos e substâncias tóxicas. Ohkawara et al., (2015), também identificaram que a taxa de TEA é muito maior entre os machos.

Outros pesquisadores também observaram essa diferença de gênero em modelo murino, onde progenias masculinas e femininas de mães injetadas durante a

meia-gestação com lipopolissacarídeo (LPS) ou com ácido poliinosínico-policitídílico (Poli I:C), que é um RNA de dupla fita e que simula uma infecção viral, exibiram comportamentos díspares em testes de atividade motora, interações sociais e comportamentos repetitivos ou estereotipados, ou seja, a ativação imunológica materna induziu comportamentos estereotipados e repetitivos na prole masculina e não na feminina (XUAN e HAMPSON, 2014).

1.4 Inflamação e autismo

Processos inflamatórios periférico e cerebral têm sido associados ao autismo (DEPINO, 2013; ONORE, CAREAGA e ASHWOOD, 2012; PATTERSON, 2011). Segundo Malik et al. (2011), estas alterações imunes não se restringem ao período perinatal, mas parecem persistir ao longo da vida. As células mononucleares do sangue periférico e os linfoblastos de crianças autistas segregam maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias, particularmente Interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).

Análises pós-mortem demonstraram também, que indivíduos com TEA apresentam neuroinflamação em várias regiões do cérebro (VARGAS et al., 2005) e que o transcriptoma neocortical de autistas reflete uma forte resposta imune (GARBETT et al., 2008).

As citocinas modulam a função neuronal e o comportamento normais (YIRMIYA e GOSHEN, 2011) e a comunicação entre o sistema imunológico e o encéfalo é essencial para que as respostas fisiológicas e comportamentais sejam apropriadas à infecção (MCCUSKER e KELLEY, 2013).

O comportamento neuropatológico observado no autismo pode ser mediado pela ativação imunológica materna e desregulação de citocinas (ORNOY, WEINSTEIN-FUDIM e ERGAZ., 2015).

Em um processo infeccioso as citocinas medeiam alterações neurológicas associadas com comportamento doente sinalizando diretamente para o hipotálamo (DANTZER, 2001; SKURLOVA, STOFKOVA e JURCOVICOVA, 2006). Além disso, novos estudos evidenciaram funções neurológicas de alta hierarquia para as citocinas, incluindo a cognição e memória (MCAFOOSE E BAUNE, 2009; DERECKI et al., 2010).

Segundo Bhat e Steimann (2009), a inflamação cerebral não é necessariamente uma consequência de uma infecção por agente externo, podendo

ocorrer como uma resposta à produção de agentes neurotóxicos endógenos, ou alteração de rotas oxidativas.

Há diversos relatos de desequilíbrios de citocinas em TEA, os quais poderiam ter um papel patogênico ou serem marcadores de influências genéticas e ambientais subjacentes, sendo possível que a desregulação de citocinas contribua diretamente para a disfunção neural em TEA. O sistema imunológico pode fornecer dados importantes sobre as interações ambientais podendo justificar a fisiopatologia do TEA (GOINES e ASHWOOD, 2013).

Numa revisão de estudos em diferentes modelos animais publicados até 2010, foi observado que a ocorrência da ativação imune pré-natal materna estava associada com a mudança em várias interleucinas no cérebro fetal, principalmente em interleucina 1 (IL-1), IL-6 e TNF- α , com níveis alterados para mais ou para menos, dependendo do período gestacional de aplicação do imunógeno e do tempo de evolução (BOKSA, 2010).

Níveis de proteína quimiotática de monócitos - 1 (MCP-1), que parece ter importante papel na maturação das células de Purkinje no cerebelo e serve como marcador útil para o desenvolvimento neuronal anormal, foram significativamente elevados, quando comparados com controles, em líquido amniótico e ou sangue de gestantes triadas entre 1980 e 2004 e que tiveram filhos com TEA (ABDALLAH et al., 2012; ABDALLAH et al., 2013).

Estes autores, utilizando o mesmo coorte, em estudo do líquido amniótico evidenciaram aumento significativo dos níveis de IL-4, IL-10, TNF- α e de fator de necrose tumoral beta (TNF- β), quando comparado com os controles.

Braunschweig et al (2008) encontraram reatividade a duas bandas proteicas contra o cérebro fetal em aproximadamente 73 kilodalton (kDa) e 37 kDa no plasma de 7 de 61 mães de crianças autistas (11,5%), o que não foi encontrado nos controles, sugerindo uma associação entre o sistema imunológico materno e distúrbios comportamentais.

Isto ocorreria pelo fato de que juntamente com os anticorpos imunoglobulina G (IgG) que são imunoprotetores, os auto-anticorpos que reagem às proteínas "auto" do feto também podem atravessar a placenta. Portanto, a presença de anticorpos específicos contra proteínas cerebrais fetais na circulação de mães durante a gravidez pode intervir sobre o neurodesenvolvimento e produzir o transtorno do espectro do autismo.

Para elucidar a associação entre infecção materna e TEA, foram realizados estudos *in vitro* com análise do papel da resposta imune materna à infecção viral por *influenza* na determinação de lesões fetais cerebrais com risco de distúrbios neurológicos no adulto. Dessa forma, demonstraram que as respostas imunitárias humorais e/ou celulares após a infecção por influenza A subtipo H1N1 em seres humanos, tinham o potencial de reação cruzada com moléculas orientadoras de axônio (LUCCHESI, CAPONE e KANDUC, 2014).

Outros autores utilizaram, em um modelo murino, lipopolissacarídeos (LPS) intraperitoneais, de *Escherichia coli*, mostrando que a sinalização inflamatória leve por ação de citocinas era suficiente para provocar vasodilatação, hemorragia e necrose tecidual na placenta. Além disso, foi observado no córtex em desenvolvimento, uma hipoperfusão do feto e redução no índice mitótico das células progenitoras neurais (CARPENTIER, DINGMAN e PALMER, 2011).

1.5 Alterações hipocampais no autismo

Em trabalho recente, foi evidenciada ativação glial de longa duração no hipocampo e no cerebelo, e resposta exacerbada ao estímulo inflamatório em animais expostos ao VPA no período pré-natal. Foi mostrado, ainda, que esses animais apresentam redução da interação social e aumento do comportamento ansioso no labirinto em cruz elevado (LUCCHINA e DEPINO, 2014).

Na revisão de estudos de Boksa (2010) de trabalhos em diferentes modelos animais, foi observado ativação imune pré-natal materna associada com mudança em interleucinas no cérebro fetal, como as IL-1, IL-6 e TNF- α , além de alterações morfológicas em diversas áreas do sistema nervoso central (SNC), principalmente em hipocampo e córtex cerebral.

Ohkawara et al. (2015), constataram uma diminuição significativa nos níveis de serotonina do hipocampo na descendência de adultos murinos, após o uso do sistema ácido poliribonucleotídico: poliribocitídico (poli I:C).

Neste trabalho, foi identificado ainda, a expressão aumentada de genes de citocinas, como interferon- γ (IFN- γ), IL-1 β , IL-6 e TNF- α , além de ativação de micróglias e astrócitos em cérebros pós-morte de indivíduos com TEA em idade infantil e adulto e elevação dos níveis de citocinas no líquido cefalorraquidiano de autistas infantis.

1.6 Alterações microgliais no autismo

Durante o desenvolvimento cerebral, as micróglia podem ter ações diversas, inclusive atuar na formação das sinapses, na imunidade inata e na proliferação de células-tronco, sendo que a disfunção microglial pode acarretar grandes prejuízos para o desenvolvimento neural, como ocorre no TEA. Elucidações sobre as respostas microgliais, frente a agressões, pode ajudar no estabelecimento de uma intervenção terapêutica mais apropriada para indivíduos com TEA (TAKANO, 2015).

Outros autores também reforçam a importância da micróglia para o desenvolvimento de circuitos neurais funcionais, no momento em que estas células são responsáveis pela poda sináptica adequada (Figura 2). Desta forma, a disfunção microglial pode estar relacionada à patogênese do TEA por meio da poda sináptica atenuada ou excessiva levando ao desequilíbrio excitatório/inibitório (E/I) das sinapses (KOYAMA e IKEGAYA, 2015).

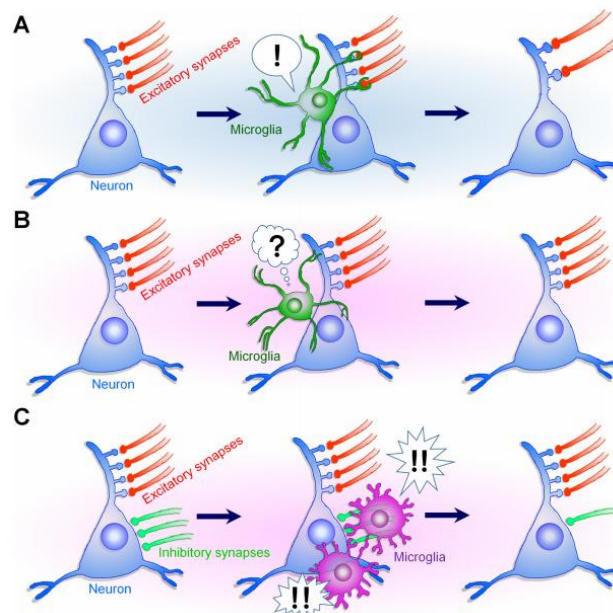


Figura 2. Diagramas esquemáticos mostrando o possível envolvimento da microglia no desequilíbrio E/I no TEA. (A) No cérebro em desenvolvimento saudável, em primeiro lugar, um número excessivo de sinapses excitatórias imaturas é formado. Em segundo lugar, sinapses inapropriadas ou menos ativas são podadas pela microglia. Finalmente, fortes sinapses maduras são mantidas. (B) hipótese 1: No cérebro do TEA, a microglia pode falhar em detectar sinapses inapropriadas ou menos ativas, o que resulta na manutenção do excesso de sinapses excitatórias. As sinapses excitatórias mantidas podem ser imaturas e maduras. (C) Hipótese 2: No cérebro do TEA, a microglia pode ser ativada demais. Seria interessante se houvesse mecanismos pelos quais a microglia excessivamente ativada podasse seletivamente as sinapses inibitórias (KOYAMA e IKEGAYA, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1- Geral:

Analisar as alterações comportamentais e a concentração de citocinas pró-inflamatórias no sangue periférico em modelo murino de transtorno do espectro autista induzido pelo ácido valproico no período gestacional.

2.2- Específicos:

2.2.1- Comparar o desempenho em testes comportamentais - Campo Aberto (CA), Memória Episódica (ME), *Burrowing* e Labirinto em Cruz Elevado (LCE) - de camundongos expostos ou não ao ácido valproico durante a gravidez, criados em ambientes diferentes (enriquecidos e empobrecidos), medindo a atividade exploratória sensorial, locomotora e testando o reconhecimento de objeto e memória integrativa.

2.2.2- Investigar potenciais mudanças na concentração de citocinas pró-inflamatórias - IL-1 β , IL-6, TNF e IFN- γ - através da sua dosagem no sangue desses camundongos.

2.2.3- Testar a hipótese de que camundongos prenhes expostas ao ácido valproico alterariam o repertório inato de filhotes BALB/c na exploração e na avaliação do risco ao explorar novos ambientes na idade adulta, e que o enriquecimento ambiental reduziria as mudanças comportamentais e as alterações periféricas associadas às alterações na concentração de citocinas pró-inflamatórias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e grupos experimentais

Camundongos (*Mus musculus*) adultos, linhagem BALB/c, isogênicos (oito machos e trinta e duas fêmeas), foram obtidos do biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC) e manipulados em conformidade com os “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH). Separou-se quatro fêmeas nulíparas, com 6 a 8 semanas de idade, para cada macho para acasalamento - CEUA/UFPA nº 6621140217 (23/03/2017).

As fêmeas eram observadas toda manhã para detecção da presença de *plug* ou tampão vaginal (Figura 3), sendo o dia da observação deste tampão considerado o 0,5º dia de gestação. Todas as fêmeas evidenciando este *plug* foram transferidas em isolamento para a sua própria gaiola.

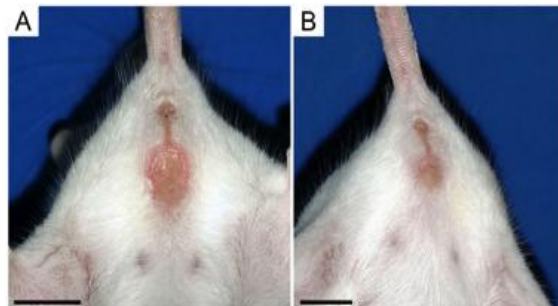


Figura 3. (A) Plug vaginal presente. (B) Ausência de plug. Escala A e B: 1 cm.

Foi administrada por gavagem, dose única de solução oral de valproato de sódio (VPA) na apresentação de 200 mg/kg e posologia de 600 mg/kg, dissolvido em salina até o volume de 0,2 mL, no dia 12,5 de concepção. As fêmeas do grupo controle (Ctrl) receberam o mesmo volume de soro fisiológico no mesmo período.

Esta posologia induz características do TEA na prole (FAVRE et al., 2013; BANERJEE et al., 2014; KIM et al., 2011; LUCCHINA e DEPINO, 2014; KAZLAUSKAS et al., 2016), sendo que as vias afetadas pelo VPA e seu suposto mecanismo incluem estresse oxidativo, inibição da histona desacetilase, desequilíbrio excitatório / inibitório e hiperserotonemia (MABUNGA et al., 2015).

O dia do parto foi considerado como dia zero pós-natal. As fêmeas eram alojadas individualmente para criarem suas próprias ninhadas e as proles desmamadas no dia 21 pós-natal. Os pertencentes ao mesmo grupo de tratamento foram misturados ao desmame, sendo que camundongos de cada sexo eram

alojados separadamente e mantidos num ciclo de 12 h de claro / escuro. Durante todo o experimento, os camundongos receberam comida e água *ad libitum*.

Quatro grupos independentes, da prole de 58 machos (VPA/AE: 17 camundongos; VPA/AP: 15 camundongos; Ctrl/AE: 16 camundongos; Ctrl/AP: 10 camundongos) foram usados para o experimento. O primeiro e segundo grupos foram de camundongos expostos ao ácido valproico no período pré-natal. Eles foram acomodados tanto no ambiente empobrecido de uma gaiola de laboratório padrão (AP - limitado à interação social), quanto em uma gaiola com ambiente enriquecido (AE) com múltiplos estímulos sensoriais e rodas de corrida, além da interação social.

Camundongos nascidos dos grupos de fêmeas controle foram acomodados de forma semelhante no AP ou em uma gaiola de AE. Os 4 grupos passaram por testes comportamentais aos 5 meses de vida, os quais foram conduzidos na mesma sequência (Campo Aberto, Memória Episódica, *Burrowing* e Labirinto em Cruz Elevado) em todos os animais.

3.2 Alojamentos dos grupos experimentais

As gaiolas para manutenção dos animais do ambiente enriquecido (Figura 4) foram montadas com vergalhões de ferro e arame, com dois andares, medindo 100 cm x 50 cm x 100 cm e com brinquedos feitos de diferentes formas e tamanhos, construídos de material plástico, madeira e metal, de cores diferentes como rodinhas de correr, escadas, cilindros, bolinhas, entre outros, que eram substituídos ou trocados de lugar periodicamente em intervalos de 15 dias.

Dentro dessas gaiolas incluímos uma segunda caixa de plástico contendo forro de palha de arroz para descanso. Cada gaiola de ambiente enriquecido alojou até 20 camundongos. Água e comida eram oferecidas em andares diferentes (superior e inferior), obrigando o deslocamento sistemático para sua obtenção.

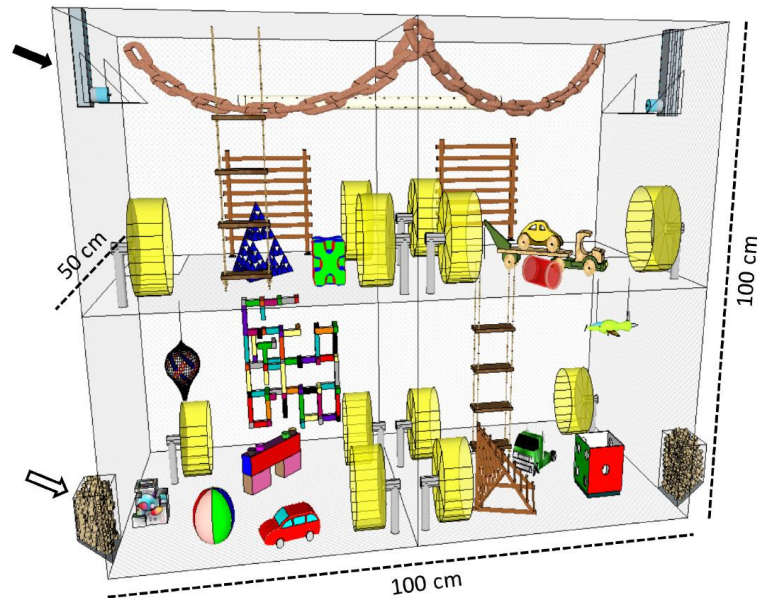


Figura 4. Ambiente enriquecido com múltiplos estímulos sensoriais e motores, além da interação social. A seta preta indica o local da água no andar superior e a seta branca indica o local da ração, o que obriga o deslocamento sistemático para aquisição de água e alimento.

Os animais do ambiente padrão foram alojados em gaiolas de plástico com 32 cm x 39 cm x 16,5 cm contendo apenas revestimento de palha de arroz, alojando até 10 camundongos cada (Figura 5).



Figura 5: Ambiente empobrecido apenas com a interação social (32 cm x 39 cm x 16,5 cm), escala de 4 cm.

3.3 Testes comportamentais

Os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais (Figura 6) de Campo aberto, *Burrowing* e Labirinto em Cruz Elevado, aos 5 meses de idade, para medir atividade exploratória sensorial e locomotora, além de registrar possíveis mudanças na maneira de explorar novos ambientes e avaliar o risco. Realizaram também o teste de Memória Episódica para testar o reconhecimento de objeto e memória integrativa (Quadro 1).

TESTES COMPORTAMENTAIS	OBJETIVOS	DESCRIÇÃO
CAMPO ABERTO	Analisar atividade exploratória sensorial e locomotora	Utilizou-se uma caixa de madeira (30 cm x 30 cm x 40 cm) e uma câmera de vídeo ligada a um computador e fixada 2 metros acima do campo aberto para gravar cada sessão de treinamento para posterior análise com o <i>software AnyMaze (Stoelting)</i> . Cada animal foi colocado no centro da arena e mantido no aparelho durante 3 minutos, semelhante ao anteriormente descrito por Kinoshita et al. (2009). Foram analisadas as variáveis: distância percorrida (m), linhas cruzadas (n°), tempo imóvel (s), tempo no centro (s) e tempo na periferia (s) do aparato.
MEMÓRIA EPISÓDICA	Testar o reconhecimento de objeto, memória integrativa (o que? onde? quando?)	Utilizou-se uma caixa de madeira (30 cm x 30 cm x 40 cm) e uma câmera de vídeo ligada a um computador. Esse teste consistiu de três sessões: duas sessões de exposição aos objetos, de 5 minutos de duração, com intervalos de 50 minutos entre elas e uma de teste. Na 1ª sessão, quatro objetos idênticos foram apresentados. Na 2ª sessão, mais quatro objetos idênticos mas diferentes dos da 1ª sessão foram apresentados. Na 3ª sessão, que é a de teste, dois objetos da 1ª sessão (objetos “antigos”) e dois objetos da 2ª sessão (objetos “recentes”) foram apresentados. Além disso, um objeto da 1ª sessão foi deslocado para uma nova posição (objetos “deslocados”), porém os objetos da 2ª sessão permaneceram nos lugares originais (objetos “estacionários”).
BURROWING	Analisar atividade exploratória sensorial e locomotora	O camundongo foi colocado em uma gaiola de plástico (32 cm x 39 cm x 16,5 cm) contendo um tubo de Policloreto de Vinila (PVC) (18 cm de comprimento x 7,5 cm de diâmetro) com 100g da ração normal (pellets). Esse tubo apresentava uma extremidade aberta e elevada a 3 cm do chão permitindo que o camundongo em teste removesse a ração para fora do tubo. Após o período de 2 horas de teste, a ração remanescente no tubo foi pesada para o registro da quantidade de material deslocado do tubo.
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	Analisar atividade exploratória sensorial e locomotora	Constituído por 2 braços abertos e 2 fechados (50 cm x 10 cm) colocados em posições ortogonais entre si e 1 plataforma central (10 cm x 10 cm). Os braços fechados com paredes de 40 cm de altura e os braços abertos sem paredes. O animal foi colocado na plataforma central do LCE, solto com a face virada para um dos braços abertos permitindo-se a exploração do ambiente por 3 minutos. Cada animal realizou uma sessão de teste em um dia. As imagens de cada treino foram capturadas por uma câmera de vídeo instalada a 2 m de altura do LCE e conectada a um computador, com o objetivo de armazenar os testes para posterior análise. Foram analisadas as variáveis: distância percorrida, tempo imóvel, tempo no centro, tempo nos braços abertos e tempo nos braços fechados.

Quadro 1. Objetivos e descrição dos Testes Comportamentais de Campo aberto, Memória Episódica, *Burrowing* e Labirinto em Cruz Elevado, aos quais foram submetidos os camundongos dos 4 grupos experimentais (VPA/AE, VPA/AP, Controle/AE e Controle/AP) aos 5 meses de vida.

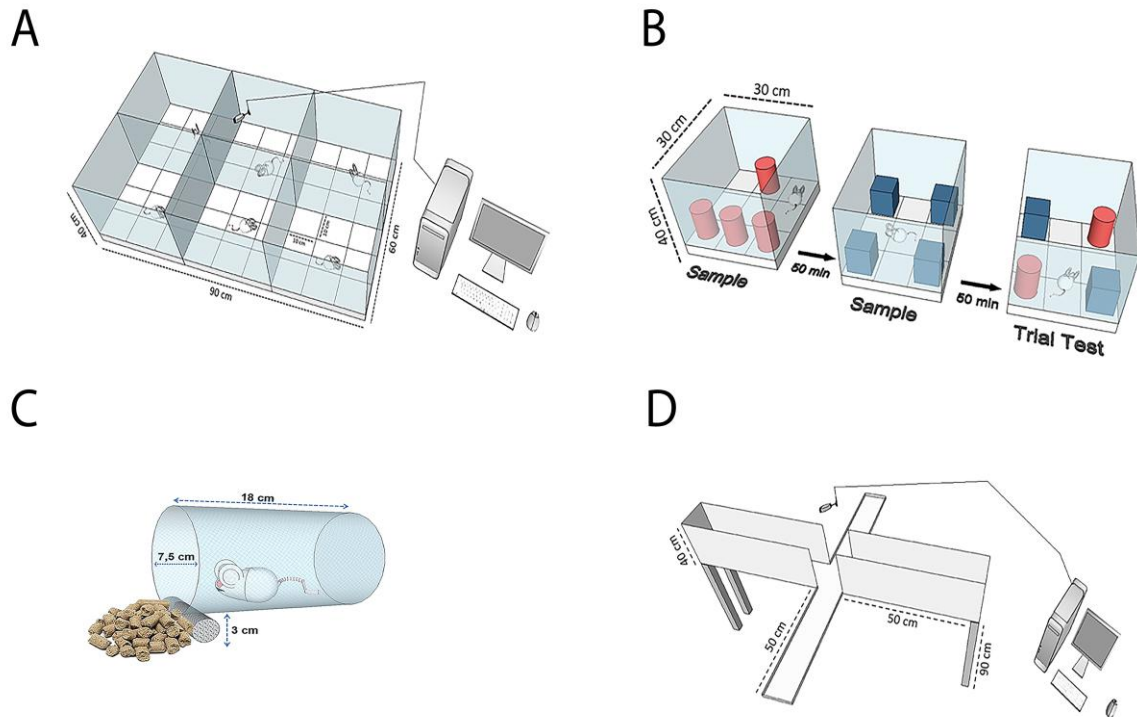


Figura 6. Ilustração dos aparatos dos testes comportamentais utilizados pelos 4 grupos experimentais (VPA/AE, VPA/AP, Controle/AE e Controle/AP) aos 5 meses de vida, os quais foram conduzidos na mesma sequência em todos os grupos do estudo: (A) Campo aberto, (B) Memória Episódica, (C) Burrowing e (D) Labirinto em Cruz Elevado.

3.4 Perfusões

No final dos testes comportamentais, todos os indivíduos foram pesados e anestesiados com Tribromoetanol/Avertina (0,15 ml/5g de peso corpóreo) via intraperitoneal no quadrante inferior direito do abdômen. Seguiu-se com coleta de amostra de sangue de cada animal, com perfusão imediata, via transcardíaca onde utilizou-se solução salina 0,9% heparinizada, por 10 minutos, seguido por paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PB 0,1M / pH 7,2-7,4) por 30 minutos.

Posteriormente realizou-se as craniotomias para retirada dos encéfalos que foram colocados no mesmo fixador e passaram por seccionamentos em série no plano axial, em vibrátomo com 100 μ m de espessura, sendo os cortes coletados serialmente, um em cada 4 seções para estudos futuros de células microgliais (Figura 7), imunomarcadas com anti-Iba1 (Quadro 2).

Anti-Iba1 (Wako)	
1ª Fase	
Ácido Bórico 0,2M / pH: 9 / 70° C	1h
Tris Salina Triton 5%	3x5'
Tris Salina 0,9%	3x2'
Caseína 10%	1h
Tris Salina 0,9%	3x2'
Anticorpo Primário ¹	72h
2ª Fase	
Tris Salina 0,9%	3x2'
Anticorpo Secundário ²	12h
3ª Fase	
Peróxido de Hidrogênio 0.3%	15'
Tris Salina 0,9%	3x2'
ABC	1h
Tris 0.1 M / pH: 7,2 – 7,4	3x2'
Tampão Acetato (pH: 6)	5'
GND (Níquel/ DAB) ³	4'
Glucose Oxidase (0.5 mg)	30'
Tris 0.1 M	3x2'
1: Código:019-19741 / Diluição 1:500	
2: Código: B1400 / Diluição 1:200	
3: Solução A: 0.25g Níquel + 5ml Tampão acetato	
3: Solução B: 0,006g DAB + 5ml dH2O	
3: 0,02g β-D-glucose + 0,004g cloreto de amônia	

Quadro 2. Imuno-histoquímica com Anti-Iba1, realizada em cortes cerebrais axiais com 100 µm de espessura e coletados serialmente, um em cada 4 secções para estudos futuros de células microgliais. Os camundongos foram escolhidos pelo resultado da média dos testes comportamentais de cada grupo analisado (VPA/AE, VPA/AP, Controle/AE e Controle/AP).

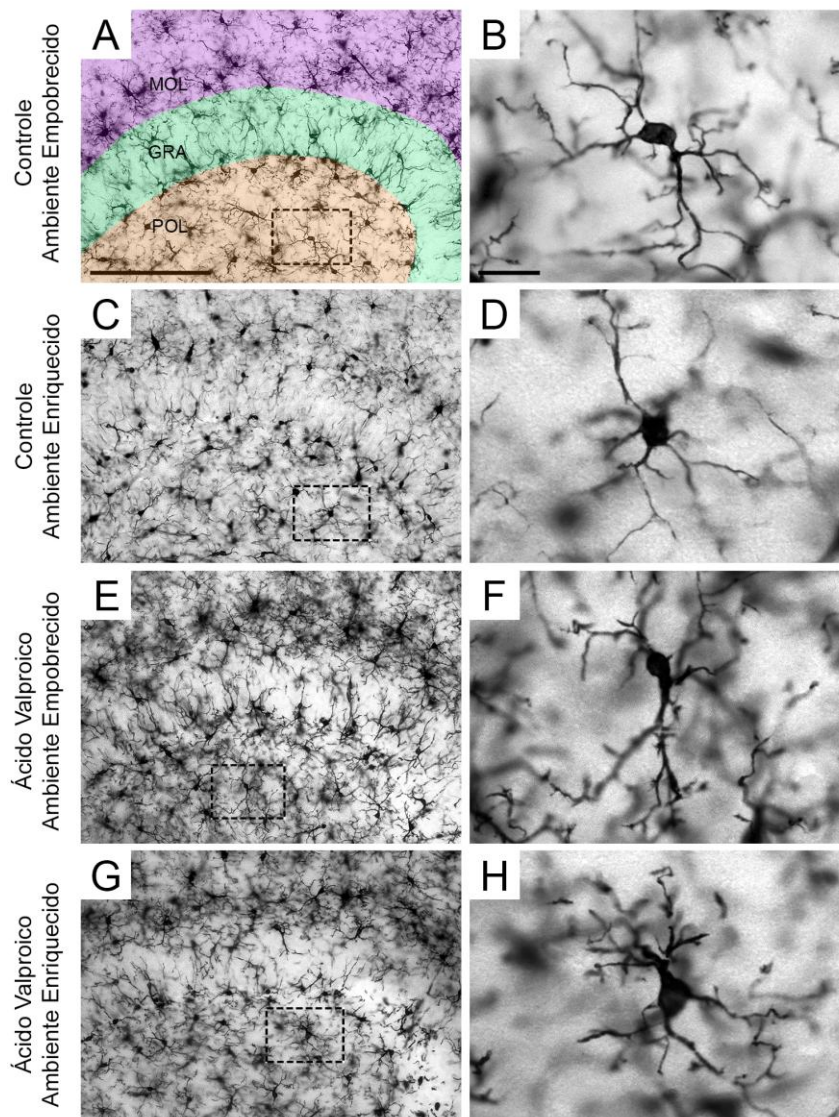


Figura 7. Imagens com aumento de 20X e 100X, de micróglia da camada polimórfica do Giro denteado, de camundongos escolhidos pelo resultado da média dos testes comportamentais de cada grupo analisado. (A), (C), (E) e (G) Escala de 250 μ m. (B), (D), (F) e (H) Escala de 25 μ m.

3.5 Citocinas

As concentrações séricas das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF e IFN- γ foram analisadas por citometria de fluxo no Instituto Evandro Chagas (IEC), utilizando-se o citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II - V96101338 com BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse IL-1 β Flex Set (Bead E5), BD™ Cytometric Bead Array Mouse IL-6 Flex Set (Bead B4), BD™ Cytometric Bead Array Mouse IFN- γ Flex Set (Bead A4) e BD™ Cytometric Bead Array Mouse TNF Flex Set (Bead C8). Todos os procedimentos e leituras dos resultados foram de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 Análises estatísticas

Todos os grupos foram comparados por meio de análises estatísticas paramétricas, two-way ANOVA, empregando-se posteriormente o Teste T ou Menn-Whitney quando pertinente (variâncias desiguais) e o Índice de Contraste, com diferenças entre os grupos aceitos como significativa a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

Testes *two-way* ANOVA revelaram influências significativas dos ambientes (ambiente empobrecido *versus* ambiente enriquecido) e condições experimentais (ácido valproico *versus* solução salina). Interações significativas entre essas variáveis também ocorreram e mudaram os resultados dos testes no Campo Aberto e no Labirinto em Cruz Elevado (Quadro 3).

Nos testes de *Burrowing* e Memória Episódica, assim como nas análises das citocinas TNF e IFN- γ , não houve resultados com significância estatística.

No Campo Aberto (Figura 8), a preferência natural dos camundongos pela periferia do aparelho foi modificada e isso ficou prontamente evidente pelas medidas do índice de contraste entre o tempo gasto na periferia e no centro do aparelho, conforme definido pela seguinte equação: $C = T_P - T_C / T_P + T_C$, onde C é contraste, T_P é o tempo gasto na periferia da arena e T_C é o tempo gasto no centro.

A partir desta equação, torna-se claro que os valores negativos de contraste revelam maior preferência pelo centro do aparelho, enquanto valores positivos indicam maior preferência pela periferia. Note que o centro e a periferia da arena têm áreas iguais. De fato, camundongos do grupo do VPA mantidos em ambiente enriquecido, em comparação com controles de ambiente similar, inverteram as preferências naturais esperadas, exibindo os seguintes valores médios de contraste e erros padrão: Ctrl/AE = $0,02 \pm 0,06$; Ctrl/AP = $0,05 \pm 0,08$; VPA/AE = $- 0,22 \pm 0,07$; VPA/AP = $- 0,03 \pm 0,05$; *two-way* ANOVA, $F(1, 43) = 4,72$, $p = 0,022$ (Figura 8A).

Em comparação com os grupos controle, Ctrl/AE ($36,62 \pm 4,51$) e Ctrl/AP ($36,08 \pm 4,85$), nos quais não houve diferenças significativas, o tempo de imobilidade dos grupos do ácido valproico foi significativamente influenciado pelo ambiente, VPA/AE = $62,03 \pm 8,78$ vs. VPA/AP = $34,25 \pm 5,98$, $p(A) = 0,049$ (Figura 8B).

Coerentemente, o valor médio da distância percorrida de VPA/AE = $5,58 \pm 0,59$, foi menor que o VPA/AP = $8,75 \pm 0,70$, *two-way* ANOVA, $F(1, 54) = 6,79$, $p = 0,01$ e meio ambiente e condição experimental mostraram interação significativa, *two-way* ANOVA, $F(1, 54) = 7,41$, $p = 0,009$ (Figura 8C).

Em consonância com esses achados, o número de linhas cruzadas foi significativamente menor no grupo tratado com ácido valproico mantido no AE = 79 ± 7 que no AP = 117 ± 8 linhas cruzadas, $F(1, 51) = 5,82$, $p = 0,02$ e neste caso, como previamente demonstrado para distância percorrida, ambiente e condição

experimental interagem e alteram os resultados, two-way ANOVA, $F(1, 51) = 8,26$, $p = 0,006$ (Figura 8D).

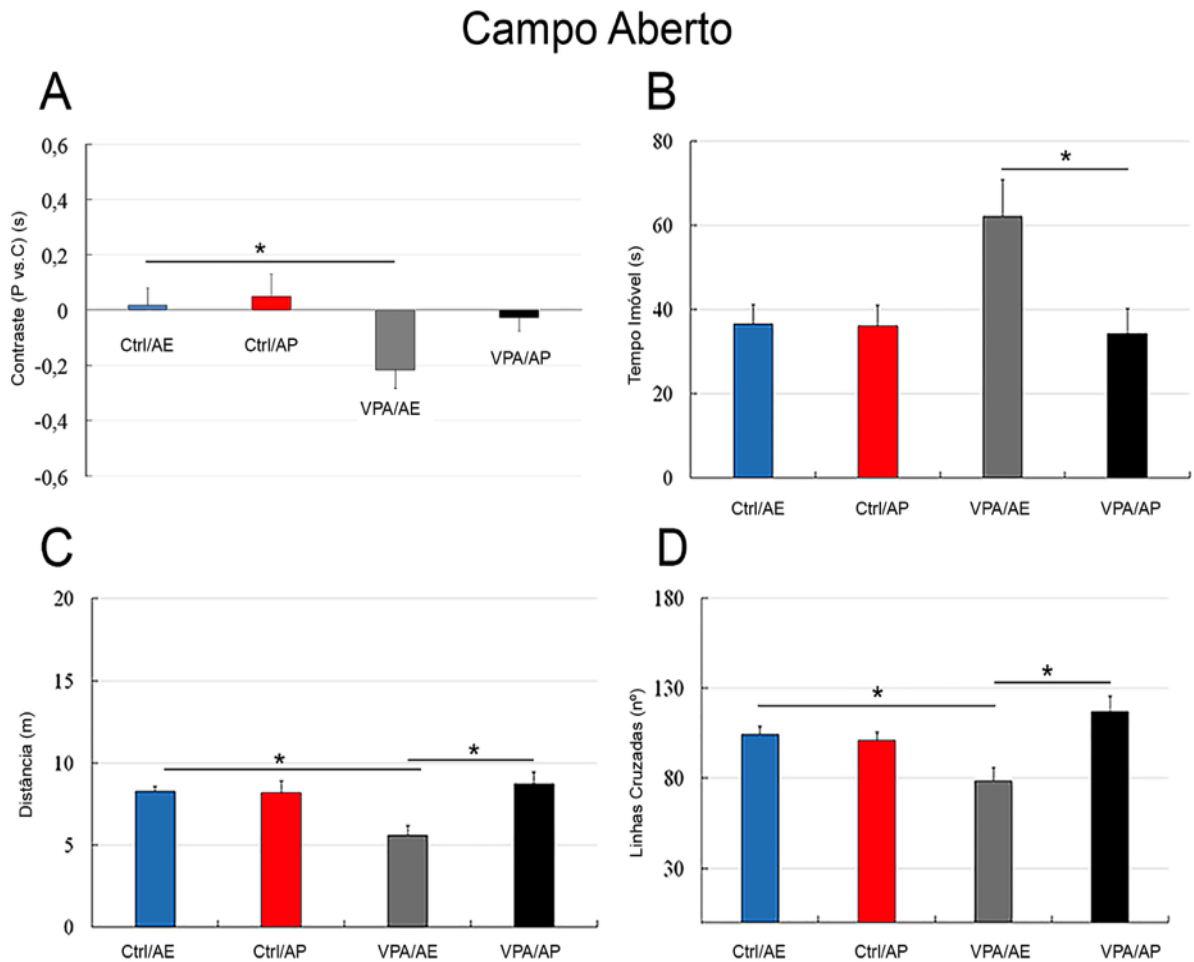


Figura 8. Alterações na atividade locomotora e exploratória de camundongos machos de 5 meses de idade em campo aberto, cujas mães receberam dose única de ácido valproico (600 mg/kg de peso corporal) diluída em 0,2mL de solução salina ou receberam volume igual de soro fisiológico por gavagem no dia 12,5 de gestação. (A) $C = (T_P - T_C) / (T_P + T_C)$, onde C é contraste, T_P é o tempo gasto na periferia e T_C é tempo gasto no centro da arena. Observe que a preferência natural dos camundongos pela periferia do aparelho foi invertida nos grupos ácido valproico. (B) Em comparação com todos os outros grupos, as alterações na imobilidade parecem ser limitadas ao grupo de camundongos de ácido valproico mantidos em ambiente enriquecido. Coerentemente este grupo apresentou redução significativa na distância percorrida (C) e no número de linhas cruzadas (D). Nível de significância de $p < 0,05$.

Da mesma forma, a exposição ao ácido valproico durante a gestação modificou os resultados comportamentais na tarefa no Labirinto em Cruz Elevado (Figura 9) do seguinte modo: preferência pelo braço fechado ou centro da plataforma, analisada pelo índice de contraste $C = T_{BF} - T_C / T_{BF} + T_C$, onde T_{BF} corresponde ao tempo gasto no braço fechado e T_C ao tempo gasto na plataforma central. O índice de contraste revelou que o grupo VPA/AP ($0,73 \pm 0,04$) apresentou

preferência muito maior pelo braço fechado do que o grupo Ctrl/AP ($0,55 \pm 0,04$), com interações significativas entre condição experimental e ambiente ($F(1, 49) = 4,28$, $p = 0,0438$) (Figura 9A).

Similarmente, o tempo gasto na plataforma central não mostrou diferenças significativas entre os grupos controle (Ctrl/AE = $26,34 \pm 4,08$; Ctrl/AP = $26,38 \pm 1,19$), mas um tempo significativamente maior foi gasto na plataforma central pelo grupo Ctrl/AP em relação ao VPA/AP (Ctrl/AP = $26,37 \pm 1,19$; VPA/AP = $16,6142 \pm 2,5347$) e foi decorrente da condição experimental ($F(1,51) = 7,57$; $p = 0,008$) (Figura 9B).

Em contraste, as diferenças significativas de imobilidade foram influenciadas apenas pelo ambiente ($p = 0,02$, $F(1, 53) = 5,771$), em que os animais do grupo Ctrl/AE = $66,9687 \pm 7,0006$ e VPA/AE = $63,33 \pm 10,5607$, passaram mais tempo imóveis que animais Ctrl/AP = $32,3444 \pm 3,7015$ e VPA/AP = $56,1 \pm 7,1396$ (Figura 9C).

Finalmente, o índice de contraste entre o tempo gasto nos braços fechados e o tempo gasto nos braços abertos, $C = T_{BF} - T_{BA} / T_{BF} + T_{BA}$, revelou interação significativa entre as variáveis ($p = 0,0037$, $F(1, 51) = 9,27$) e influência significativa do ambiente ($p = 0,037$, $F(1, 51) = 4,6$), em que os animais do grupo Ctrl/AE ($0,7474 \pm 0,0296$) apresentaram maior preferência pelos braços fechados em relação aos outros grupos (Ctrl/AP = $0,2422 \pm 0,1179$; VPA/AE = $0,26 \pm 0,12$; VPA/AP = $0,35 \pm 0,066$) (Figura 9D).

Labirinto em Cruz Elevado

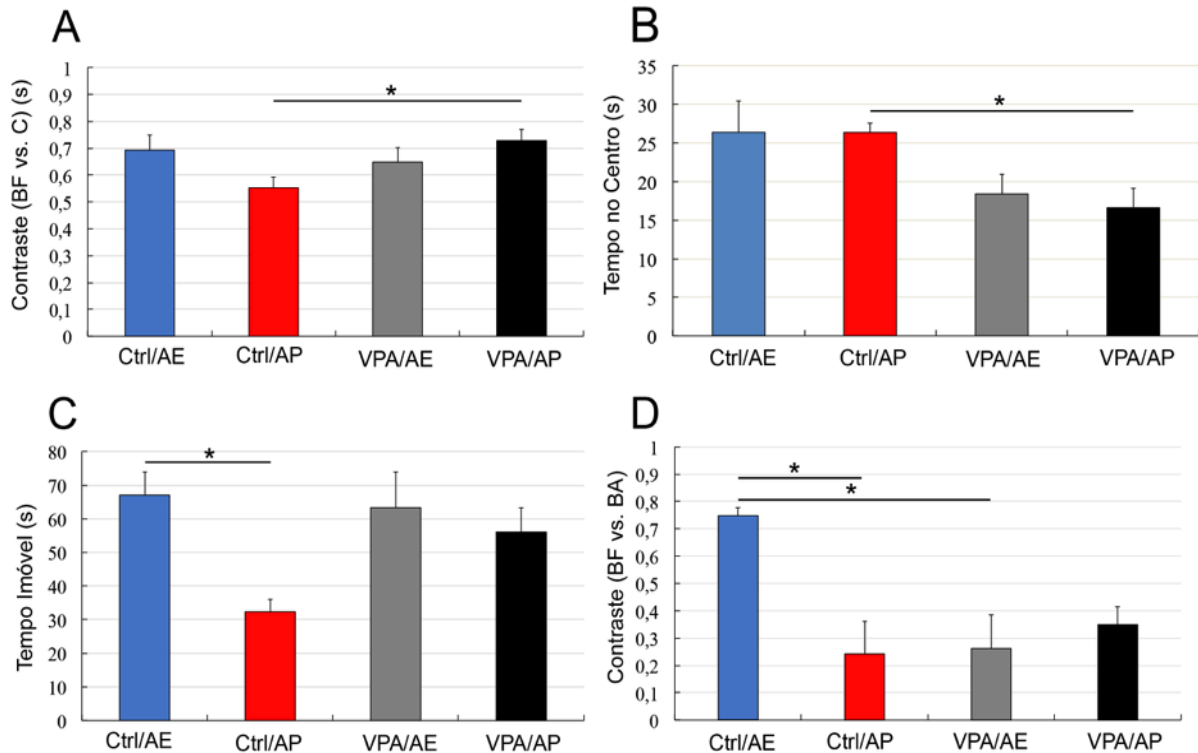


Figura 9. Alterações na atividade locomotora e exploratória de camundongos machos de 5 meses de idade no Labirinto em Cruz Elevado, cujas mães receberam dose única de ácido valpróico (600 mg/kg de peso corporal) diluída em 0,2mL de solução fisiológica ou igual volume de solução salina por gavagem, no dia 12.5 de gestação. (A) Observe que mudanças significativas nas preferências naturais para o braço fechado do labirinto em cruz elevado foram limitadas a um grupo de camundongos com ácido valpróico mantido no ambiente empobrecido de uma gaiola de laboratório padrão. (B) Coerentemente, em comparação com o grupo controle de ambiente correspondente, o tempo gasto na plataforma central nesse grupo diminuiu significativamente. (C) Diferenças significativas de imobilidade foram influenciadas apenas pelo ambiente, onde os animais do grupo Ctrl/AE passaram mais tempo imóveis que animais Ctrl/AP e (D) Índice de contraste entre o tempo gasto nos braços fechados e o tempo gasto nos braços abertos, $C = \frac{T_{BF} - T_{BA}}{T_{BF} + T_{BA}}$, revelou interação significativa entre as variáveis e influência significativa do ambiente, em que os animais do grupo Ctrl/AE apresentaram maior preferência pelos braços fechados em relação ao outros grupos. Nível de significância de $p < 0,05$.

Na Citometria de Fluxo (Figura 10), as concentrações periféricas de IL-1 β e IL-6 foram influenciadas pela condição experimental. IL-1 β ($p < 0,0001$, $F(1, 49) = 26,24$), na qual Ctrl/AE = $2,55 \pm 0,24$, Ctrl/AP = $2,52 \pm 0,49$ e VPA/AE = $1,05 \pm 0,28$, VPA/AP = $0,72 \pm 0,26$ picogramas/mL (Figura 8A); e IL-6 ($p = 0,0002$, $F(1, 46) = 16,96$) com VPA/AE = $9,22 \pm 0,94$, VPA/AP = $8,57 \pm 1,2$ e Ctrl/AE = $5,26 \pm 0,48$; Ctrl/AP = $5,07 \pm 0,57$ picogramas/mL (Figura 8B). Observar dados resumidos no Quadro 3.

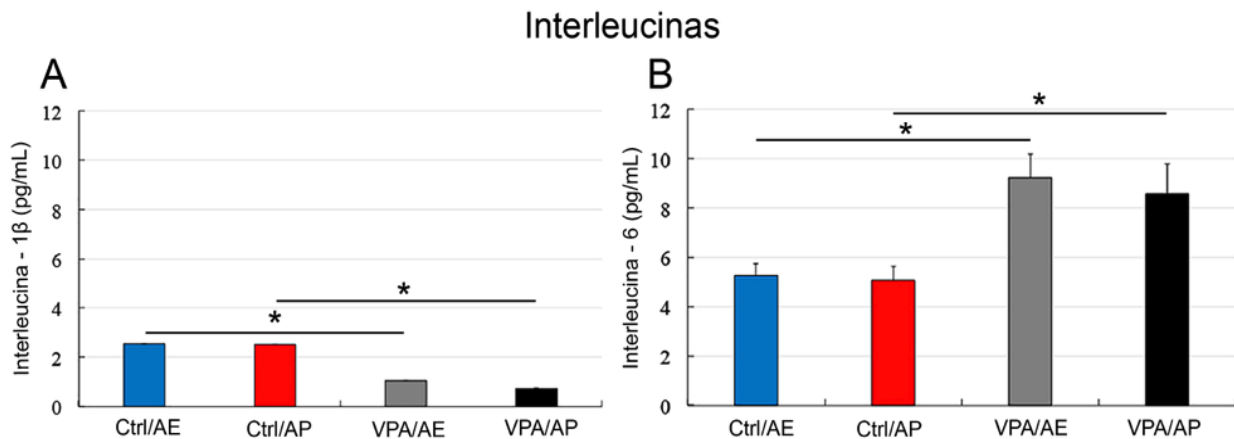


Figura 10. Alterações na concentração de IL-1 β e IL-6 em amostras de sangue periférico de camundongos machos com 5 meses de idade, cujas mães receberam dose única de ácido valprílico (600 mg/kg de peso corporal) diluída em 0,2mL de soro fisiológico, ou recebeu volume igual de soro fisiológico por gavagem, no dia 12.5 de gestação. Observe que os grupos de ácido valprílico, independentemente do ambiente onde viveram, (A) reduziram a concentração de IL-1 β e (B) aumentaram a concentração de IL-6. Nível de significância de $p < 0,05$.

Ao analisarmos os mapas de permanência registrados durante os testes comportamentais no Campo Aberto e no Labirinto em Cruz Elevado, podemos observar que os animais dos grupos controle permaneceram maior tempo na periferia do Campo Aberto, sendo significativa a preferência do grupo Ctrl/AE em relação ao grupo VPA/AE ($p(\text{CE}) = 0,021$ e $F(1, 54) = 5,59$), exibindo os seguintes valores médios de contraste e erros padrão: Ctrl/AE = $0,02 \pm 0,06$ e VPA/AE = $-0,22 \pm 0,07$.

Da mesma forma, no Labirinto em Cruz Elevado, os animais do grupo Ctrl/AE ($0,7474 \pm 0,0296$) apresentaram maior preferência pelos braços fechados (braços horizontais) em relação aos outros grupos (Ctrl/AP = $0,2422 \pm 0,1179$; VPA/AE = $0,26 \pm 0,12$; VPA/AP = $0,35 \pm 0,066$) com interação significativa entre as variáveis de ambiente e condição experimental ($p = 0,0037$, $F(1, 51) = 9,27$) e influência significativa entre os ambientes ($p = 0,037$, $F(1, 51) = 4,6$). Ver figura 11.

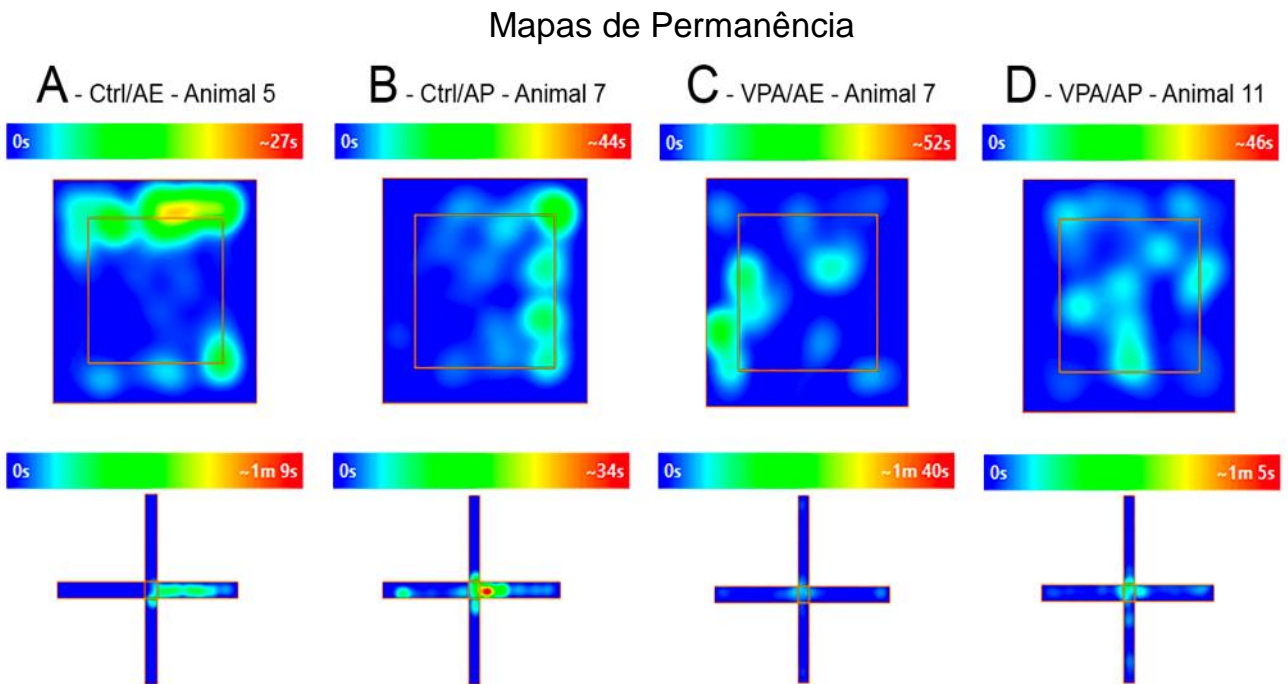


Figura 11. Mapas de permanência registrados durante os testes comportamentais de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado, de camundongos com 5 meses de idade, cujas mães receberam dose única de ácido valpróico (600 mg/kg de peso corporal) diluída em 0,2 mL de soro fisiológico, ou recebeu volume igual de soro fisiológico por gavagem, no dia 12.5 de gestação. No teste do Campo Aberto, observe que o camundongo médio do grupo controle do ambiente enriquecido (A) permanece maior tempo na periferia do aparato, enquanto o camundongo médio do grupo com ácido valpróico mantido no ambiente enriquecido inverteu a tendência natural pela periferia (C). No Labirinto em Cruz Elevado, (A) camundongo médio do grupo controle do ambiente enriquecido permaneceu mais tempo nos braços fechados (braços horizontais) que o do grupo ácido valpróico do ambiente equivalente (C). Nível de significância de $p < 0,05$.

Interleucinas		Labirinto em Cruz Elevado				Campo Aberto			
IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	Braço Fechado x Braço Aberto(s)	T Imóvel (s)	T Centro (s)	Braço Fechado x Centro (s)	Periferia x Centro (s)	Linhas Cruzadas (n ^o)	T Imóvel (s)	Distância Percorrida (m)
Ctrl/AP X VPA/AP 2.52 \pm 0.49 X 0.72 \pm 0.26 p(CE) < 0.0001 F (1, 49) = 26.24	Ctrl/AP X VPA/AP 5.07 \pm 0.57 X 8.57 \pm 1.2 p(CE) < 0.0002 F (1, 46) = 16.96	Ctrl/AE X VPA/AE 0.747 \pm 0.029 X 0.261 \pm 0.122 p(l) = 0.003 F (1, 51) = 9.27	Ctrl/AP X Ctrl/AE 32.344 \pm 3.701 X 66.968 \pm 7.000 p(A) = 0.019 F (1, 53) = 5.771	Ctrl/AP X VPA/AP 26.377 \pm 1.194 X 16.614 \pm 2.534 p(CE) = 0.008 F (1, 51) = 7.57	Ctrl/AP X VPA/AP 0.5532 \pm 0.0401 X 0.7285 \pm 0.0423 p(l) = 0.0438 F (1,49) = 4.281	Ctrl/AE X VPA/AE 0.016 \pm 0.061 X - 0.216 \pm 0.066 p(CE) = 0.021 F (1, 54) = 5.59	Ctrl/AE X VPA/AE 104.187 \pm 4.496 X 78.75 \pm 7.082 p(l) = 0.005 F (1, 51) = 8.258	VPA/AP X VPA/AE 34.246 \pm 5.979 X 62.029 \pm 8.778 p(A) = 0.049 F (1, 53) = 4.056	Ctrl/AE X VPA/AE 8.248 \pm 0.321 X 5.580 \pm 0.585 p(l) = 0.008 F (1, 54) = 7.411
Ctrl/AE X VPA/AE 2.55 \pm 0.24 X 1.05 \pm 0.28 p(CE) < 0.0001 F (1, 49) = 26.24	Ctrl/AE X VPA/AE 5.26 \pm 0.48 X 9.22 \pm 0.94 p(CE) = 0.0002 F (1, 46) = 16.96	Ctrl/AP X Ctrl/AE 0.242 \pm 0.117 X 0.747 \pm 0.029 p(A) = 0.036 F (1, 51) = 4.599	Não significativo	Não significativo	Não significativo	Não significativo	VPA/AP X VPA/AE 116.8 \pm 8.529 X 78.75 \pm 7.082 p(A) = 0.019 F (1, 51) = 5.825	Não significativo	VPA/AP X VPA/AE 8.747 \pm 0.697 X 5.580 \pm 0.585 p(A) = 0.011 F (1, 54) = 6.794

Quadro 3. Resultados da Citometria de fluxo de IL-1 β e IL-6 e dos Testes Comportamentais de Campo aberto e Labirinto em Cruz Elevado, aos quais foram submetidos os camundongos dos 4 grupos experimentais (VPA/AE, VPA/AP, Controle/AE e Controle/AP) aos 5 meses de vida. p(l)= Interação; p(A)=Ambiente; p(CE)=Condição Experimental.

5. DISCUSSÃO

O autismo é uma doença do desenvolvimento neural que permanece para toda vida e que em sua forma clássica em humanos, mostra déficits nos mecanismos de comunicação e padrões de movimentos repetitivos com variado comprometimento cognitivo (NICOLINI e FAHNESTOCK, 2018).

Embora o autismo tenha um forte componente genético, sabe-se que fatores ambientais, incluindo toxinas, pesticidas, infecções e drogas, conferem suscetibilidade ao autismo, provavelmente induzindo mudanças epigenéticas (NICOLINI e FAHNESTOCK, 2018). Em particular, a exposição ao ácido valproico (VPA) durante a gravidez demonstrou aumentar o risco de autismo em crianças (BROMLEY et al., 2008; NADEBAUM et al., 2011; SHALLCROSS et al., 2011). O ácido valproico é um ácido graxo de cadeia curta utilizado largamente como droga antiepiléptica (LÖSCHER, 2002) e estabilizador de humor (EMRICH et al., 1980).

De forma curiosa e interessante, roedores expostos durante a vida pré-natal ao ácido valproico mostram déficits comportamentais que mimetizam parte daqueles dos pacientes autistas, como a redução da atividade exploratória e locomotora (SCHNEIDER e PRZEWLOCKI, 2005; SCHNEIDER et al., 2006; SCHNEIDER et al., 2008; ROULLET et al., 2010; KATAOKA et al., 2013).

Assim, a utilização do ácido valproico durante a gravidez em roedores tem sido usado largamente como modelo para a condição humana. De fato, estudos em animais mostraram que a exposição de roedores in utero ao VPA representa um modelo robusto de autismo (NICOLINI e FAHNESTOCK, 2018).

No presente trabalho reproduzimos o modelo murino de autismo baseado na exposição durante a gravidez ao ácido valproico e testamos a hipótese de que uma única exposição ao ácido valproico durante a gravidez mudaria a forma de exploração que os camundongos adultos usam para acessar o risco em diferentes ambientes. Testamos igualmente a hipótese de que essas mudanças estariam associadas à concentração alterada de citocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea.

Nós encontramos que os camundongos BALB/c expostos ao ácido valproico durante a gravidez apresentaram mudanças significativas em seu comportamento exploratório de novos ambientes na vida adulta, e isso parece associado a alterações periféricas de citocinas pró-inflamatórias. Descobrimos também que os

estímulos somatossensoriais, motores e cognitivos do enriquecimento ambiental não foram suficientes para reverter as mudanças.

Vários estudos sugeriram uma desregulação imunológica como um possível mecanismo relacionado à patogênese e à gravidade do TEA, e um aumento nos níveis inflamatórios sistêmicos tem sido sugerido como o denominador comum (NICOLINI e FAHNESTOCK, 2018) de todo o espectro de distúrbios autistas.

Como estudos anteriores (KRAKOWIAK et al., 2017; MASI et al., 2017), um aumento significativo nos níveis de IL-6 no plasma de indivíduos com TEA foi observado aqui. Esses achados, associados a resultados comportamentais alterados nos testes LCE e CA, sugerem uma associação direta entre elevação da IL-6 e alterações comportamentais.

Por outro lado, encontramos em oposição ao previamente publicado (ASHWOOD et al., 2011), uma redução significativa no perfil de IL-1 β no modelo murino de autismo do presente estudo, que não está de acordo com vários estudos publicados anteriormente em que a IL-1 β é modulada para cima.

Contudo, numa revisão de estudos em diferentes modelos animais (BOKSA, 2010), foi observado a associação da ativação imune pré-natal maternal com a mudança em várias interleucinas no encéfalo fetal, principalmente em IL-1, IL-6 e TNF- α , com níveis alterados para mais ou para menos, dependendo do período gestacional de aplicação do imunógeno e do tempo de evolução.

Temos que ressaltar que resultados variáveis de citocinas plasmáticas já foram observados em estudos anteriores, sendo que essas divergências podem ser devidas a heterogeneidade fenotípica e neurobiológica no TEA, além de outros fatores influenciadores dos marcadores imunológicos, como uso de medicação, estabilidade dos marcadores ao longo do processo da doença e índice de massa corporal (IMC), que frequentemente não foram adequadamente considerados (GULOXSUZ et al., 2017).

Em concordância com Guloksuz et al. (2017), foi sugerido por Careaga et al. (2015) ser possível identificar subfenótipos imunes dentro da população de TEA. Esse resultado contraditório precisará de mais investigações e estudos longitudinais para melhores esclarecimentos.

Da mesma forma, descobrimos, em consonância com Yamaguchi et al. (2017), que o enriquecimento ambiental não foi suficiente para reverter completamente as anormalidades de comportamento associadas à tarefa de campo

aberto. De fato, a hipolocomoção (imobilidade) e a preferência alterada pela região central da arena aberta observada em grupos de ácido valproico não foram revertidas em camundongos VPA/AE.

6. CONCLUSÃO

Camundongos BALB/c expostos ao ácido valproico durante a gestação mostram mudanças significativas em seu comportamento - testes comportamentais no LCE e no CA - na vida adulta, e a estimulação somatossensorial e cognitiva do enriquecimento ambiental parece não ser suficiente para reverter esse comportamento alterado, nem para regular as concentrações de citocinas.

Está em curso a partir dos animais do presente trabalho em nosso laboratório, ensaios estereológicos e de reconstrução tridimensional para checar a hipótese de resposta inflamatória alterada potencialmente visível a partir da contagem e da morfologia da micróglia e dos astrócitos hipocampais. De fato, nós esperamos que maiores esclarecimentos sobre a provável fisiopatogenia das alterações descritas neste trabalho, possam ser alcançadas através da quantificação de células da glia e de reconstruções tridimensionais destas células em diferentes regiões do sistema nervoso central, mas particularmente no hipocampo ventral.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, M.W.; LARSEN, N.; GROVE, J.; NORGAARD-PEDERSEN, B.; THORSEN, P.; MORTENSEN, E.L. et al. Amniotic fluid chemokines and autism spectrum disorders: an exploratory study utilizing a danish historic birth cohort. **Brain, behavior, and immunity**. 26:170-6, 2012.
- ABDALLAH, M.W.; LARSEN, N.; GROVE, J.; NORGAARD-PEDERSEN, B.; THORSEN, P.; MORTENSEN, E.L. et al. Amniotic fluid inflammatory cytokines: potential markers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. **The world journal of biological psychiatry**.14:528-38, 2013.
- ADDM - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network. Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2010. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - 11 sites, United States, 2010. Morbidity and mortality weekly report surveillance summaries. 63:1-21, 2014.
- ALSDORF R., WYSZYNSKI D.F. Teratogenicity of sodium valproate. **Expert Opin Drug Saf**. 4(2):345-53. 2005.
- AMARAL, D.; SCHUMANN, C.; NORDAHL, C. Neuroanatomy of autism. **Trends Neurosci**. v.31, p.137-45, 2008.
- ATLADÓTTIR, H.O.; THORSEN, P.; OSTERGAARD, L.; SCHENDEL, D.E.; LEMCKE, S.; ABDALLAH, M. et al. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. **J Autism Dev Disord**. 40(12):1423-30. 2010.
- APA, American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5 Ed. (DSM – V). Washington, DC, p.9-50. 2013.
- ASHWOOD, P.; KRAKOWIAK, P.; HERTZ-PICCIOTTO, I.; HANSEN, R.; PESSAH, I.; VAN DE WATER, J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. **Brain Behav Immun**. 25(1): 40-45. 2011.
- BHAT, R.; STEIMANN, L. Innate and adaptive autoimmunity directed to the central nervous system. **Neuron**. 64, 123-132. 2009.
- BAUMAN, M. L.; KEMPER, T. L. Neuroanatomic observation of the brain in autism: a review and future directions. **Int J Dev Neurosci**. v.23, n.2-3, p.183-7, 2005.
- BANERJEE, A.; ENGINEER, C. T.; SAULS, B. L.; MORALES, A. A.; KILGARD, M. P.; PLOSKI, J. E. Abnormal emotional learning in a rat model of autism exposed to valproic acid *in utero*. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 8: 387. 2014.
- BERNARDI, M.M.; KIRSTEN, T.B.; TRINDADE, M.O. Sobre o autismo, neuroinflamação e modelos animais para o estudo de autismo: uma revisão. **Rev Neurocienc**. 20(1):117-27. 2012.

- BILLECI, L.; CALDERONI, S.; TOSETTI, M.; CATANI, M.; MURATORI, F. White matter connectivity in children with autism spectrum disorders: a tract-based spatial statistics study. **BMC Neurol.** 12:148. 2012.
- BODDAERT, N.; ZILBOVICIUS, M. Functional neuroimaging and childhood autism. **Pediatr Radiol.** 32(1):1-7. Jan., 2002.
- BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of 40 findings from animal models. **Brain, behavior, and immunity.** 24:881-97, 2010.
- BONILHA, L.; CENDES, F.; RORDEN, C.; ECKERT, M.; DALGALARRONDO, P.; LI, L.M. et al. Gray and white matter imbalance-typical structural abnormality underlying classic autism? **Brain Dev.** 30(6):396-401. Jun., 2008.
- BRAUNSCHWEIG, D.; ASHWOOD, P.; KRAKOWIAK, P.; HERTZ-PICCIOTTO, I.; HANSEN, R.; CROEN, L.A. et al. Autism: maternally derived antibodies specific for fetal brain proteins. **Neurotoxicology.** 29:226-31, 2008.
- BROMLEY, R. L. et al. Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. **Neurology**, v. 71, n. 23, p. 1923-4, Dec 2008.
- BROWN, A. S.; SURCEL, H. M.; HINKKA-YLI-SALOMAKI, S.; CHESLACK-POSTAVA, K.; BAO, Y.; SOURANDER, A. Maternal thyroid autoantibody and elevated risk of autism in a national birth cohort. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** 57, 86–92. 2015.
- BUGALHO, P.; CORREA, B.; VIANA-BAPTISTA, M. Papel do cerebelo nas funções cognitivas e comportamentais: bases científicas e modelos de estudo. **Acta médica portuguesa.** 19, p.257-268, 2006.
- CAREAGA, M. et al. Immune endophenotypes in children with autism spectrum disorder. **Biol Psychiatry.** 2015.
- CARPENTIER, P.A.; DINGMAN, A.L.; PALMER, T.D. Placental tnf-alpha signaling in illness-induced complications of pregnancy. **The American journal of pathology.** 178:2802-10, 2011.
- CDC. Centers for Disease Control Prevention. Prevalence of autism spectrum disorders – Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, United States, 2014.
- CHEH, M. A.; MILLONIG, J. H.; ROSELLI, L. M.; MING, X.; JACOBSEN, E.; KAMDAR, S. et al. En2 knockout mice display neurobehavioral and neurochemical alterations relevant to autism spectrum disorder. **Brain Research.** 1116, 166–176. 2006.
- CHOMIAK, T.; TURNER, N.; HU, B. What we have learned about autism spectrum disorder from valproic acid. **Patholog. Res Int.** 2013:712758. 2013.
- COURCHESNE, E.; PIERCE, K. Why the frontal cortex in autism might be talking

only to itself: local over-connectivity but long-distance disconnection. **Curr Opin Neurobiol.** 15(2):225-30. Abr. 2005.

CROEN, L. A.; GREETHER, J. K.; YOSHIDA, C. K.; ODOULI, R.; VAN DE WATER, J. Maternal autoimmune diseases, asthma and allergies, and childhood autism spectrum disorders: a case-control study. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.** 159, 151–157. 2005.

DANTZER R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? **Brain Behav Immun.** 15(1):7-24.Mar. 2001.

DEPINO, A.M. Peripheral and central inflammation in autism spectrum disorders. **Molecular and Cellular Neurosciences**, 53, 69–76. 2013.

DERECKI, N.C.; CARDANI, A.N.; YANG, C.H.; QUINNIES, K.M.; CRIHFIELD, A.; LYNCH, K.R.; KIPNIS, J. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. **J Exp Med.** 207(5):1067-80. Maio.2010.

DEVERMAN, B.E.; PATTERSON, P.H. Cytokines and CNS development. **Neuron.** 64(1):61-78. Oct. 2009.

ELSABBAGH, M.; DIVAN, G.; KOH, Y. J.; KIM, Y. S.; KAUCHALI, S.; MARCIN, C. et al. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. **Autism Res.** 5, 160–179. 2012.

EMRICH, H. M. et al. Effect of sodium valproate on mania. The GABA-hypothesis of affective disorders. **Arch Psychiatr Nervenkr (1970)**, v. 229, n. 1, p. 1-16, 1980.

FAVRE, M. R.; BARKAT, T. R.; LAMENDOLA, D.; KHAZEN, G.; MARKRAM, H., & MARKRAM, K. General developmental health in the VPA-rat model of autism. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 7: 88. 2013.

FOX, E.; AMARAL, D.; VAN DE WATER, J. Maternal and fetal antibrain antibodies in development and disease. **Dev. Neurobiol.** 72, 1327–1334. 2012.

GADIA, C. A.; TUCHMAN, R.; ROTTA, N. T. Autismo e doenças invasivas de desenvolvimento. **J. Pediatr.** v.80, n.2, p.83-94. 2004.

GARBETT, K.; EBERT, P.J.; MITCHELL, A.; LINTAS, C.; MANZI, B. et al. Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. **Neurobiology of Disease**, 30, 303–311. 2008.

GARDENER, H., SPIEGELMAN D., BUKA S. L. Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis. **Pediatrics.** 128, 344–355. 2011.

GAZZANIGA, M. S.; IVRY, R. B.; MANGUN, G. R. *Neurociência cognitiva: a biologia da mente.* 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

GOINES, P. E., ASHWOOD P. Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders

- (ASD): Possible role of the environment. ***Neurotoxicology and teratology***.36:67-81. 2013.
- GRABRUCKER, A. M. Environmental factors in autism. ***Front. Psychiatry***. 3:118.2012.
- GULOKSUZ, S. A., et al . Elevated plasma concentrations of S100 calcium-binding protein B and tumor necrosis factor alpha in children with autism spectrum disorders.***Rev. Bras. Psiquiatr.*** São Paulo, v. 39, n. 3, p. 195-200. 2017 .
- HERBERT, M.R. Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders. ***Curr Opin Neurol***. 23:103-10. 2010.
- HORNIG, M.; BRIESE, T.; BUIE, T.; BAUMAN, M.L.; LAUWERS, G. et al. Lack of association between measles virus vaccine and autism with enteropathy: A case-control study. 2008.
- HSIAO, E.Y.; MCBRIDE, S.W.; CHOW, J.; MAZMANIAN, S.K. e PATTERSON, P.H. Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 12776–12781. 2012.
- KATAOKA, S.; TAKUMA, K.; HARA, Y.; MAEDA, Y.; AGO, Y.; MATSUDA, T. Autismlike behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. ***Int. J. Neuropsychopharmacol***. 16, 91-103. 2013.
- KAZLAUSKAS, N.; CAMPOLONGO, M.; LUCCHINA, L.; ZAPPALA, C.; DEPINO, A.M. Postnatal behavioral and inflammatory alterations in female pups prenatally exposed to valproic acid. ***Psychoneuroendocrinology***.72:11-21. Out. 2016.
- KIM, K.C.; KIM, P.; GO, H.S.; CHOI, C.S.; YANG, S.I., et al. The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague-Dawley rats. ***Toxicology Letters***. 201, 137–142. 2011.
- KINOSHITA, D. et al. Behavioral effects of LPS in adult, middle-aged and aged mice. ***Physiol Behav***, v. 96, n. 2, p. 328-32, Fev. 2009.
- KLIN, A. Autismo e síndrome de Asperger: uma visão geral. ***Revista Brasileira de Psiquiatria***. v.28, n.1 (suppl.), p.3-11. 2006.
- KOGAN, M. D.; BLUMBERG, S. J.; SCHIEVE, L. A.; BOYLE, C. A.; PERRIN, J. M.; GHANDOUR, R. M.; et al. Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. ***Pediatrics***. 124(5):1395–1403. Nov. 2009.
- KOYAMA, R., IKEGAYA, Y. Microglia in the pathogenesis of autism spectrum disorders. ***Neurosci Res***.100:1-5. 2015.

- KRAKOWIAK, P.; GOINES, P.E.; TANCREDI, D.J.; ASHWOOD, P.; HANSEN, R.L.; HERTZ-PICCIOTTO, I.; VAN DE WATER, J. Neonatal Cytokine Profiles Associated With Autism Spectrum Disorder. **JBiol Psychiatry**. 81(5): 442-451. 2017.
- KRUG, D.A., ARICK J., ALMOND P. Behavior checklist for identifying severely handicapped individuals with high levels of autistic behavior. **J Child Psychol Psychiatry**. 21:221-9. 1980.
- LEBLANC, J.J., FAGIOLINI M. Autism: a “critical period” disorder? **Neural Plast**. 921680:1-17. 2011.
- LI, X.; CHAUHAN, A.; SHEIKH, A.M.; PATIL, S.; CHAUHAN, V.; LI, X.M. Elevated immune response in the brain of autistic patients. **J Neuroimmunol**. 15;207(1-2):111-6. Fevereiro, 2009.
- LÖSCHER, W. Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. **CNS Drugs**. v. 16, n. 10, p. 669-94, 2002.
- LUCHESE, G.; CAPONE, G.; KANDUC, D. Peptide Sharing between Influenza a H1n1 Hemagglutinin and Human Axon Guidance Proteins. **Schizophrenia bulletin**. 40:362-75. 2014.
- LUCCHINA, L.; DEPINO, A.M. Altered Peripheral and Central Inflammatory Responses in a Mouse Model of Autism. **Autism Res**. International Society for Autism Research. Wiley Periodicals. Inc. 7: 273–289. 2014.
- MABUNGA, D.F.N.; GONZALES, E.L.T.; KIM, J.; KIM, K.C.; SHIN, C.Y. Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. Review Article:Autism Spectrum Disorders. **Exp. Neurobiol**. 24(4):285-300. Dez. 2015.
- MALIK, M.; SHEIKH, A.M.; WEN, G.; SPIVACK, W.; BROWN, W.T.; LI, X. Expression of inflammatory cytokines, Bcl2 and cathepsin D are altered in lymphoblasts of autistic subjects. **Immunobiology**. 216, 80–85. 2011.
- MALKOVA, N.V.; YU, C.Z.; HSIAO, E.Y.; MOORE, M.J. e PATTERSON, P.H. Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. **Brain, Behavior, and Immunity**. 26, 607– 616. 2012.
- MASI, A.; GLOZIER, N.; DALE, R.; GUASTELLA, A.J. The Immune System, Cytokines, and Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. **Neurosci Bull**. 33(2): 194-204. 2017.
- MCAFOOSE J, BAUNE BT. Evidence for a cytokine model of cognitive function. **Neurosci Biobehav Rev**. 33(3):355-66.Mar. 2009.
- MCCUSKER, R.H.; KELLEY, K.W. Immune-neural connections: How the immune system’s response to infectious agents influences behavior. **The Journal of Experimental Biology**. 216, 84–98. 2013.

- MOORE, S. J., TURNPENNY, P., QUINN, A., GLOVER, S., LLOYD, D. J., MONTGOMERY, T., et al. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. **J. Med. Genet.** 37, 489–497. 2000.
- NADEBAUM, C. et al. Language skills of school-aged children prenatally exposed to antiepileptic drugs. **Neurology.** v. 76, n. 8, p. 719-26, Feb 2011.
- NESTLER, E.J.; HYMAN, S.E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nat Neurosci.** 13(10):1161-9. 2010.
- NICOLINI, C.; FAHNESTOCK, M. The valproic acid-induced rodent model of autism. **Exp. Neurol.** 217- 227. 2018 .
- OHNISHI, T.; MATSUDA, H.; HASHIMOTO, T.; KUNIHIRO, T.; NISHIKAWA, M.; UEMA, T. et al. Abnormal regional cerebral blood flow in childhood autism. **Brain.** 123 (Pt 9):1838-44. Setembro, 2000.
- OHKAWARA, T.; KATSUYAMA, T.; IDA-ETO, M.; NARITA, N.; NARITA, M. Maternal Viral Infection During Pregnancy Impairs Development of Fetal Serotonergic Neurons. **Brain & Development.** 37:88-93, 2015.
- ONORE, C., CAREAGA, M., e ASHWOOD, P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. **Brain, Behavior, and Immunity.** 26, 383–392. 2012.
- ORNOY, A.; WEINSTEIN- FUDIM, L.; ERGAZ, Z. Prenatal factors associated with Autism Spectrum Disorder (ASD). **Reproductive Toxicology.** 2015.
- ORNOY, A.; WEINSTEIN- FUDIM, L.; ERGAZ, Z. Genetic Syndromes, Maternal Diseases and Antenatal Factors Associated with Autism Spectrum Disorders (ASD). **Frontiers in Neuroscience.**10:316. 2016.
- PARDO, C.A.; VARGAS, D.L.; ZIMMERMAN, A.W. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. **Int Rev Psychiatry.** 17(6):485-95. Dezembro, 2005.
- PARRACHO, H.M.; BINGHAM, M.O.; GIBSON, G.R. e MCCARTNEY, A.L. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. **Journal of Medical Microbiology.** 54, 987–991. 2005.
- PATTERSON, P.H. Maternal infection and immune involvement in autism. **Trends in Molecular Medicine.** 17, 389–394. 2011.
- RASALAM, A. D., HAILEY, H., WILLIAMS, J. H., MOORE, S. J., TURNPENNY, P. D., LLOYD, D. J., et al. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. **Dev. Med. Child Neurol.** 47, 551–555. 2005.
- ROSSIGNOL D. A., FRYE R. E. A review of research trends in physiological abnormalities in autism spectrum disorders: immune dysregulation,

inflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and environmental toxicant exposures. **Mol. Psychiatry**. 17, 389–401. 2012.

- ROULLET, F.I.; WOLLASTON, L.; DECATANZARO, D.; FOSTER, J.A. Behavioural and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. **Neuroscience**. 170, 514-22. 2010.
- ROULLET, F.I.; LAI J.K.; FOSTER, J.A. In utero exposure to valproic acid and autism--a current review of clinical and animal studies. **Neurotoxicol Teratol**. 36:47-56. 2013.
- SALMOND, C.H.; HAAN, M.; FRISTON, K. J.; GADIAN, D. G.; VARGHA-KHADEM, F. Investigating individual differences in brain anomalies in autism. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. v.358, n.1430, p.405-13, 2003.
- SCHNEIDER, T.; PRZEWOLOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: Animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**. 30, 80–89. 2005.
- SCHNEIDER T, ROMAN A, BASTA-KAIM A, KUBERA M, BUDZISZEWSKA B, SCHNEIDER K, et al. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. **Psychoneuroendocrinol**. 33(6):728-40. 2008.
- SCHNEIDER T., TURCZAK J., PRZEWOOCKI R. Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. **Neuropsychopharmacol**. 31:36-46. 2006.
- SCHOPLER E., REICHLER R.J., DEVELLIS R.F., DALY K. Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). **J Autism Dev Disord**. 10:91-103. 1980.
- SHALLCROSS, R. et al. Child development following in utero exposure: levetiracetam vs sodium valproate. **Neurology**. v. 76, n. 4, p. 383-9, Jan 2011.
- SHATTUCK P. T. Diagnostic substitution and changing autism prevalence. **Pediatrics**. 117, 1438–1439. 2006.
- SKURLOVA, M.; STOFKOVA, A.; JURCOVICOVA, J. Exogenous IL-1beta induces its own expression, but not that of IL-6 in the hypothalamus and activates HPA axis and prolactin release. **Endocr Regul**. 40(4):125-8. Dez. 2006.
- TAKANO, T. Role of Microglia in Autism: Recent Advances. **Dev Neurosci**. 37(3):195-202. 2015.
- TCHACONAS, A., ADESMAN A. Autism spectrum disorders: a pediatric overview and update. **Curr. Opin. Pediatr**. 25, 130–144. 2013.
- THEOHARIDES, TC, KEMPURAJ D, REDWOOD L. Autism: an emerging 'neuroimmune disorder' in search of therapy. **Expert Opin Pharmacother**.

10:2127-43. 2009.

- VARGAS, D.L.; NASCIMBENE, C.; KRISHNAN, C.; ZIMMERMAN, A.W.; PARDO, C.A. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. **Ann Neurol**. 57(1):67-81. Janeiro, 2005.
- WAGNER, G.C.; REUHL, K.R.; CHEH, M.; MCRAE, P.; HALLADAY, A.K. A new neurobehavioral model of autism in mice: Pre and postnatal exposure to sodium valproate. **Journal of Autism and Developmental Disorders**. 36, 779–793. 2006.
- WANG, L.W.; TANCREDI, D.J. e THOMAS, D.W. The prevalence of gastrointestinal problems in children across the United States with autism spectrum disorders from families with multiple affected members. **Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics**. 32, 351–360. 2011.
- XUAN, I.C.; HAMPSON, D.R. Gender-Dependent Effects of Maternal Immune Activation on the Behavior of Mouse Offspring. *PloS one*. 9:e104433, 2014.
- YANG, W.H.; JING, J.; XIU, L.J.; CHENG, M.H.; WANG, X.; BAO, P. Regional cerebral blood flow in children with autism spectrum disorders: a quantitative mTc-ECD brain SPECT study with statistical parametric mapping evaluation. **Chin Med J (Engl)**. 124(9):1362-6. Maio, 2011.
- YAMAGUCHI, H.; HARA, Y.; AGO, Y.; TAKANO, E.; HASEBE, S.; NAKAZAWA, T.; HASHIMOTO, H.; MATSUDA, T.; TAKUMA, K. Environmental enrichment attenuates behavioral abnormalities in valproic acid-exposed autism model mice. **Behav Brain Res**. 333:67-73. 2017.
- YIRMIYA, R.; GOSHEN, I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. **Brain, Behavior, and Immunity**. 25, 181–213. 2011.
- ZILBOVICIUS, M.; BODDAERT, N.; BELIN, P.; POLINE, J.B.; REMY, P.; MANGIN, J.F. et al. Temporal lobe dysfunction in childhood autism: a PET study. Positron emission tomography. **Am J Psychiatry**. 157(12):1988-93. Dezembro, 2000.
- ZILBOVICIUS, M.; MERESSE, I.; BODDAERT, N. Autismo: neuroimagem. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v.28, n.1, p.21-28, 2006.

Anexo 1



UFPA
Universidade Federal do Pará

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Interferências ambientais, alterações celulares e moleculares em modelo murino de transtorno do espectro autista induzido pelo ácido valproico no período gestacional.", protocolado sob o CEUA nº 6621140217, sob a responsabilidade de **Marcia C. K. Sosthenes e equipe; Dilza Nazaré Colares De Souza; Daniel Guerreiro Diniz; Roseane Borner De Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) em reunião de 23/03/2017.

We certify that the proposal "Environmental interferences, cellular and molecular alterations in murine model of autism spectrum disorder induced by valproic acid in the gestational period.", utilizing 40 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 6621140217, under the responsibility of **Marcia C. K. Sosthenes and team; Dilza Nazaré Colares De Souza; Daniel Guerreiro Diniz; Roseane Borner De Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 03/23/2017.

Vigência da Proposta: de 03/2017 a 03/2020

Área: **Morfologia / Anatomia**

Procedência: **Cristovam Wanderlei Picanço Diniz**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

Gênero: **Machos e Fêmeas**

idade: **6 a 8 semanas** N: **40**

Linhagem: **BALB-c**

Peso: **25 a 35 g**

Resumo: O transtorno do espectro do autismo (TEA) é definido como um distúrbio neurocomportamental manifestado por déficits na comunicação social, por interesses específicos e comportamentos repetitivos (APA, 2013). No espectro autista as funções executivas estão prejudicadas, causam dificuldades no planejamento e manutenção de um objetivo na execução de uma tarefa, podendo também gerar déficits no aprendizado (KLIN, 2006). Raros ensaios experimentais em camundongos que foram expostos ao ácido valproico durante o desenvolvimento pré-natal detiveram-se na avaliação de alterações numéricas dos astrócitos e micróglia em diferentes janelas do desenvolvimento pós-natal em associação com alterações comportamentais, sendo que nenhum deles correlacionou alterações morfológicas, estereológicas e comportamentais. De fato, Kazlauskas e colaboradores (2016) estudaram a distribuição laminar de astrócitos e micróglia em CA1 e no giro denteado de camundongos expostos ao ácido valproico durante o período pré-natal. Esses autores relataram que a densidade de astrócitos e micróglia aumenta em CA1 e no giro denteado e que isso é função da camada sob investigação. Entretanto, permanece por ser investigado em detalhes com o emprego de métodos sem viés, quais fenótipos morfológicos são responsáveis por essa variação em número e se tais alterações são de fato benéficas ou malélicas para o desenvolvimento pós-natal. Além disso, não há informações acerca da influência do enriquecimento ambiental sobre a resposta celular glial em associação com marcadores periféricos e centrais de inflamação. O presente projeto pretende contribuir para responder a tais questões. Iremos comparar o desempenho, em testes comportamentais, de camundongos com e sem TEA, criados em ambientes diferentes (enriquecidos e empobrecidos), assim como investigar as bases moleculares, com dosagem de citocinas na periferia e no cérebro destes camundongos e identificar quantitativamente e qualitativamente no giro denteado, as células gliais relacionadas ao TEA nesse modelo animal. Com essa finalidade iremos administrar em fêmeas de Camundongos (*Mus musculus*), linhagem BALB-c, dose única de valproato de sódio (VPA) de 600mg / kg, via intraperitoneal, no dia 12,5 de concepção. As fêmeas do grupo controle receberão injeção de soro fisiológico no mesmo período. A prole será mantida em um ambiente enriquecido (AE) com brinquedos feitos de diferentes formas e tamanhos, construídos de material plástico, madeira e metal, de cores diferentes como rodinhas de correr, escadas, cilindros, bolinhas, entre outros ou empobrecido (AP) sem equipamentos ou brinquedos, após desmame no dia 21 pós-natal. Comida e água serão fornecidas ad libitum durante todo o experimento que será conduzido na prole masculina, aos 6 e aos 12 meses. Quatro grupos experimentais independentes serão formados para o experimento. O primeiro e o segundo grupos serão de camundongos expostos ao ácido valproico no período pré-natal, sendo um grupo acomodado em ambiente padrão (AP) e o outro grupo em ambiente enriquecido (AE). O terceiro e o quarto grupos serão de camundongos que receberão aplicação de solução salina, ficando um grupo acomodado em AP e o outro grupo em AE. Estes 4 grupos passarão por testes em duas fases de desenvolvimento, aos 6 meses e aos 12 meses de vida sendo, para isso, distribuídos novamente em 8 sub-grupos. Testes comportamentais serão conduzidos na mesma sequência nos dois períodos de desenvolvimento, em grupos de no mínimo 6 animais. Para realização dos testes comportamentais iremos utilizar o burrowing, campo aberto, memória episódica e labirinto de 8 braços radiais. Ao final dos testes todos os animais serão perfundidos e terão seus cérebros processados para imunomarcção seletiva.

Anexo 2



POSTER CERTIFICATE

This is to certify that

Dilza Souza

presented a poster entitled

Valproic acid during pregnancy reverse natural tendency to avoid open spaces in BALB/c mice adult offspring's and environmental enrichment is not enough to recover it.

*Dilza Souza*¹, *Welton Masayoshi Monteiro Yamamoto*², *Alana Gabriele Oliveira Cabeça da Silva*², *Pedro Heinrich Oliveira Campos*², *Larissa Victória Barra de Moura*², *Ellen Rose Leandro Ponce de Leão*², *Taiany Nogueira Fernandes*², *Cintya Castro Abreu*², *Maria Helena Moutinho Marta*³, *Lucas Pereira Afonso*⁴, *Cynthia Letícia Serra Cabeça*⁵, *Daniel Guerreiro Diniz*², *Cristovam Wanderley Picanço Diniz*²

¹Universidade Federal do Pará, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Belém, Brazil; ²Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Belém, Brazil; ³Centro Universitário do Estado do Pará, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Belém, Brazil; ⁴Universidade da Amazônia, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Belém, Brazil; ⁵Instituto Federal de Educação- Ciência e Tecnologia do Pará, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Belém, Brazil.

At the 11th FENS Forum of Neuroscience
7-11 July, 2018
Berlin, Germany



FENS Federation of European Neuroscience Societies



www.fens.org/2018



Anexo 3



Certificado

Certificamos que

O resumo INFLUÊNCIA DO GÊNERO E DO AMBIENTE NO COMPORTAMENTO EM LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA E NA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM UM MODELO MURINO DE AUTISMO USANDO ÁCIDO VALPRÓICO DURANTE O PERÍODO PRÉ-NATAL., de autoria de LARISSA VICTORIA BARRA DE MOURA, ELLEN ROSE LEANDRO PONCE DE LEÃO, ALINNE LORRANY GOMES DOS SANTOS, DILZA NAZARÉ COLARES DE SOUZA, DANIEL GUERREIRO DINIZ, CRISTOVAM WANDERLEY PICANÇO DINIZ foi apresentado na forma de painel durante a

XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento - SBNeC, realizada no período de 22 a 25 de agosto de 2018, no Mendes Convention Center, em Santos, SP.


Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva
Presidente da SBNeC



Anexo 4



Certificado

Certificamos que

O resumo INFLUÊNCIA DO GÊNERO E DO AMBIENTE SOBRE O COMPORTAMENTO EM CAMPO ABERTO E SOBRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM MODELO MURINO DE AUTISMO EMPREGANDO ÁCIDO VALPROICO DURANTE O PERÍODO PRÉ-NATAL, de autoria de ELLEN ROSE LEANDRO PONCE DE LEÃO, LARISSA VICTÓRIA BARRA DE MOURA, DILZA NAZARÉ COLARES DE SOUZA, DANIEL GUERREIRO DINIZ, CRISTOVAM WANDERLEY PICANÇO DINIZ foi apresentado na forma de painel durante a

XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento - SBNeC, realizada no período de 22 a 25 de agosto de 2018, no Mendes Convention Center, em Santos, SP.


 Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva
 Presidente da SBNeC



Anexo 5

Autism Research



Autism Research

In utero valproic acid exposure in mice alters novel environment exploration and risk assessment in association with altered peripheral proinflammatory cytokines

Journal:	<i>Autism Research</i>
Manuscript ID	AUR-18-0311
Wiley - Manuscript type:	Short Report
Date Submitted by the Author:	03-Nov-2018
Complete List of Authors:	<p>Souza, DIlza; Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, Núcleo de Pesquisas em Oncologia; Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Laboratório de Neurodegeneração e Infecção</p> <p>Yamamoto, Welton; Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Laboratório de Neurodegeneração e Infecção</p> <p>Silva, Alana; Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Laboratório de Neurodegeneração e Infecção</p> <p>Campos, Pedro; Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Laboratório de Neurodegeneração e Infecção</p> <p>Moura, Larissa; Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Laboratório de Neurodegeneração e Infecção</p> <p>Leão, Ellen; Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Laboratório de Neurodegeneração e Infecção</p> <p>Sousa, Aline; Instituto Evandro Chagas, Seção de Meio Ambiente</p> <p>Diniz, Cristovam; Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Laboratório de Neurodegeneração e Infecção</p> <p>Diniz, Daniel; Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas</p>
Keywords:	Autism, Behavior, Open Field, Elevated Plus Maze, Interleukin, BALB/c, Valproic Acid

SCHOLARONE™
Manuscripts

John Wiley & Sons