



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**Efeito do Resveratrol nos Componentes Sinápticos e no Comportamento
Sensorial de Busca ao Ninho no Modelo Animal de Autismo por
Exposição Pré-Natal ao Ácido Valpróico**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM NEUROCIÊNCIAS

Porto Alegre
Outubro de 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**Efeito do Resveratrol nos Componentes Sinápticos e no Comportamento
Sensorial de Busca ao Ninho no Modelo Animal de Autismo por
Exposição Pré-Natal ao Ácido Valpróico**

Trabalho de conclusão de curso de pós-graduação apresentado ao PPG Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

MELLANIE FONTES DUTRA DA SILVA

ORIENTADORA: Dra . Carmem Juracy Silveira Gottfried

CO-ORIENTADOR: Dr. Victorio Bambini Junior

Porto Alegre
Outubro de 2015

Agradecimentos

Na ciência, nenhum trabalho é realizado sozinho. Ele é fruto da dedicação, convicção, empenho e acima de tudo, do amor que as pessoas disponibilizam e oferecem para sua execução. Gostaria, então, de realizar meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para esse trabalho e para mais essa etapa de um sonho que se realiza todos os dias.

Aos meus colegas de laboratório, que considero como minha segunda família, que me receberam no laboratório e construíram a pesquisadora que venho aperfeiçoando ao longo dos anos. Gostaria de agradecer aos meus irmãos: Gustavo, minha dupla/ombro amigo que esteve junto em todas as partes dos experimentos do presente trabalho, e que faz tanta saudade; Mauro, desde os tempos de graduação do meu lado para tudo, auxiliando exaustivamente nas análises por RT-qPCR; Diego e Taylor, pela gentileza, amizade e contribuições incríveis para a discussão desse trabalho. Aos alunos de iniciação científica que fazem dos meus dias os mais felizes possíveis: Walquíria, Júlio, Brum, Bibi, Gabi Melo, Tharcila, Guilherme. Sem vocês, esse trabalho nem teria saído do plano das ideias. Vocês tem meu amor e carinho para onde forem.

A minha orientadora, Carmem, minha mãe-científica e acima de tudo, minha amiga. Foi minha primeira mentora científica logo quando iniciei a graduação em biomedicina e gostaria de seguir aprendendo cada vez mais com ela ao longo da minha vida profissional. Obrigada por toda a confiança, por todas as ideias e oportunidades, pelos incansáveis incentivos para fazer uma ciência cada vez melhor, sempre inspirando a todos no laboratório e nos movendo com o teu amor pela ciência e pela arte de *fazer* ciência. Darei o meu melhor todo o dia para me tornar uma pesquisadora parecida contigo.

Ao meu co-orientador, Victório, meu irmão e um dos meus melhores amigos. Obrigada por toda a amizade, por toda a ajuda na execução desse trabalho, por quase 6 anos de ensinamento e aproveitamento para agradecer antecipadamente por todos os próximos anos que virão. Tu és meu exemplo.

Aos meus pais e a Larhyssa, minha irmã e melhor amiga, por toda a paciência e dedicação, todo o esforço e empenho, não só nesses últimos anos que contemplaram o mestrado, mas por toda uma vida de entrega e amor que só eles souberam construir esse sentido em mim. Vocês são meus exemplos de honestidade,

dedicação, amor e amizade. Amo vocês e o mérito dessa etapa quero dividir com vocês também.

Aos meus amigos incansáveis que compartilharam momentos de felicidade aflição dentro e fora do ambiente acadêmico: Ethiane, Igor, Marcus, Marcos (led), Henrique, Rudá, Streit e Charlanne. Vocês são minha base para o significado da palavra amizade.

Ao Gabriel, por toda a paciência e amor, em todos os momentos, sem faltar nem um sequer. Obrigada por estar ao meu lado, por estar junto comigo sempre.

Aos meus amigos que o PPG Neuro me deu a honra de ter. Eu sabia que a pós-graduação era incrível, mas não tinha ideia que me traria pessoas tão incríveis como vocês. Gostaria de deixar meu agradecimento a todos os professores, à coordenadora Denise Zancan e a todos os funcionários que tornam esse PPG muito especial e de qualidade.

Gostaria muito de agradecer a prof. Simone Marcuzzo, relatora da presente dissertação, pelas contribuições incríveis e a banca composta pela prof. Renata Abib e pelo prof. Andreas Mendez. Vocês trouxeram essa dissertação para outro nível.

Aos meus amigos e colegas do GliaNews, Michael, Alan, Everton, Denyse, Amanda, André, minha família que mora tão longe, mas tão perto do meu coração. Obrigada por acreditarem e alimentarem essa vontade de divulgar a ciência para todas as mentes curiosas pelo conhecimento.

“Any sufficiently advanced technology is indistinguishable from magic.”

Arthur C. Clarke

Resumo

O transtorno do espectro do autismo (TEA) é classificado como um transtorno do neurodesenvolvimento, apresentando prejuízos na comunicação social e manifestações de comportamentos, interesses e atividades repetitivos e restritos. Apesar de a etiologia do TEA permanecer desconhecida, evidências crescentes sugerem que esse transtorno é causado por uma complexa interação de fatores genéticos e fatores ambientais durante o período embrionário. Diversas alterações estão relacionadas com o TEA, como por exemplo, alterações em multidomínios sensoriais e, estudos recentes têm apontado que o desbalanço excitatório-inibitório, em que há um predomínio da excitação, em regiões corticais, como aquelas envolvidas no processamento sensorial podem contribuir para essas alterações. A exposição ao ácido valproico (VPA) é um fator ambiental de risco importante para o surgimento do TEA e é a molécula utilizada pelo nosso grupo de pesquisa para induzir características do tipo autista em murinos. Dados recentes do nosso grupo mostram que o tratamento subcrônico com resveratrol (RSV) na rata prenhe é capaz de prevenir alterações sociais do tipo autista em roedores pré-natalmente expostos ao VPA. O presente trabalho avaliou a influência da interação entre o RSV e do VPA no comportamento de busca pelo ninho em ratos com 10 dias de vida e no nível de expressão gênica relativa de proteínas envolvidas em sinapses (Sinaptofisina) excitatórias (PSD95) e inibitórias (Gefirina) na região da amígdala em ratos com 30 dias de vida. Nossos dados apontam um prejuízo na porcentagem de acertos ao ninho, bem como na latência para alcançar o ninho ou a mínima latência para ir para uma das maravalhas disponíveis no grupo VPA, corroborando dados na literatura. No entanto, pela primeira vez, o presente trabalho mostra que o RSV foi capaz de prevenir o prejuízo na porcentagem de acertos ao ninho no grupo RSV+VPA. Ainda, o presente trabalho mostra alterações estatisticamente significativas na expressão gênica de moléculas envolvidas em sinapses excitatórias-inibitórias na região da amígdala, uma importante região envolvida no autismo e no estabelecimento do vínculo mãe-filhote no início da vida. Esses dados mostram resultados originais apontando o resveratrol como uma ferramenta promissora na prevenção de alterações sensoriais no modelo animal de autismo, bem como na busca de mecanismos e alvos etiológicos e fisiopatológicos no estudo do TEA.

Abstract

Autism spectrum disorder (ASD) is classified as a neurodevelopmental disorder, presenting impairments in social communication and sociability, as well as stereotyped behavioral patterns. Although the etiology remains unknown, there is growing evidence suggesting a complex interplay between genetic and environmental risk factors during the gestational period. Many alterations are related to ASD, as multisensory alterations and recent data were pointing out the misbalance between excitation and inhibition, with high predominance in excitation compound, in cortical areas related to sensory processing. The valproic acid (VPA) exposure is an environmental risk to ASD and VPA is commonly used by our group to induce autistic-like behaviors in rodents. We previously showed that a prenatal subchronic treatment of the pregnant rats with resveratrol (RSV) prevented the social deficits induced by VPA in male offspring rats. The present work evaluated the influence of RSV and VPA interaction in the nest seeking behavior in 10 days old male rats and in the relative genic expression levels of synaptic proteins (Synaptophysin) in excitatory (PSD95) and inhibitory synapses (Gephyrin) in amygdala region of 30 days old rats. We identified impairments in the number of correct choices to the nest in VPA group, which were in accordance to the literature data. Nevertheless, we showed, for the first time, that resveratrol were able to prevent these impairments In RSV+VPA group. Besides, the present work showed important significant alterations at the genic expression level of synaptic proteins related to excitatory and inhibitory synapses in the amygdala region, an important brain structure related to attachment behavior and altered in ASD. Therefore, these data highlights resveratrol as an important molecule for prevention of autistic-like sensory behaviors in the animal model of autism induced by prenatal exposure to VPA, as well as an important tool for seeking etiological targets and physiopathology studies in TEA.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABA – Applied Behavior Analysis	LTP – Long Term Potential ou Potencial de Longa Duração
ANOVA – Análise de Variância	M-MLV – Enzima para transcrição Reversa derivada de vírus da leucemia murina Maloney ou Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
APA – American Psychiatric Association	MMWR – Morbidity and Mortality Weekly Report
BLAST - Basic Local Alignment Search Tool	mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior	PCR – Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase
CDC – Center for Disease Control and Preventions	PROAP – Programa de Apoio a Pós-Graduação
CEUA – Comitê de Ética para o Uso de Animais	Propesq – Pró-Reitoria de Pesquisa
CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento	PROPG – Pró-Reitoria de Pós-Graduação
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal	PSD95 – post synaptic density 95 protein (proteína da densidade pós-sináptica de 95 kDa)
CPF – cortex pré-frontal	RSV – Resveratrol
DMSO – Dimetil sulfóxido	RT-qPCR – PCR em tempo real com transcrição reversa antecedida
DNA – Ácido Desoxirribonucleico	TEA – Transtorno do Espectro do Autismo
dNTP – deoxi-nucleotídeos tri fosfatados	TEACCH – Treatment and Educational of Autistic and relatec Communication-handicapped Children
DSM – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders	UEA – Unidade de Experimentação Animal do HCPA
EUA – Estados Unidos da America	USA – United States of America
FDA – Food and Drug Administration	VPA – Vaproic acid ou ácido valproico
FIPE – Fundo de Incentivo a Pesquisas	WNT – Whisker Nuisance Task
GABA – gama-ácido amino butírico	
GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	
HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre	
LA – Núcleo lateral da Amígdala	

SUMÁRIO

Conteúdos da Dissertação

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O transtorno do espectro do autismo (TEA).....	1
1.2. Epidemiologia	5
1.3. Desencadeamento do TEA	6
1.4. Modelo animal de autismo induzido por ácido valpróico.....	7
1.5. Resveratrol como uma ferramenta de estudo no TEA	8
1.6. Sistemas sensoriais no autismo	9
1.7. O balanço excitatório e inibitório no autismo e o sistema gabaérgico como foco de estudo.....	13
2. HIPÓTESES E VIAS DE INVESTIGAÇÃO	14
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivos gerais	14
3.2. Objetivos específicos	15
4. METODOLOGIA	15
5. RESULTADOS.....	22
5.1. Comportamento de busca pelo ninho (<i>nest seeking behavior</i>).....	22
5.2. Análise da expressão gênica de proteínas sinápticas na amígdala.....	25
5.2.1. Região da Amígdala	25
5.2.1.1. PSD95.....	25
5.2.1.2. Gefirina	26
5.2.1.3. Sinaptofisina	27
6. DISCUSSÃO	28
6.1. Análise comportamental	28
6.2. Análise da expressão gênica relativa	30
6.3. Possíveis mecanismos de ação do VPA e do RSV	33
6.4. Limitações das análises	34
7. CONCLUSÕES	38
8. PERSPECTIVAS DE ESTUDO	39
9. APOIO FINANCEIRO	40
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
ANEXOS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. O transtorno do espectro do autismo (TEA)

O transtorno do espectro do autismo (TEA) reúne um grupo de desordens do neurodesenvolvimento, de aspecto multifatorial e com graus de apresentação variáveis, caracterizado por 1) alterações na comunicação social e interação social em múltiplos contextos e 2) comportamentos repetitivos, atividades e interesses restritos (American Psychiatry Association (APA), 2013).

A palavra “autismo” vem do prefixo grego autós (αὐτός, significando "auto"), acrescido do sufixo -ismo (indicando um “estado”), utilizado pela primeira vez pelo psiquiatra suíço Paul Eugen Bleuler, em 1911 ao descrever pacientes com esquizofrenia com a característica de se “retirar para o mundo de suas fantasias” (Bleuler, 1911). Somente em 1938 essa terminologia foi utilizada por Hans Asperger em uma conferência em Viena, no Hospital Johns Hopkins, onde foi descrita as características de “autistas psicopatas” baseados em seus estudos de caso (Asperger, 1938) e, em 1943, foi publicado o primeiro relato detalhado de pacientes com autismo por Leo Kanner, definindo como características presentes nesses pacientes a “solidão autista” e a “obsessiva insistência na preservação dos hábitos” (Kanner, 1943).

Desde as primeiras descrições das características comportamentais alteradas em pacientes realizadas por Asperger e Kanner, esforços da comunidade científica têm sido empregados para categorizar adequadamente pacientes com o Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) através da compilação de sintomas e características que devem estar presentes e/ou associados com o TEA (American Psychiatric Association (APA), 1994; American Psychiatric Association, 2000). O critério atual, definido pela quinta edição do DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), publicado pela Associação Americana de Psiquiatria (American Psychiatry Association (APA), 2013), consiste numa díade de alterações comportamentais, envolvendo a presença de:

- 1) Prejuízos na comunicação e interação social em múltiplos contextos, incluindo déficits em reciprocidade social, comunicação não-verbal

utilizada para interação social e em habilidades para iniciar, manter e entender relacionamentos;

2) Comportamentos repetitivos, atividades e interesses restritos.

É necessário ressaltar que ambas as características devem estar presentes para o diagnóstico do TEA, as quais podem variar de intensidade, porém presentes, necessariamente, ao longo de toda a vida (Rapin and Tuchman, 2008). Uma vez que o TEA é um transtorno cujas características são de base comportamental, somado a ausência de biomarcadores periféricos, o diagnóstico passa a ser restritamente clínico (Mayes et al., 2014).

O TEA, por ser um transtorno multifatorial e com graus de severidade variáveis, apresenta uma diversidade de comorbidades as quais afetam os pacientes (Gottfried et al., 2013), necessitando de uma equipe interdisciplinar e uma detalhada anamnese na hora do diagnóstico, levando em consideração a história do paciente e os sintomas apresentados no momento da consulta. De fato, o TEA é um transtorno tão heterogêneo, reunindo características tão distintas que muito raramente dois indivíduos compartilham o mesmo conjunto de sintomas (Gadia et al., 2004; Rapin and Tuchman, 2008). Alguns sintomas associados ao TEA podem acompanhar o diagnóstico dos pacientes, como presença de comportamento agressivo, ansiedade, depressão, déficits cognitivos, crises epiléticas, alterações gastrointestinais, distúrbios do sono, disfunções do sistema imune e hipersensibilidade a estímulos táteis, sonoros e luminosos, estes últimos, cada vez ganhando mais espaço no cenário do autismo, devido sua alta presença em pacientes diagnosticados para o TEA (Geschwind, 2009).

Não há tratamento eficaz para o TEA (Rudimar Riesgo, 2013a). A abordagem clínica padrão envolve uma equipe interdisciplinar, como médicos, fonoaudiólogos, psicólogos, nutricionistas, terapeutas ocupacionais, etc. associado ao uso de fármacos buscando amenizar aspectos específicos da sintomatologia do autismo (Rudimar Riesgo, 2013b). Atualmente, os únicos medicamentos aprovados para uso no autismo pelo FDA (do inglês Food and Drug Administration – USA) são os antipsicóticos atípicos risperidona e aripiprazol, que têm como alvo o comportamento agressivo presente em alguns

pacientes (Rudimar Riesgo, 2013b). Os pacientes com TEA também podem utilizar medicamentos para controlar alterações de humor distúrbios do sono e outras comorbidades (Tsuji et al., 2007). Terapias comportamentais, como a ABA (do inglês Applied Behavior Analysis) e o TEACCH (do inglês Treatment and Educational of Autistic and related Communication-handicapped Children) (Rudimar Riesgo, 2013b) são fortemente indicadas para os pacientes diagnosticados com TEA. Estratégias como a ABA visa ensinar, em estágios crescentes de complexidade, habilidades ausentes nas crianças. Já o TEACCH visa adaptar a organização do ambiente e das rotinas de modo que a criança possa entendê-los mais facilmente e também saiba o que é esperado dela.

Visto que a linguagem, funções executivas, interação social e comportamento emocional estão prejudicados no autismo, muitos estudos têm como foco o córtex pré-frontal (CPF), com estudos relatando um aumento de 67% no número de neurônios em encéfalos de pacientes com autismo (Courchesne et al., 2001). As alterações de conectividade estão entre os achados mais consistentes. A hipoconectividade a longa distância entre córtices frontal e temporal, e entre esses com outras estruturas foi documentado por alguns grupos de pesquisa (Just et al., 2004; Koshino et al., 2005; Villalobos et al., 2005). Enquanto isso, uma hiperconectividade foi descrita localmente no CPF (Courchesne and Pierce, 2005) acompanhada de aumento no número de colunas e diminuição da espessura delas (Chomiak and Hu, 2012).

O cerebelo possui um papel fundamental na locomoção, equilíbrio e diversas funções motoras e cognitivas do SNC, e encontra-se alterado dentro do TEA, tanto funcional, quanto geneticamente (Aldinger et al., 2012; Hong et al., 2000; Tan et al., 2010).

Alterações em estruturas límbicas são bastante evidentes e documentadas nessa desordem, como o hipocampo e amígdala. O hipocampo faz parte do sistema límbico, sendo necessário para mecanismos de aprendizado, memória e diversas funções cognitivas, sendo um componente de estudo frequente dentro de modelos animais de autismo. Estudos relatam um aumento no

tamanho nessa estrutura em indivíduos com TEA (Groen et al., 2010; Rojas et al., 2004). A amígdala é composta por um complexo de núcleos, sendo um local bastante associado com medo e agressividade. Estudos sobre o tamanho dessa região no TEA mostram resultados discordantes, já se demonstrando aumento (Groen et al., 2010; Nordahl et al., 2012) e diminuição na amígdala (Dalton et al., 2007). Outros dados interessantes sobre essa região incluem uma conectividade atípica e redução da habituação da amígdala correlacionada com escala de responsividade social (Murphy et al., 2013; Swartz et al., 2012).

Dada a presença de comportamentos repetitivos e estereotipados em pacientes com autismo, alterações nos núcleos da base também já foram encontradas (Langen et al., 2007; Stanfield et al., 2008; Takarae et al., 2007). Durante imitação de expressões faciais e tarefas de flexibilidade cognitiva, pacientes com autismo apresentam hipoativação do estriado (Dapretto et al., 2006; Shafritz et al., 2008).

Outras estruturas alteradas incluem o giro fusiforme, localizado no lobo temporal ventral, o qual tem papel no reconhecimento de faces. Alterações nessa região parecem fundamentais para vários sinais comportamentais observados em pacientes com autismo, uma vez que sua atividade encontra-se reduzida durante processamento de faces (Critchley et al., 2000; Pierce et al., 2001; van Kooten et al., 2008). As áreas de Broca e Wernicke, envolvidas com a linguagem, também mostram ativação anormal no autismo (Verhoeven et al., 2009).

Ainda é obscuro como a relação das alterações nessas regiões em pacientes com autismo possam gerar os sintomas que definem o transtorno, mas evidências crescentes vêm apontando alterações no grau de conectividade neuronal local e a longa distância (Supekar et al., 2013), bem como mudanças no equilíbrio entre a excitação e a inibição, tendendo a favorecer o primeiro, o aumento da excitação (Snijders et al., 2013; Zikopoulos and Barbas, 2013). Entretanto, o grau de incerteza é grande, e outras perturbações podem ainda estar passando despercebidas. Além disso, os mecanismos que geram estas alterações são ainda desconhecidos.

1.2. Epidemiologia

No último estudo populacional em 2014 do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês *Center for Disease Control and Preventions*), realizando um levantamento de 2010, a incidência de autismo nos Estados Unidos da América era de uma criança a cada 68, aproximadamente 1,5%, sendo 5 vezes mais comum entre meninos (1 a cada 42) do que em meninas (1 a cada 189) (Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 2014).

No Brasil existe uma escassez de estudos epidemiológicos considerando os dados para o TEA. Estudos pilotos realizados na cidade de Atibaia, analisando 1470 crianças de até 15 anos encontrou uma prevalência de aproximadamente 0,3% (Paula et al., 2011). Esses baixos índices podem se dar pela falta de estudos de prevalência em diferentes regiões, bem como problemas metodológicos com amostras pequenas, pouca conscientização a respeito do TEA por parte tanto da população, quanto dos profissionais locais, pela falta de registros adequados e diagnósticos equivocados devido a sobreposição dos comportamentos com outros transtornos (Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 2014).

Em relação a etnias e grupos socioeconômicos, o TEA parece não ter alguma relação com esses fatores (Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 2014). Ainda, não se sabe a influência de fatores culturais, étnicos, geográficos e socioeconômicos sobre o TEA (Fombonne et al., 2009).

Muitas questões foram levantadas acerca do que poderia estar aumentando o número de diagnósticos do TEA ao longo dos anos. Entre 1991 a 1997, a incidência teve um aumento de 556%, passando a afetar mais crianças do que, por exemplo, câncer e síndrome de Down (Muhle et al., 2004). Já entre 2000 e 2010, a prevalência nos EUA mais que dobrou, passando de 0,67% (Summaries, 2007) para 1,47% (Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 2014). Alguns fatores foram excluídos ao longo dos anos, como o conservante timerosal utilizado em algumas vacinas, o qual contém mercúrio em sua formulação. Anteriormente, ele foi considerado como um fator de risco para o autismo (Wing and Potter, 2002), no entanto, segundo dados do CDC, foi descartada sua contribuição como fator de risco para a incidência do

autismo (Fombonne et al., 2009). Ainda, segundo Fombonne, o aumento da prevalência do autismo se deve, em parte, às mudanças nos critérios de diagnóstico, gerando uma migração de indivíduos com outros transtornos para o TEA, porém somente essa migração não é capaz de explicar totalmente o aumento visto nos últimos estudos (Fombonne et al., 2009). Estudos epidemiológicos e com modelos animais tem tentado explicar o que poderia estar por trás desta outra parte no aumento e indicam que fatores ambientais podem ser responsáveis pelos aumentos observados na incidência do autismo (Bryson et al., 2003; Schneider and Przewlocki, 2005).

Essa alta prevalência no TEA é acompanhada por custos para a sociedade, gerando um impacto econômico na vida das famílias e dos governos. Estima-se um custo adicional de, pelo menos, US\$ 17.000 por ano no cuidado de uma criança diagnosticada com TEA (Lavelle et al., 2014), sendo o custo médio total de US\$ 1.600.000 por indivíduo com TEA durante a vida, nos EUA (Kogan et al., 2009).

1.3. Desencadeamento do TEA

Nos últimos anos, dados de diferentes estudos vêm apontando a etiologia do TEA como uma complexa interação entre fatores tanto genéticos, quanto ambientais. Estudos de associação gênica, realizados com gêmeos e irmãos de pacientes com autismo demonstram uma herdabilidade muito maior no TEA entre nos transtornos neuropsiquiátricos (Williams, 2012). Um exemplo disso são estudos com gêmeos, os quais apresentam concordância de 60% no autismo clássico em monozigóticos contra 0% em dizigóticos (Muhle et al., 2004). Ao reavaliar os parâmetros de análise, considerando características mais abrangentes, como déficits em comunicação e alterações sociais, fez essa concordância ir de 60% para 92% em monozigóticos e de 0% a 10% em dizigóticos (Casanova, 2006). Esses dados sugerem a presença importante de um componente genético que podem ser causadoras do autismo, no entanto, mesmo após vários anos de estudo e identificação de mais de 1000 alterações genéticas associadas ao autismo, estas não explicam mais que 25% dos casos (Miles, 2011).

Dessa forma, nos últimos anos, pesquisadores têm levantado possibilidades de que fatores ambientais possam estar envolvidos e contribuir para uma maior expressão ou desencadeamento dos sintomas, tornando-os tão importantes quanto os fatores genéticos para o desenvolvimento do autismo (Muhle et al., 2004; Sandin et al., 2014).

Com o auxílio de estudos epidemiológicos, dados indicam que teratógenos durante o primeiro trimestre de gestação, um período crítico para o neurodesenvolvimento, poderiam estar relacionados com o desencadeamento do autismo, destacando-se o ácido valpróico (VPA, do inglês Valproic Acid) (Roulet et al., 2013; Smith and Brown, 2014) e a talidomida (Imai et al., 2014). Estudos demonstraram que 30% dos indivíduos expostos à talidomida durante o período gestacional, especialmente entre os dias 20 e 24, desenvolveram TEA (Miller and Stromland, 1999). Ao contrário do VPA, a talidomida apresenta diferentes efeitos em primatas e em roedores, sendo que, em primatas pode gerar anomalias nos membros. Já o VPA induz alterações similares tanto em roedores, quanto em humanos (Gottfried et al., 2013).

Valendo-se de todas essas informações, foi estabelecido pela primeira vez, em 1997, pela embriologista Patricia Rodier, um modelo animal para o estudo do autismo, induzido farmacologicamente pela exposição pré-natal ao VPA (Rodier et al., 1997)

1.4. Modelo animal de autismo induzido por ácido valpróico

O modelo animal de autismo por indução pré-natal ao VPA é um modelo bem validado e estabelecido na literatura. O modelo surgiu devido a dados clínicos em que o VPA aumentava significativamente a incidência de autismo nos filhos de mães que faziam uso deste medicamento durante o primeiro trimestre de gestação (Harden, 2013). A partir desses estudos, o modelo animal de autismo por indução pré-natal ao VPA em 1997 (Rodier et al., 1997) e, além do gatilho etiológico, inúmeras alterações comportamentais e neuromorfológicas são comuns entre pacientes e roedores induzidos por VPA: comportamento repetitivo e estereotipado e prejuízo na sociabilidade e

comunicação (Roullet et al., 2013), alterações anatômicas comuns em cerebelo (Ingram et al., 2000), nervos cranianos (Rodier et al., 1996) e outras regiões do encéfalo (van Kooten et al., 2005), padrões eletroencefalográficos anormais em resposta a estímulos auditivos (Gandal et al., 2010) e elevada ativação astrocítica e microglial (Lucchina and Depino, 2013). Assim como em seres humanos, onde existe uma maior incidência de autismo em indivíduos do sexo masculino, parece que algumas das características só estão presentes em machos (Kim et al., 2013; Schneider et al., 2008). Nosso grupo utiliza o modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao VPA no dia E12,5 de gestação, janela temporal precisa onde se observaram as características do tipo autista se manifestando de forma mais evidente na prole de mães expostas nesse período (Rodier et al., 1997). Este modelo apresenta-se como uma importante estratégia para estudos etiológicos, para o estudo de mecanismos preventivos ou de reversão dos sintomas, bem como para compreender as alterações moleculares ao longo do desenvolvimento.

1.5. Resveratrol como uma ferramenta de estudo no TEA

Recentemente, nosso grupo publicou um estudo mostrando que um tratamento pré-natal com resveratrol (RSV) foi capaz de prevenir alterações na sociabilidade da prole neste modelo (Bambini-Junior et al., 2014b). O RSV (3,4',5-triidroxi-trans-estilbeno), é um polifenol encontrado naturalmente em frutas e vegetais, isolado pela primeira vez em 1940 das raízes de *Veratrum grandiflorum*. Sua presença em uvas, pinhas e amendoins é relacionada à proteção da planta contra infecções fúngicas e radiações UV (Vang et al., 2011).

Nas últimas décadas, o papel terapêutico do RSV tem sido evidenciado em diversas enfermidades como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (Shukla and Singh, 2011; Singh et al., 1997; Vang et al., 2011). Entre os diversos alvos moleculares relacionados aos efeitos do RSV, destacam-se as sirtuínas (Jian et al., 2014) e cascatas de sinalização intracelular da mTOR (Widlund et al., 2013).

Além disso, as propriedades neuroprotetoras e anti-inflamatórias do RSV (Ashwood et al., 2011; Chen et al., 2014) são relacionadas com conhecidos gatilhos etiológicos do autismo, como alterações de padrões de migração neuronal e ativação imunológica (Bauman et al., 2014; Gesundheit et al., 2013; Miyazaki et al., 2005).

Adicionalmente, resultados preliminares de estudos em andamento do nosso grupo apontam que o RSV pode prevenir outras características encontradas em microRNA específicos. Assim, o RSV pode complementar o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de características do tipo autista neste modelo. É especialmente interessante a investigação de alterações teciduais e moleculares causadas pelo VPA e prevenidas pelo RSV, bem como o estudo de vias de sinalização que podem ser afetadas por ambos, mas de maneira oposta, incluindo avaliação em idades embrionárias.

Um dos alvos de interesse no nosso grupo é o sistema sensorial. Sabe-se que crianças com autismo apresentam resposta somatossensorial reduzida (Marco et al., 2012). Entretanto, as bases neurais de diferenças de processamento sensorial ainda são pouco compreendidas no TEA.

1.6. Sistemas sensoriais no autismo

Nos últimos anos, o sistema sensorial tem ganhado espaço nos transtornos neurológicos, especialmente no TEA. Estudos clínicos têm apontado que anormalidades sensoriais são observadas em mais de 94% em pacientes diagnosticados com TEA (Geschwind, 2009) e, recentemente, com a 5ª edição do DSM-V, as anormalidades sensoriais passaram a ser componente chave desse transtorno (American Psychiatry Association (APA), 2013).

Estudos sugerem que os componentes sensoriais se dividem em quatro padrões de resposta no TEA, os quais incluem hiperresponsividades e hiporesponsividades, aumento da percepção e comportamentos repetitivos, de busca ou interesses sensoriais anormais (Ausderau et al., 2014). As hiperresponsividades se dão pela resposta mais amplificada ou aversiva a

estímulos sensoriais, como por exemplo, reações negativas ao toque. (Baranek et al., 2007a; Schoen et al., 2008). As hiperresponsividades são a falta ou o atraso na resposta a estímulos sensoriais, como por exemplo, a reação lenta na resposta à dor (Ben-Sasson et al., 2009; Watson et al., 2011) Os comportamentos repetitivos, de busca ou interesses sensoriais anormais são caracterizados pelo fascínio ou comportamento de busca compulsiva por estimulação sensorial, a qual é intensa e pode ser repetitiva por natureza, como por exemplo, o fascínio por luzes, frequentemente observado em crianças diagnosticadas com TEA (Ben-Sasson et al., 2009; Liss et al., 2006). Por fim, o aumento da percepção sensorial é caracterizado por uma acuidade superior na consciência de um estímulo sensorial específico e foco em elementos específicos de um estímulo, como por exemplo, o aumento da habilidade em reconhecer estímulos auditivos (Mottron et al., 2009).

Estudos apontam que, dentre as alterações sensoriais presentes no TEA, as hiperresponsividades estão presentes em pelo menos 56% a 70% indivíduos jovens com TEA, incluindo respostas negativas aos estímulos (como ambientes barulhentos, toques sucessivos) (Baranek et al., 2007b, 2006; Ben-Sasson et al., 2009). Na tentativa de entender quais regiões poderiam estar influenciando esses comportamentos a partir desses gatilhos sensoriais, estudos de ressonância magnética funcional (fMRI) sugerem que as hiperresponsividades podem estar relacionadas com a hiperatividade em áreas encefálicas envolvendo o processamento sensorial primário, a regulação da emoção e as respostas a ameaças (Kleinhans et al., 2009; Tottenham et al., 2014). Ainda, quando mais de um gatilho sensorial é acionado, como no caso de estímulos sensoriais visuais e auditivos ocorrendo simultaneamente, essa hiperresponsividade é ainda mais evidente, sugerindo que a integração multissensorial poderia estar prejudicada no TEA (Russo et al., 2010). Um exemplo pode ser observado quando indivíduos com TEA são apresentados a toques agradáveis e a toques desagradáveis, onde ocorre uma hipoativação de regiões relacionadas ao processamento somatossensorial e límbico e uma hiperativação dessas mesmas regiões, respectivamente (Cascio et al., 2012). Dessa forma, ao falar de integração multissensorial no autismo, é imprescindível ressaltar a importância entre regiões de processamento

primário, como o córtex somatossensorial primário, visual primário e auditivo primário, com regiões límbicas importantes para o processamento de respostas aversivas, como a região da amígdala.

Região da Amígdala

As informações sensoriais ascendem pelo tronco encefálico vindas dos múltiplos receptores espalhados por todo o organismo até o tálamo, estrutura considerada como o “portão” para a retransmissão da informação sensorial para os córtices (Hardan et al., 2008). Regiões límbicas como a amígdala são ativadas em resposta a esse *input* sensorial que vem do tálamo, o qual retransmite para essas regiões de processamento associativo, associando a esse estímulo sensorial um contexto de “ameaça” ou “desprazeroso” para a sua percepção (Zald, 2003). Estudos de correlação apontam que crianças com TEA, apresentando hiperresponsividades sensoriais, possuem um alto índice de sintomas de ansiedade (Ben-Sasson et al., 2008; Green and Ben-Sasson, 2010; Mazurek et al., 2013), bem como alterações anatômicas no tamanho da região da amígdala estão presentes em indivíduos com TEA (Aylward et al., 1999; Schumann and Amaral, 2006; Sparks et al., 2002).

No modelo animal de autismo por indução pré-natal ao VPA já foi evidenciado que existe um desbalanço entre a excitação e a inibição na região da amígdala, especialmente no núcleo lateral (LA) da amígdala. Os animais do modelo apresentaram redução da interação social, aumento da ansiedade e aumento do aprendizado condicionado ao medo e prejuízos na extinção desse tipo de memória (Lin et al., 2013; Markram et al., 2008). A eletrofisiologia de fatias encefálicas da região da amígdala revelou um aumento dos potenciais de longa duração (LTP) enquanto se estimulava a via talâmica-amígdala, uma via importante de retransmissão de estímulos sensoriais no encéfalo (Lin et al., 2013) .

Valendo-se dessas informações e sabendo que essa estrutura possui uma resposta aumentada a estímulos sensoriais e é correlacionada a altos níveis de ansiedade (Lane et al., 2012), a função anormal da amígdala e possivelmente sua hiperatividade pode ser um fator chave na compreensão nas alterações de processamento sensoriais presentes no TEA.

Área Somatossensorial Primária

O córtex cerebral adulto de mamíferos possui uma estrutura laminar em seis camadas distintas, as quais são construídas por meio da migração sucessiva de progenitores neuronais onde os neurônios recém-formados formam as camadas corticais mais profundas, enquanto que os neurônios formados mais tardiamente formam as camadas superficiais corticais (Molyneaux et al., 2007). Ainda, pesquisas tem mostrado que neurônios nascidos no dia E12,5, estão distribuídos principalmente na camada V no córtex somatossensorial de roedores (Hashimoto and Mikoshiba, 2004; Molyneaux et al., 2007). A exposição pré-natal ao VPA no dia E12,5 tem mostrado alterações importantes no córtex somatossensorial. Utilizando a coloração de Nissl, a exposição ao VPA causou a morte de células neuronais nas camadas profundas do córtex somatossensorial sem afetar a espessura de cada camada, quando visualizado na idade de 8 semanas. Uma vez que estruturas como o córtex somatossensorial estão altamente implicadas com comportamentos sociais, é provável que alterações nessas regiões possam estar por trás de alterações comportamentais em animais cujas mães foram expostas ao VPA no dia E12,5 (Adolphs, 2001; Bechara et al., 2000). Essas alterações não foram observadas quando a exposição ocorreu em outros dias, como nos dias E9 e E14,5 (Kataoka et al., 2013).

Nosso grupo recentemente mostrou que há não somente um prejuízo neuronal nas camadas profundas no córtex somatossensorial de roedores expostos pré-natalmente ao VPA, como também que esses neurônios são positivos para GABA, evidenciando um prejuízo no componente inibitório nessa região (dados não publicados). Essa redução pode justificar um desbalanço entre a excitação e a inibição nessa área, o qual compromete o processamento sensorial e pode ser um recurso para alterações tanto no processamento sensorial, gerando as alterações nas responsabilidades e interesses sensoriais, como também alterações em todos os comportamentos que necessitam de componentes sensoriais, como, por exemplo, comportamentos sociais.

1.7. O balanço excitatório e inibitório no autismo e o sistema gabaérgico como foco de estudo

Hipóteses crescentes vêm sugerindo que alterações comportamentais podem estar associadas a um processamento inadequado em regiões-chave no encéfalo, as quais são mediadas por uma fina regulação entre o balanço dos componentes excitatórios e inibitórios (Bourgeron, 2009; Ebert and Greenberg, 2013; Garber, 2007; Kelleher and Bear, 2008). Isto é amplamente apoiado por evidências de pesquisas em quatro principais áreas: 1) estudos de associação gênica, os quais revelaram a existência de diversas mutações no autismo relacionadas com a formação e função de sinapses (Huguet et al., 2013; Kenny et al., 2013); 2) estudos de transcriptômica em pacientes com autismo, que encontraram variações de expressão em RNAm de redes relacionadas com a função sináptica (Voineagu et al., 2011); 3) observações em animais geneticamente modificados, nos quais alterações sinápticas são correlacionadas com o surgimento de fenótipos similares ao do autismo (Delorme et al., 2013); 4) presença de modificações sinápticas em síndromes com alta prevalência de autismo, tais como Síndrome do X Frágil e Esclerose Tuberosa (Auerbach et al., 2011).

Neste sentido, é de grande importância averiguar se as mesmas alterações estão presentes em modelos animais de autismo e, quais são os mecanismos moleculares que podem ocasioná-las. Por exemplo, já se sabe que ocorre aumento da plasticidade sináptica e de atividade elétrica devido à hiperconectividade de sinapses glutamatérgicas no córtex somatossensorial primário (Rinaldi et al., 2008) e amígdala (Markram et al., 2008) de ratos do modelo VPA.

A avaliação do córtex somatossensorial e da região da amígdala se faz bastante promissora uma vez que já é evidenciado um desbalanço entre a excitação e inibição no modelo animal VPA, onde ocorre um predomínio da excitação. Nossa hipótese reside no fato de que um prejuízo primário na inibição, como uma perda no componente neuronal GABAérgico em camadas da área somatossensorial (dados não publicados do grupo) e possivelmente alterações GABAérgicas na amígdala poderiam estar por trás das alterações

sensoriais comportamentais no modelo animal de autismo. Nosso grupo já encontrou alterações no metabolismo glutamatérgico em outras estruturas límbicas, como o hipocampo (Bristot Silvestrin et al., 2011) e, sabendo que o tratamento pré-natal com RSV foi capaz de prevenir as alterações no comportamento social, o RSV poderia estar agindo para restaurar esse desequilíbrio entre a excitação e a inibição nessas regiões-chave para o processamento sensorial.

2. HIPÓTESES E VIAS DE INVESTIGAÇÃO

Uma vez que evidências apontam a existência de um desequilíbrio entre a excitação e a inibição em regiões corticais e límbicas importantes para o processamento sensorial e, devido a alta prevalência dessas alterações na responsividade sensorial no TEA, foi levantada a proposta de analisar parâmetros tanto de sinapses excitatórias, quanto de sinapses inibitórias nos animais expostos pré-natalmente ao VPA e tratados pré-natalmente com RSV, juntamente com uma análise comportamental de natureza sensorial, relacionada ao início da vida dos animais. A partir dessa abordagem, pretendemos encontrar alvos e levantar hipóteses que contribuam para a compreensão da fisiopatologia do autismo envolvendo alterações sensoriais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

A presente dissertação teve como objetivo geral avaliar parâmetros moleculares envolvendo sinapses excitatórias e inibitórias na região da amígdala, bem como avaliar o comportamento de busca ao ninho de ratos pré-natalmente expostos ao VPA e o possível efeito protetor e preventivo do RSV nas alterações comportamentais sensoriais e moleculares.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar, no modelo animal de autismo induzido pela exposição pré-natal ao VPA com ou sem tratamento pré-natal de RSV:

- I. O nível de expressão gênica de Sinaptofisina (proteína estrutural pré-sináptica); PSD95 (proteína estrutural pós-sináptica de sinapses excitatórias) e Gefirina (proteína estrutural pós-sináptica de sinapses inibitórias) na região da amígdala;
- II. O comportamento de busca ao ninho em animais de idade P10;
- III. Interpretar as possíveis relações entre os efeitos desencadeados pelo VPA e pelo RSV, correlacionando com dados prévios do grupo e da literatura, bem como com testes comportamentais em andamento do laboratório.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Os animais utilizados foram ratos Wistar da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Todos os animais receberam ração e água *ad libitum*. No máximo quatro animais foram colocados por caixa (machos ficaram separados das fêmeas) e mantidos em ambiente climatizado ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, bem como em condições padrão de umidade, segundo as normativas do CEUA-HCPA.

4.2. Modelo animal de autismo por indução pré-natal ao ácido valpróico

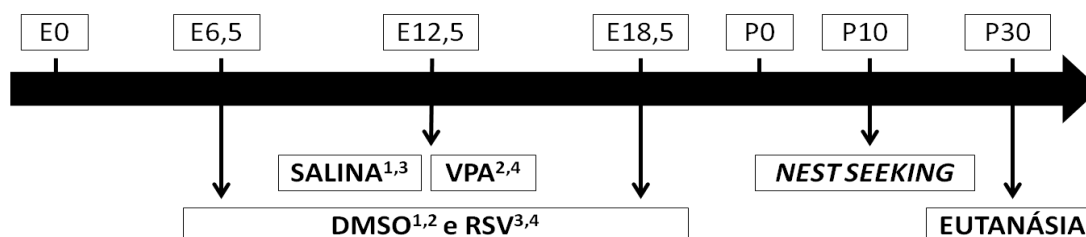
O pareamento dos animais sempre teve início às 19 horas. A escolha desse horário reflete no horário em que ocorre a indução do modelo animal de autismo (entre 12h30 e 13h30 do dia de gestação 12,5) por exposição, via intraperitoneal, ao VPA. Os animais foram retirados do pareamento às 7 horas do dia seguinte e realocados em suas caixas de convívio. No caso das fêmeas, a fecundação foi verificada por microscopia através da investigação do lavado

vaginal (Bambini-Junior et al., 2011). Quando o procedimento de verificação da fecundação indicou prenhez, estas foram alocadas em pares com outras fêmeas prenhes até o dia 18 de gestação. Após esse período, foram alojadas em caixas individuais até o nascimento da prole.

Os tratamentos a seguir descritos foram aplicados às ratas prenhes. O modelo consiste na injeção intraperitoneal de 600 mg/Kg de valproato de sódio diluído em NaCl 0,9% no dia 12,5 de gestação, como previamente descrito (Bambini-Junior et al., 2014b). Aos controles, somente a salina foi aplicada neste dia. Dois grupos receberam, via administração subcutânea, 3,6 mg/Kg de RSV dissolvido em DMSO diariamente entre os dias embrionários 6,5 e 18,5 (E6,5 e E18,5), formando assim os quatro grupos experimentais (Linha temporal):

- Controle (que recebeu DMSO do dia E6,5 ao E18,5 e salina no dia E12,5);
- VPA (que recebeu DMSO do dia E6,5 ao E18,5 e VPA no dia E12,5);
- RSV (que recebeu RSV do dia E6,5 ao E18,5 e salina no dia E12,5);
- RSV+VPA (que recebeu RSV do dia E6,5 ao E18,5 e VPA no dia E12,5).

1: Controle
2: VPA
3: RSV
4: RSV+VPA



Linha temporal: Resumo temporal dos tratamentos aplicados aos animais. RSV foi administrados por via subcutânea a dose de 3,6 mg/kg. VPA foi administrado via intraperitoneal em dose de 600 mg/kg . E0 - concepção. P0 - nascimento.

4.3. Procedimentos éticos

Todos os procedimentos foram realizados obedecendo aos preceitos éticos que competem à experimentação animal e estarão de acordo com o NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institute of Health, 2011) e com as últimas resoluções do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Toda a manipulação animal foi realizada com base na Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008 e na Resolução Normativa N.12 do CONCEA. De acordo com a Resolução Normativa N. 13 (20 de setembro de 2013), os animais foram anestesiados antes de qualquer procedimento doloroso, exceto durante as injeções de VPA, RSV e DMSO. Uma vez que o modelo animal empregado nesse estudo é induzido quimicamente, a utilização de anestésicos nessa etapa representaria um novo agente estressor e com consequências desconhecidas no estabelecimento do modelo, inviabilizando as análises propostas. O projeto foi submetido ao comitê de ética (CEUA-HCPA) em duas partes, de acordo com os procedimentos metodológicos, tendo os seguintes números de aprovação: 140432 (projeto de animais) e 140430 (projeto de material biológico). Os filhotes do sexo masculino foram eutanasiados utilizando uma injeção letal de cetamina (300 mg/Kg) e xilasina (40 mg/Kg) seguida de um método confirmatório da morte. Os ratos utilizados para procriação e os filhotes do sexo feminino foram eutanasiados através da administração via inalatória de uma dose letal de isoflurano (6-9%).

4.4. Cálculo do tamanho amostral

Para o cálculo do tamanho amostral, o software G*Power v3.0 foi utilizado. Baseando-se em dados de experimentos anteriores do laboratório e da literatura e utilizando os seguintes parâmetros ($\alpha = 0.05$; poder = 0.8; efeito de tamanho = 0.8) um cálculo de tamanho amostral "A priori" foi realizado. Assim, para quatro grupos o tamanho amostral total indicado foi 20 animais, ou seja, $n=5$ por grupo. Uma vez que o VPA e RSV são administrados na mãe, o tratamento estatístico adequado é considerar cada ninhada como um único "n". Ao fim, um indivíduo de cada ninhada ou uma média dos resultados da ninhada

originam um n de 1. Então, ao total necessitamos de 5 ninhadas de cada grupo. Segundo dados prévios do laboratório, a média de machos por ninhada é de 4 animais. O VPA não altera este valor, mas interrompe 50% das gestações. Portanto, a realização dos pareamentos necessitou 30 fêmeas em idade fértil e 10 machos. Quatro fêmeas extras foram planejadas caso ocorresse perdas não esperadas. Por fim, para a realização desse projeto e, levando em consideração o número médio de 4 animais machos por ninhada anteriormente citado, pelo menos 1 animal de 5 ninhadas diferentes compusera os grupos experimentais do presente estudo, totalizando um n de pelo menos 5 animais por grupo (controle, VPA, RSV e RSV+VPA).

4.5. Análise de expressão gênica

4.5.1. Obtenção dos *Primers*

Os *primers* foram obtidos por meio da busca na literatura de experimentos com propostas de avaliar a expressão gênica em tecidos encefálicos. Após achar a sequência, os *primers* passaram por uma série de análises confirmatórias para sua qualidade e confiabilidade. Primeiro, foi realizado múltiplos alinhamentos entre a sequência do *primer* com sequências em um banco de dados de nucleotídeos do BLAST® (diretório nucleotide Blast), ferramenta renomada da comunidade científica para essa proposta de análise. Confirmando alinhamentos específicos tanto reais, quanto preditivos para os RNA mensageiros de interesse, a sequência é analisada pela ferramenta de busca de genomas Ensembl®. Após encontrar no genoma de *Rattus norvegicus* (rato Wistar) a sequência de DNA de interesse para um dos genes de análise procurou-se onde a sequência complementar do *primer* estaria no genoma, pois o *primer* irá anelar, durante a reação de PCR, nessa porção. Para utilizarmos o *primer* ele deve passar pelo critério de alinhar com sua sequência complementar em éxons diferentes do genoma. Confirmando esse quesito, os *primers*, por fim, são avaliados quanto a sua capacidade de anelamentos internos ou inespecíficos, utilizando o software OligoAnalyzer®. A tabela 1 ilustra os *primers* analisados e utilizados para este estudo, os quais

passaram por essa avaliação e tiveram os quesitos aprovados segundo os critérios pré-estabelecidos:

Primers utilizados para análise de expressão gênica		
PSD95	Forward	CTTCTCGCCATCGTAGAGG
	Reverse	GAGAGGTCTTCAATGACACG
Gefirina	Forward	ACCCTCGCCCAGAATACCAC
	Reverse	GCTCATCAGACGGCTGCTCA
Sinaptofisina	Forward	TCAGGACTCAACACCTCAGTGG
	Reverse	AACACGAACCATAAGTTGCCAA

Tabela 1: *Primers* utilizados para a análise da expressão gênica relativa dos alvos propostos.

4.5.2. Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada utilizando reagente TRIzol®. Após a retirada das estruturas encefálicas, a região da amígdala e a região da área somatossensorial primária foram isoladas, pesadas e homogeneizadas em reagente TRIzol®, na proporção de 10 µL de reagente para cada mg de tecido. A separação de fase foi obtida por adição de clorofórmio e agitação vigorosa. Em seguida, a fase aquosa (contendo RNA total) foi isolada e o RNA foi precipitado através da adição de isopropanol. Por fim, o RNA precipitado foi lavado com etanol para remover impurezas e suspenso em água para injetáveis livre de RNases e armazenada em freezer -80°C para ser utilizado com molde na reação de transcrição reversa

4.5.3. Transcrição Reversa e Reação em cadeia da polimerase

A expressão relativa de RNA mensageiros maduros foi avaliada pela técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT qPCR). A partir do extrato de RNA obtido para cada amostra de tecido, procedeu-se à síntese de DNA complementar por meio da reação de transcrição reversa, utilizando 1,5 µg de RNA, 1µL de *primer* oligodT₁₂₋₁₈, 1µL mix de Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTP) e água para injetáveis totalizando um volume de 12 µL. Essa mistura foi incubada a 65°C por 5

minutos em um termociclador Veriti da Applied Biosystems®. Em seguida, 4 µL de tampão de transcrição reversa concentrado 5x, 2 µL de ditioneitol (DTT) 0,1 M e 1 µL de inibidor de ribonucleases (40 unidades/µL) foram adicionados à mistura inicial, e uma nova incubação a 37°C por 2 minutos foi realizada. Por fim, 1 µL da enzima transcriptase reversa M-MLV foi adicionado à mistura, e uma incubação final a 37°C por 50 minutos foi realizada, seguida da inativação da enzima a 70°C por 15 minutos, resultando um volume final de 20 µL de DNA complementar. A reação em cadeia da polimerase quantitativa foi realizada utilizando o DNA complementar (diluição 1:20) como molde para a reação, juntamente com um mix reacional contendo 2,5 µL do tampão concentrado 10x, 0,8 µL do cofator MgCl₂ 50 mM, 2,5 µL do fluoróforo SYBR-Green® 0,5 µL de mix de dNTP 10 mM cada, 0,5 µL de cada par de *primers* específicos (10 µM) para o RNA mensageiro avaliado, 0,1 µL da enzima Taq DNA Polimerase e água para injetáveis totalizando 25 µL de reação. O fluoróforo SYBR-Green® foi utilizado para detectar amplificação, de forma que os valores de CT foram utilizados para cálculo de expressão relativa de cada RNA mensageiro através do método $-\Delta\Delta CT$ (Livak and Schmittgen, 2001), utilizando o RNAm para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como controle endógeno. Após amplificação, a fluorescência da amostra foi medida numa rampa de temperatura de 60° a 95°C, para obtenção da curva de melting dos produtos amplificados. A metodologia de qPCR foi realizada num aparelho StepOne System da Applied Biosystems®.

4.6. Comportamento de busca pelo ninho (*Nest seeking behavior*)

O teste de busca pelo ninho ou *nest seeking* foi realizado para avaliar a capacidade de reconhecimento da maravalha da caixa-moradia pelo filhote através de dicas sensoriais, como o olfato, sendo essas características previamente demonstradas em animais do modelo animal de autismo (Schneider and Przewlocki, 2005).

A sala de comportamento para a análise do comportamento de busca ao ninho foi limpa e as caixas higienizadas diretamente pelo biotério a fim de não conter odores. A iluminação da sala foi fixada em 60 lux e os filhotes foram habituados à sala permanecendo em suas caixas-moradia por 30 minutos.

Para o preparo do teste, é utilizada uma caixa com dimensões padrão para a alocação individualmente de ratos. A maravalha da caixa-morada é alocada em um dos extremos da caixa de experimentação e a maravalha nova é alocada no extremo oposto, cuidando para que a distância entre elas não seja grande para o filhote alcançar (nessa idade o filhote possui um movimento do tipo “estrela” e grandes distâncias podem prejudicar na análise desse comportamento) ou pequena para que elas se encostem e misturem os cheiros. Após ambientação na sala de comportamento, o animal é alocado no centro irá se deslocar para um dos extremos. Nessa etapa, as precauções como o uso de luvas limpas sem talco para a manipulação de cada filhote foram utilizadas, de forma que entre um filhote e outro as luvas foram sempre descartadas. O tempo de deslocamento e o tempo gasto em cada maravalha são contabilizados. Outros parâmetros avaliados foram 1) lado escolhido, 2) latência para a escolha, 3) latência para chegar no lado da maravalha da caixa-moradia e 4) tempo em cada um dos lados. O tempo para o teste é 60 segundos e só é realizado 1 trial por animal.



Figura 1: Aparato para o comportamento de busca pelo ninho. A direita, maravalha do ninho, a esquerda: maravalha nova.

4.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do Programa SPSS versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL). Para os resultados obtidos por PCR em tempo real, os níveis de expressão gênica relativa entre os 4 grupos foram comparados utilizando uma ANOVA de uma via, seguido pela avaliação com o pós-teste de

Tukey. Para a análise dos resultados do comportamento de busca pelo ninho (ou *nest seeking behavior*), foi utilizado ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey para as variáveis quantitativas (latências para alcançar o ninho, mínimas latências e razão de acerto para o ninho) e foi realizado um teste de correlação de Pearson (regressão linear) para avaliar se existe alguma correlação entre o tamanho das ninhadas com a latência para alcançar o ninho.

4.8. Cuidados de biossegurança e descarte de materiais e resíduos

Os profissionais designados para a experimentação animal possuíam instrução prévia sobre os cuidados de biossegurança a serem tomados. Os equipamentos de proteção individual, tais como luvas, máscaras e jalecos, foram utilizados sempre que necessários. Adicionalmente, atenção especial foi dada à utilização e descarte dos materiais perfurocortantes, assim como os cuidados de biossegurança necessários na manipulação animal e de resíduos químicos e biológicos. O descarte e tratamento dos resíduos seguiram as rotinas estabelecidas pela Comissão de Gestão Ambiental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O material biológico de descarte dos animais foi acondicionado em saco plástico e armazenado em freezer, para posterior incineração. Os materiais perfurocortantes foram descartados em coletores padronizados e os resíduos químicos foram armazenados em recipientes específicos até o recolhimento pelo serviço de higienização.

5. RESULTADOS

5.1. Comportamento de busca pelo ninho (*nest seeking behavior*)

Todos os resultados são apresentados por média \pm desvio padrão, exceto os resultados de razão de acertos para a maravalha do ninho (estes estão expressos em razão). As figuras contemplam os dados para a latência de alcance da maravalha do ninho, a menor latência para ir em direção ou à maravalha do ninho ou à maravalha nova, a razão de acerto quando o animal se dirigiu à maravalha do ninho e uma análise de correlação de Pearson

(regressão linear) entre os tamanhos das ninhadas e as médias das latências. A tabela 2 resume os principais resultados encontrados para esta etapa, e pode ser encontrada no final da sessão.

Os tempos de latência para alcançar o ninho, encontram-se na figura 2A. É possível observar que tanto o grupo DMSO, quanto o grupo RSV apresentaram tempos similares (DMSO: $17,124 \pm 3,493$, $N_{\text{ninhada}}=8$; RSV: $17,459 \pm 3,219$, $N_{\text{ninhada}}=7$). O grupo VPA (VPA: $32,184 \pm 13,438$, $N_{\text{ninhada}}=5$) apresentou um aumento estatisticamente significativo em relação tanto ao grupo DMSO ($p=0,0063$), quanto ao grupo RSV ($p=0,0096$). O grupo RSV+VPA (RSV+VPA: $27,879 \pm 7,074$, $N_{\text{ninhada}}=6$) apresentou, da mesma forma que o grupo VPA, um aumento na latência para alcançar o ninho, porém somente em relação ao grupo DMSO ($p=0,0486$).

Na avaliação da menor latência para decisão (o animal se dirigir ou para a maravalha do ninho, ou para a maravalha nova; figura 2B), os grupos DMSO e RSV apresentam tempos similares (DMSO: $14,881 \pm 3,630$, $N_{\text{ninhada}}=8$; RSV: $12,271 \pm 3,582$, $N_{\text{ninhada}}=9$). O grupo VPA (VPA: $28,367 \pm 7,860$, $N_{\text{ninhada}}=4$) apresentou um aumento estatisticamente significativo em relação tanto ao grupo DMSO ($p=0,0002$), quanto ao grupo RSV ($p<0,0001$). O grupo RSV+VPA (RSV+VPA: $24,808 \pm 2,690$, $N_{\text{ninhada}}=5$) apresentou um aumento nesse parâmetro tanto em relação ao grupo DMSO ($p=0,029$), quanto em relação ao grupo RSV ($p=0,0002$).

Ao avaliar a razão de animais que atingiram a maravalha do ninho (figura 2C), os grupos DMSO, RSV e RSV+VPA apresentaram porcentagens de acerto similares (DMSO: $0,95$, $N_{\text{ninhada}}=8$, $N_{\text{animais}}=80$; RSV: $0,82$, $N_{\text{ninhada}}=7$, $N_{\text{animais}}=73$; RSV+VPA: $0,90$, $N_{\text{ninhada}}=6$, $N_{\text{animais}}=41$). O grupo VPA (VPA: $0,66$, $N_{\text{ninhada}}=5$, $N_{\text{animais}}=36$), no entanto, apresentou uma redução estatisticamente significativa em relação ao grupo DMSO e RSV+VPA ($p=0,002$ e $p=0,0252$, respectivamente).

Uma vez que o tamanho da prole não eram os mesmos, foi realizado um teste de correlação de Pearson (regressão linear), no intuito de avaliar se existe correlação entre o tamanho da prole (número de filhotes) e os valores de latência para alcançar o ninho. O teste de correlação de Pearson que,

significativamente, a correlação avaliada entre o tamanho da prole e os valores de latência para alcançar o ninho é muito baixa ($r^2=0,1385$, $p=0,0468$, Figura 2D).

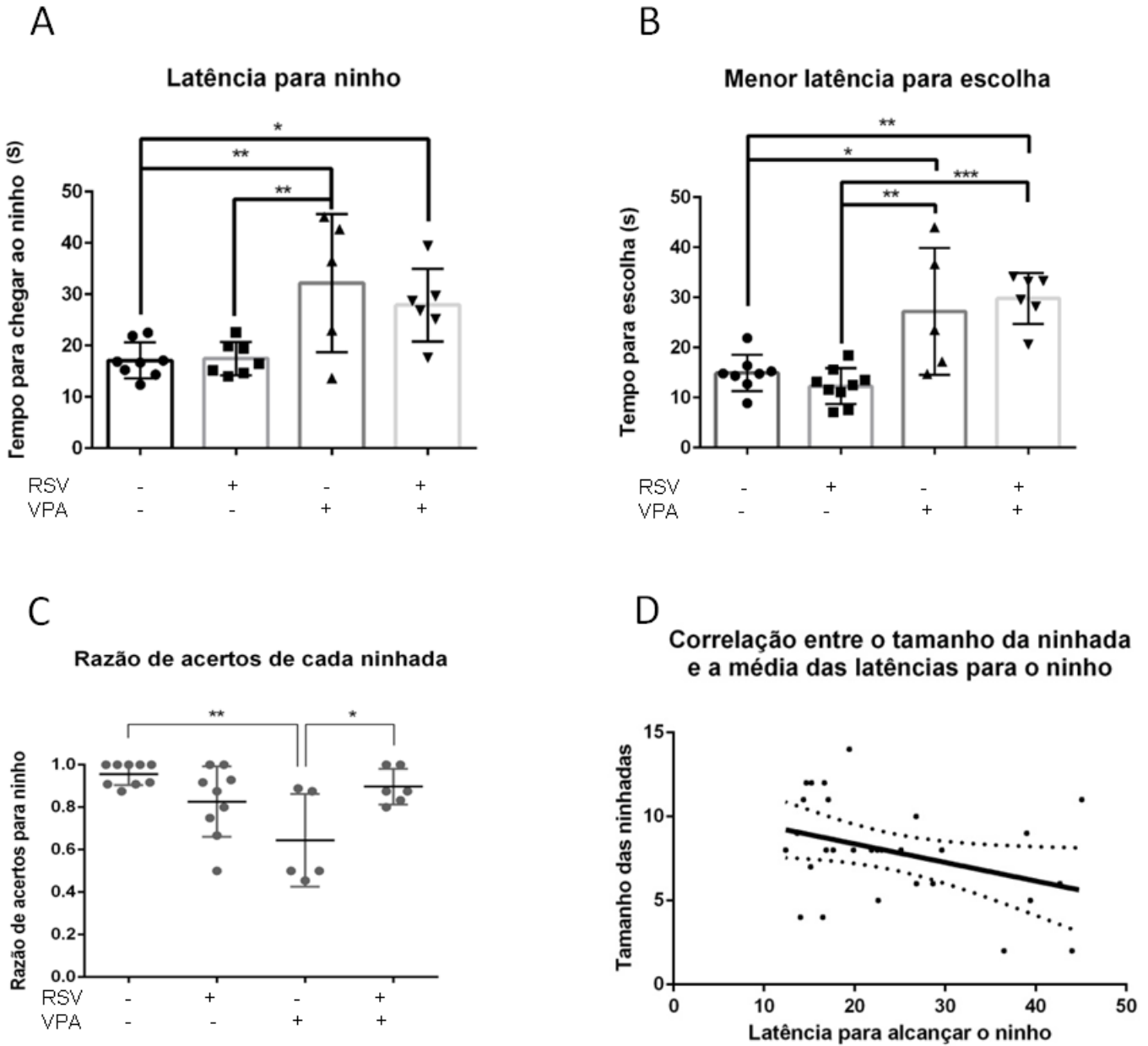


Figura 2: Análise dos parâmetros do comportamento de busca pelo ninho pelos animais pré-natalmente expostos ao VPA e tratados com RSV. A, latência para alcançar o ninho, em segundos. B, menor latência para escolha. C, razão de animais que atingiram para a maravalha do ninho. D, análise, por correlação de Pearson, do número de animais que compõe o n amostral com a latência para alcançar o ninho.

Efeitos do VPA e do RSV no comportamento de busca pelo ninho			
Latência para alcançar o ninho (em segundos)	Efeito do VPA	↑	$p=0,0063$
	Efeito do RSV	=	
	Interação	↑	$p=0,0486$
Menor latência para escolha (em segundos)	Efeito do VPA	↑	$p=0,0002$
	Efeito do RSV	=	
	Interação	↑	$p=0,0029$
Porcentagem de acertos por ninhada (em %)	Efeito do VPA	↓	$p=0,0020$
	Efeito do RSV	=	
	Interação	=	

Tabela 2: Resumo dos resultados encontrados na parte de experimentação comportamental pela avaliação do comportamento de busca pelo ninho.

5.2. Análise da expressão gênica de proteínas sinápticas na amígdala

5.2.1. Região da Amígdala

Todos os resultados são apresentados por média \pm desvio padrão. As figuras contemplam os dados para a expressão gênica relativa de Sinaptofisina, PSD95 e Gefirina na região da amígdala. A tabela 3 resume os principais achados nessa área encefálica.

5.2.1.1. PSD95

A avaliação da expressão gênica relativa para o gene PSD95 encontra-se na figura 3. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados (DMSO: $1,243 \pm 0,847$; RSV: $1,12 \pm 0,35$; VPA: $0,844 \pm 0,185$; RSV+VPA: $1,243 \pm 0,236$, $N_{\text{ninhada}}=4$).

PSD95 - Região da Amígdala

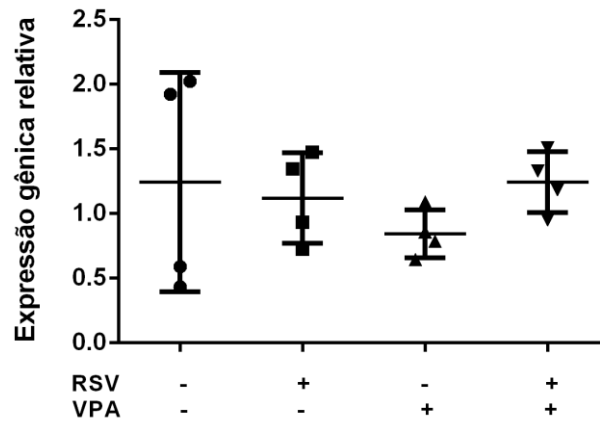


Figura 3: Análise da expressão gênica relativa para o gene PSD95. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

5.2.1.2. Gefirina

A avaliação da expressão gênica relativa para o gene Gefirina encontra-se na figura 4. O grupo RSV apresentou aumento em relação aos outros grupos avaliados (DMSO: $1,0004 \pm 0,03$; RSV: $1,216 \pm 0,07$; VPA: $1,042 \pm 0,08$; RSV+VPA: $1,037 \pm 0,023$; $N_{\text{ninhada}}=4$, $p < 0,01$).

Gefirina - Região da Amígdala

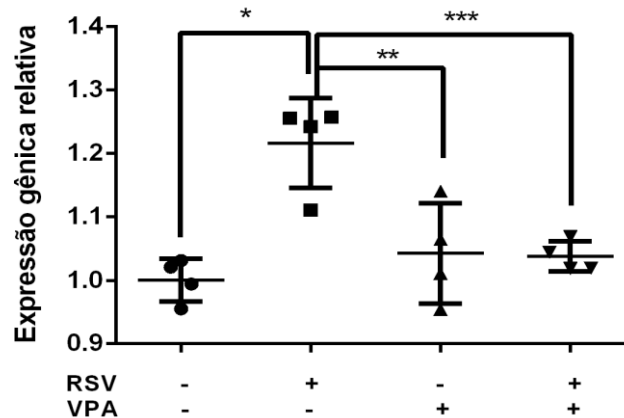


Figura 4: Análise da expressão gênica relativa para o gene Gefirina. Foram encontradas diferenças significativas entre a expressão gênica relativa da Gefirina do grupo RSV em relação aos grupos DMSO (* $p=0,0009$), VPA (** $p=0,004$) e RSV+VPA (** $p=0,0049$).

5.2.1.3. Sinaptofisina

A avaliação da expressão gênica relativa para o gene Sinaptofisina encontra-se na figura 5. O grupo DMSO e o grupo VPA apresentaram níveis de expressão gênica relativa similar entre si (DMSO: $1,026 \pm 0,269$; VPA: $1,005 \pm 0,275$; $N_{\text{ninhada}}=4$). O grupo RSV+VPA (RSV+VPA: $0,548 \pm 0,206$; $N_{\text{ninhada}}=4$) apresentou uma redução significativa da expressão gênica relativa em comparação com o grupo DMSO e VPA ($p=0,0239$ e $p=0,0298$, respectivamente). Os níveis de expressão gênica entre os grupos RSV (RSV: $0,532 \pm 0,183$; $N_{\text{ninhada}}=4$) e RSV+VPA são similares; o grupo RSV não apresentou diferenças significativas de expressão gênica relativa quando comparado com o grupo DMSO ($p=0,0520$) ou VPA ($p=0,0645$).

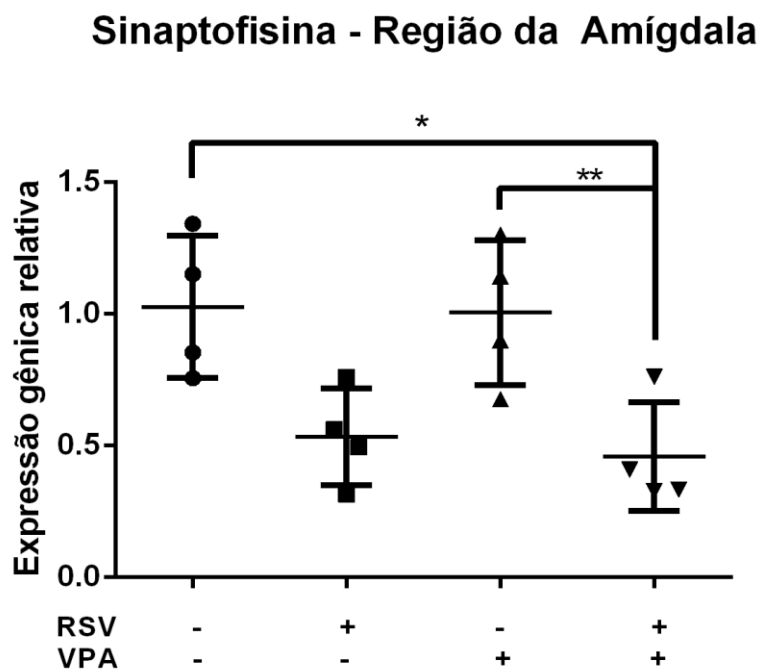


Figura 5: Análise da expressão gênica relativa para o gene Sinaptofisina. Foram encontradas diferenças significativas entre a expressão gênica relativa da Sinaptofisina do grupo RSV+VPA em relação aos grupos DMSO ($*p=0,0239$) e VPA ($**p=0,0298$).

Efeitos do VPA e do RSV na expressão gênica relativa de Sinaptofisina, PSD95 e Gefirina			
Sinaptofisina (SYP)	Efeito do VPA	=	
	Efeito do RSV	↓	$p=0,0520$
	Interação	↓	$p=0,0239$
PSD95	Efeito do VPA	=	
	Efeito do RSV	=	
	Interação	=	
Gefirina (GEPH)	Efeito do VPA	=	
	Efeito do RSV	↑	$p=0,0009$
	Interação	=	

Tabela 3: Resumo dos principais resultados encontrados na avaliação da expressão gênica relativa para proteínas sinápticas encontradas na porção pré-sináptica (Sinaptofisina) e pós-sináptica (PSD95, em sinapses excitatórias e Gefirina, em sinapses inibitórias) na região da amígdala.

6. DISCUSSÃO

6.1. Análise comportamental

No presente estudo avaliamos a região da amígdala por ser uma estrutura-chave na integração sensorial com a adição de elementos de conteúdo emocional a esse tipo de informação. Para isso, foi avaliado o comportamento de busca pelo ninho em quatro grupos de animais, conforme descrito na metodologia (DMSO, RSV, VPA e RSV+VPA). Nossos dados apontam, pela primeira vez, uma importante prevenção por RSV sobre alterações comportamentais induzidas pelo VPA no parâmetro de “acertos ao ninho”.

Comportamentos pré-programados que são praticados na vida intrauterina, aliado ao aprendizado do cheiro e do som do “cuidador” ou da mãe, facilitam e auxiliam no estabelecimento do comportamento de vínculo. Esses comportamentos são combinados com o aprendizado pós-natal do filhote, onde

outros componentes da mãe ou do cuidador são rapidamente aprendidos (Landers and Sullivan, 2012). Por exemplo, em poucas horas após o nascimento, os neonatos se orientam por meio da voz ou das vocalizações da mãe, devido tanto às experiências pré-natais quanto pós-natais (DeCasper and Fifer, 1980). O odor também influencia a resposta do filhote à mãe, expressada pela orientação para a fonte do odor e pela habilidade do odor em atenuar o choro (Schaal et al., 1995; Sullivan and Toubas, 1998). Esses dados ilustram o quão complexo é o comportamento de vínculo e além de ressaltar a importância de estímulos sensoriais na regulação do comportamento e fisiologia do indivíduo.

O comportamento de vínculo foi identificado em diversas espécies, incluindo roedores (Alberts and May, 1984; Blass and Teicher, 1980; Polan and Hofer, 1998; Risser and Slotnick, 1987; Shionoya et al., 2007; Teicher et al., 1978). Durante esse tempo de dependência da mãe, o comportamento dos neonatos foca em manter contato e proximidade física com a mãe. Os estímulos sensoriais controlando esse comportamento variam entre as espécies, mas nos ratos, esse comportamento é guiado e controlado pelo odor materno (Galef and Kaner, 1980; Leon, 1992). Filhotes recém-nascidos cegos e surdos, em que só se localizam pelo odor da mãe ou do ninho, não apresentam diferenças no aprendizado de vínculos (Landers and Sullivan, 2012).

A avaliação de comportamento de busca pelo ninho, do presente estudo, corroborou com dados previamente descritos na literatura, que descrevem déficits sensoriais olfatórios em virtude da exposição pré-natal ao VPA (Favre et al., 2013a; Kolozsi et al., 2009; Schneider and Przewlocki, 2005). O RSV foi capaz de prevenir alterações sensoriais (visto que o grupo RSV+VPA teve a mesma razão de acertos do grupo controle), porém não foi capaz de prevenir as alterações quanto a latência para chegar no ninho e a mínima latência para alcançar qualquer maravalha disponível, seja ela a do ninho, seja ela uma estéril. Esses dados indicam que o RSV não é capaz de prevenir todas as alterações fenotípicas induzidas por VPA. Os prováveis alvos do VPA são relacionados à migração dos neurônios olfatórios em direção ao bulbo olfatório, alterando a sensação olfativa do animal (Foti et al., 2013) e em possíveis alvos neurais envolvendo o comportamento de vínculo, como a amígdala (Landers

and Sullivan, 2012; Rigon et al., 2015a). Ainda, o grupo VPA pode sofrer de déficits primários na execução motora do comportamento. Esse fato é corroborado pelo fato de ambos os grupos tratados com VPA apresentarem maior tempo para alcançar qualquer maravalha. Ainda, mecanismos compensatórios, como a preferência por odores familiares, podem interferir no desenvolvimento e, portanto, guiar os animais para o ninho (Favre et al., 2013a). Dessa forma, o RSV pode estar agindo em vias neurais relacionadas com a preferência pelo odor do ninho (e da mãe, por consequência), reestabelecendo o comportamento de vínculo com esses componentes sensoriais.

Dados na literatura sugerem que, em humanos, os núcleos da amígdala possuem papéis cruciais para o comportamento afetivo de “ligação” (do inglês, *attachment behavior*) (Rigon et al., 2015b). O desenvolvimento sináptico na amígdala começa entre o 5º dia de vida, com picos entre P10 e P20 (Landers and Sullivan, 2012). Muitos estudos mostram a hiperativação da amígdala tanto em pacientes com TEA, quanto no modelo VPA, como um componente na relação entre o estabelecimento de vínculos e a adição de conteúdos aversivos a informações sensoriais (Amaral and Corbett, 2003; Bachevalier and Loveland, 2006; LeDoux, 2003; Muller et al., 2006; Swartz et al., 2013). O RSV, portanto, pode estar agindo em áreas neurais como a região da amígdala, no intuito de restabelecer o comportamento de vínculo, prevenindo as alterações globais encontradas no comportamento de busca ao ninho. Estudos posteriores devem ser realizados para avaliar o perfil das principais proteínas sinápticas, como Sinaptofisina, PSD95 e Gefirina, entre outras moléculas promissoras (como as neuroliginas, proteínas envolvidas na estabilização de sinapses), a fim de buscar mecanismos que possam explicar uma restauração no balanço excitatório-inibitório nessa região.

6.2. Análise da expressão gênica relativa

O presente estudo avaliou os níveis de expressão gênica de 3 proteínas sinápticas envolvidas com o TEA: PSD95, Gefirina e Sinaptofisina, na região da amígdala no modelo do VPA, com e sem o tratamento com RSV. Nossos

dados mostram, pela primeira vez, uma complexa interação que ocorre entre o tratamento com RSV e o tratamento com VPA, bem como os efeitos do RSV sobre os níveis de expressão gênica relativa de alguns desses parâmetros.

PSD95

O presente estudo avaliou os níveis de expressão gênica de PSD95 aos 30 dias de vida na região da amígdala. Nossos dados, apesar de não apresentarem diferenças significativas, revelam uma tendência a redução nos níveis de PSD95 no grupo VPA (figura 3). Como anteriormente citado, o balanço entre a excitação e a inibição é implicado de maneira casual no controle de comportamentos aversivos e de medo em pacientes com TEA e no modelo animal de autismo (Amaral and Corbett, 2003; Wolff et al., 2014).

Em 2013, análises similares do mesmo modelo demonstraram um aumento da quantidade de PSD95 em outras estruturas encefálicas, como o córtex e o hipocampo, este último, pertencendo ao sistema límbico juntamente da amígdala (Kim et al., 2013). Isso pode se dever ao fato do referido estudo utilizar animais de idades diferentes das quais o presente estudo avaliou, bem como a forma de avaliação realizada por Kim e colaboradores, a qual foi baseada em uma análise proteica, enquanto o presente estudo realizou uma análise molecular.

De toda forma, os neurônios da região da amígdala do modelo VPA, uma hiperconectividade e hiperplasticidade (Markram et al., 2008; Rinaldi et al., 2008). Essa hiperconectividade pode dever-se ao fato de existir um aumento de sinapses, as quais culminariam com o aumento de Sinaptofisina, um marcador típico de sinapses. Apesar de não termos encontrado alterações significativas no nível de expressão gênica de PSD95 no grupo VPA, em relação ao controle, análises proteicas deverão ser realizadas no intuito de observar se o VPA ou o RSV estão modulando expressão proteica. O número amostral, especialmente do grupo do DMSO deve ser aumentado, no intuito de reduzir o elevado desvio padrão.

Gefirina

Ao avaliar a expressão gênica relativa de Gefirina, observamos aumento significativo no grupo RSV, quando comparado aos demais grupos (figura 4).

Dados na literatura revelam que mutações no gene da Gefirina é um fator de risco para desordens do neurodesenvolvimento, como o TEA, esquizofrenia e epilepsia (Lionel et al., 2013a). Ainda, foi demonstrado que na epilepsia do lobo temporal o RNA mensageiro da Gefirina pode sofrer um *splicing* anormal, gerando um RNA mensageiro que não possui todos os éxons que codificam o G-domínio da proteína Gefirina (Lionel et al., 2013b). Dessa forma, as possíveis alterações induzidas pelo VPA possam estar sendo realizadas em nível de tradução, e não em nível de transcrição.

Mais estudos deverão ser realizados para entender os efeitos das administrações do RSV e do VPA nessa região encefálica e as mesmas análises deverão ser feitas aos 10 dias de vida para correlacionar os dados com o comportamento de busca pelo ninho.

Sinaptofisina

Com relação a Sinaptofisina, observou-se uma redução significativa na expressão gênica, somente no grupo RSV+VPA (figura 5). O grupo RSV apresenta uma tendência de redução *per se*.

Uma vez que dados da literatura indicam uma hiperativação na região da amígdala (Green et al., 2013; Markram et al., 2008; Rinaldi et al., 2008), não foi encontrada alterações no número de sinapses a nível de RNA mensageiro nessa região. Outros estudos avaliando a Sinaptofisina no modelo VPA em córtex e hipocampo revelaram um aumento dos níveis proteicos de Sinaptofisina (Kim et al., 2013). É possível que, da mesma forma que na discussão quanto a Gefirina e PSD95, o VPA e o RSV possam estar agindo a nível proteico nesse cenário.

6.3. Possíveis mecanismos de ação do VPA e do RSV

Dados do nosso grupo demonstram o efeito protetor do RSV quando administrado pré-natalmente em ratas prenhes induzidas pelo VPA nas alterações do comportamento social (Bambini-Junior et al., 2014b) e, no presente trabalho, nas alterações do comportamento sensorial no modelo animal de autismo. Apesar de algumas evidências (Kataoka et al., 2013; Tyzio et al., 2014), não existe consenso a respeito do mecanismo molecular pelo qual o VPA possa estar desencadeando o autismo em pacientes ou características comportamentais do tipo autista no modelo animal (Bambini-Junior et al., 2014a). Entretanto, sua atividade inibitória em deacetilases de histona parece ser importante para esses efeitos (Kataoka et al., 2013). Por outro lado, o RSV é amplamente conhecido por exercer parte de seus efeitos via regulação do nível e da ativação de sirtuínas (enzimas membros da classe III de deacetilases de histonas) de uma forma substrato-específica (Lakshminarasimhan et al., 2013). Dessa forma, mais estudos deverão ser realizados para investigar os mecanismos epigenéticos por trás das administrações de RSV e VPA, buscando, especialmente, efeitos onde uma molécula possa estar gerando efeitos antagônicos na outra.

Uma vez que o RSV pode estar presente em diferentes concentrações na dieta (Vang et al., 2011), é importante observar relações entre alterações nutricionais na gestante e o desfecho na prole. Apesar de apresentar um papel importante na prevenção de defeitos do fechamento do tubo neural (Castro et al., 2014), a relação entre a ingestão de folato durante a gestação e a incidência de TEA nos filhos, é tema de debate e apresenta resultados controversos (Kamila Castro). A própria ingestão de RSV durante a gestação, em doses diferentes das utilizadas no presente estudo, foi relacionada com más-formações na prole (Henry and Witt, 2006; Roberts et al., 2014; Wang and Leung, 2007). Fica claro dessa forma que, não somente medicamentos, mas elementos presentes na nutrição da gestante podem influenciar significativamente o desenvolvimento do embrião/feto.

Outro tópico promissor no estudo do autismo é a relação entre alterações imunes durante a gestação e a fisiopatologia do TEA (Ashwood et al., 2011).

Os achados de alteração imune em pessoas com TEA, como a elevação de citocinas plasmáticas (Ashwood et al., 2011), somados as alterações similares observadas em modelos animais de TEA (Bauman et al., 2014; Schneider et al., 2008) ajudam a estabelecer a natureza neuroimune desse transtorno.

6.4. Limitações das análises

Tamanho amostral e gênero dos animais

Uma vez que a indução do modelo animal de autismo por VPA acarreta em uma interrupção de 50% dos nascimentos por alteração na implantação dos embriões (Gürgen et al., 2012) o número amostral dos grupos que receberam o VPA (VPA e RSV+VPA) possui uma quantidade menor de ninhadas do que os demais grupos. Essa diferença no tamanho amostral pode estar por trás dos elevados desvios padrão apresentados pelas médias entre os grupos. Primamos por manter o número de animais mantidos por ninhada em torno de 8. Algumas ninhadas foram obtidas apenas com um número de 2 animais, o que aumenta a possibilidade de médias muito diferentes e altos desvios padrões. Dessa forma, os experimentos comportamentais avaliando de busca ao ninho continuam a ser executados para minimizar esses fatores.

Com o intuito de avaliar o viés que o tamanho amostral poderia representar para a compreensão desses dados, foi realizada análise de correlação, por regressão linear, entre o tamanho das ninhadas e as latências para alcançar o ninho. Era possível que um maior número de animais compondo uma ninhada ou ninhadas contendo animais de gêneros diferentes (Kosten and Nielsen, 2014) pudesse influenciar no cuidado materno ou na procura da mãe pelos filhotes e repercutindo no vínculo estabelecido entre o filhote e a mãe na avaliação do *nest seeking*. Nossos dados indicam que, mesmo em ninhadas grandes, não existe correlação entre o tamanho da amostra e as latências para alcançar o ninho (figura 2D).

Uma vez que nesse estudo as ninhadas foram sexadas apenas após o desmame (PD 21), o comportamento de busca pelo ninho foi realizado incluindo machos e fêmeas das ninhadas. Estudos revelam que, nesse modelo

animal, características do tipo-autista são mais presentes em ratos machos do que em ratas fêmeas (Kim et al., 2013; Schneider et al., 2008), o que reflete dados de diferença de gênero no TEA, o qual afeta 5 vezes mais homens do que mulheres (Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 2014).

Idade das análises comportamental (P10) e de expressão gênica relativa (P30)

Um viés importante que deve ser considerado ao analisar os dados dessa dissertação são as diferenças nas idades entre as análises: as análises de expressão gênica relativa ocorreram aos 30 dias de vida, onde os animais foram eutanasiados, enquanto que as análises comportamentais foram realizadas aos 10 dias de vida, onde o animal utiliza majoritariamente a discriminação olfatória para localizar o ninho. Dados da literatura indicam que experiências motoras e sensoriais fazem parte do vasto número de agentes que contribuem para o desenvolvimento do sistema nervoso na vida pós-natal (Kolb and Gibb, 2011) e que idades críticas, como os 28 dias de vida pós-natal (P28), estão envolvidas com o remodelamento sináptico em roedores (Selemon, 2013a). Ainda, dados recentes sugerem que, em ratos, o pico da densidade sináptica em estruturas envolvendo associação de informações sensoriais, como o córtex pré-frontal ocorre em P31, com o decréscimo dessa densidade até P57-P60 (início da vida adulta) (Selemon, 2013b). Estudos no córtex olfatório revelam que, na camada glomerular, a densidade de sinapses alcança o pico entre P15-P20 e, após esse período, ela vagarosamente decai enquanto que, nas camadas granulares internas, a densidade sináptica continua aumentando até P44, em virtude de novos interneurônios chegando nessa região (Treloar et al., 2010).

Ainda, nosso grupo está realizando uma série de comportamentos ao longo da vida do animal, a fim de observar quais comportamentos são prevenidos pela administração pré-natal do RSV visando melhor compreender a interação entre o RSV e o VPA. Dessa forma, a análise molecular se expandiu até os 30 dias, uma vez que outro comportamento sensorial importante envolvendo as vibrissas do animal é realizado aos 28-30 dias de

vida – o comportamento *Whisker Nuisance Task* (WNT). Uma vez que esses dados inéditos mostram um efeito preventivo do RSV nas alterações sensoriais no modelo animal de autismo, é muito possível que essa interação entre as duas moléculas possa dar base ao entendimento de mecanismos fisiopatológicos envolvendo alterações sensoriais, e é fundamental a análise de outros comportamentos para entender até onde esse efeito preventivo do RSV ocorre. O número amostral de animais para o teste WNT está terminando de ser alcançado, com resultados apontado, também, para uma possível prevenção mediada por RSV (dados não publicados).

Dessa forma, é muito provável que existam diferenças quanto a expressão gênica relativa de proteínas sinápticas em P10 e P30 nos ratos e, para uma análise mais fiel ao comportamento observado, esse estudo deverá contar, como perspectiva, com análises de expressão gênica relativa para os mesmos parâmetros, mas na idade de 10 dias pós natais, a fim de entender como está a conectividade sináptica e o balanço excitatório-inibitório no período em que o comportamento de busca pelo ninho é realizado.

Ausência de análise proteica

Estudos do nosso laboratório com córtex pré-frontal medial e hipocampo, duas estruturas que se valem de informações sensoriais e possuem função associativa e límbica, respectivamente, demonstram que o RSV e o VPA podem ter pontos de regulação ora a nível transcricional, ora a nível traducional, dependendo da proteína avaliada (dados do grupo não publicados). É necessário, nesse contexto, realizar análises de transcritos e de proteínas para as mesmas amostras, em busca da avaliação dos pontos de regulação do RSV e do VPA para a região da amígdala.

Em nível da microcircuitaria, estudos recentes têm revelado alterações no córtex somatossensorial, bem como na região da amígdala lateral de ratos VPA. Em particular, o aumento da probabilidade de conexões locais entre as células piramidais (Rinaldi et al., 2008) e aumento da plasticidade no córtex somatossensorial (Markram et al., 2008). O aumento da resposta ao medo também tem sido identificado como uma potencial anormalidade no TEA, o qual é associado com hiperresponsividade e hiperplasticidade da amígdala

(Markram et al., 2008). Dessa forma, espera-se que os níveis de PSD95 estejam aumentados nos animais VPA, uma vez que memórias duradouras relacionadas ao medo, característica observada em muitos indivíduos com TEA e no modelo animal por indução ao VPA (Lin et al., 2013; Sui and Chen, 2012), necessitam do aumento proteico de PSD95 (Fitzgerald et al., 2015).

Baseado nesses estudos e, levando em consideração a ação tanto do VPA quanto do RSV em múltiplos níveis nos processos celulares, é necessário realizar uma análise proteica dos níveis de PSD95, Gefirina e Sinaptofisina, na idade de 10 dias, juntamente com uma análise transcricional de seus RNA mensageiros na mesma idade. Espera-se, da mesma forma que foi visto em estruturas associativas como o córtex pré-frontal medial (dados do nosso grupo não publicados), o RSV possa estar mediando uma redução dos níveis de PSD95 na região da amígdala, possibilitando a explicação da prevenção das alterações sensoriais encontradas no comportamento de busca pelo ninho da presente dissertação.

Marcos do desenvolvimento

A partir dos resultados comportamentais obtidos nesse presente estudo, foi levantada a questão se existe algum atraso do desenvolvimento nos animais que receberam tanto o VPA, quanto o RSV. De fato, estudos avaliando os marcos de desenvolvimento de animais expostos pré-natalmente ao VPA indicam que há alterações importantes em diversos aspectos, mas, principalmente, naqueles relacionados a discriminação olfatória e no comportamento de busca pelo ninho (Favre et al., 2013b). Estudos mostram que os animais VPA possuem alterações na discriminação olfatória, visualizada pelo aumento considerável na latência para alcançar a maravalha do ninho em relação ao grupo controle (Favre et al., 2013b; Schneider and Przewlocki, 2005).

Nossos dados para os animais do grupo VPA corroboram os dados presentes na literatura, apontando alterações importantes na discriminação olfatória nesses animais. No entanto, não se tem dados sobre os marcos do desenvolvimento para os animais que foram expostos pré-natalmente ao VPA e tratados pré-natalmente com RSV. É de suma importância para experimentos

futuros analisar os marcos do desenvolvimento nesses animais, no intuito de avaliar se os dados observados nos animais RSV+VPA em relação a latência em alcançar o ninho e menor latência (figura 2A e 2B) podem ser em decorrência de uma não-prevenção do RSV nas alterações ligadas ao desenvolvimento. É possível que o RSV esteja agindo como um mecanismo preventivo somente para as alterações olfatórias, uma vez que o grupo obteve uma razão de acerto similar ao grupo RSV e ao grupo DMSO (figura 2C). Dessa forma, para os experimentos futuros, os marcos do desenvolvimento serão avaliados para os 4 grupos de análise, no intuito de verificar se o RSV é capaz de prevenir tanto alterações olfatórias, quanto alterações no desenvolvimento do animal.

7. CONCLUSÕES

Dessa forma, podemos concluir que o RSV é uma molécula promissora e ferramenta-chave no estudo da etiologia e fisiopatologia do TEA. Estudos do nosso grupo vêm apontando o efeito preventivo da administração pré-natal do RSV no modelo animal VPA (Bambini-Junior et al., 2014b) e o presente estudo se soma a essa trajetória, mostrando pela primeira vez um efeito preventivo em alterações sensoriais no modelo animal de autismo por indução pré-natal ao VPA.

Este estudo também avalia a região da amígdala, uma estrutura-chave para o estabelecimento do comportamento de vínculo entre o filhote e a mãe no início da vida, e, possivelmente, levanta hipóteses consistentes do possível efeito do RSV nessa região, como substrato de ação preventiva das alterações mediadas pelo VPA.

Apesar das limitações do estudo, os dados de expressão gênica relativa apontam diferenças importantes para 3 das principais proteínas sinápticas, evidenciando a relação entre alterações sinápticas e o TEA.

8. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

O presente estudo abre as seguintes perspectivas para o nosso grupo:

- Aumentar o n experimental para as análises aqui reportadas, especialmente nos dados que apresentaram tendências;
- Repetir os experimentos de PCR em tempo real utilizando outros genes de controle endógeno;
- Expandir as análises de PCR para genes de receptores de neurotransmissores, como mGluR5, GABA_A e GABA_B, para aprofundar a avaliação do papel de alterações fisiologia da amígdala;
- Realizar experimentos de imunofluorescência e co-localização dos pares de proteínas Sinaptofisina-PSD95 e Sinaptofisina-Gefirina, como um parâmetro de quantificação do número de sinapses excitatórias e inibitórias. A razão dessa análise fornece evidências mais sólidas para análise do balanço excitatório-inibitório;
- Realizar experimentos de imunofluorescência para subpopulações neuronais residentes na amígdala, como os interneurônios positivos para parvalbumina, importantes e já alvos de estudo no modelo animal de autismo (Barnes et al., 2015; Sohal et al., 2009);
- Expandir as análises para outras regiões encefálicas importantes para o processamento e comportamento sensorial e todos os comportamentos que forem prevenidos pelo RSV quando pré-natalmente administrado em ratas que receberam VPA. Uma avaliação comportamental completa dos animais dos 4 grupos referidos neste presente estudo está em vias de finalização no nosso laboratório, avaliando diversos fenótipos centrais e associados ao autismo. As regiões do córtex pré-frontal medial, área somatossensorial primária, cerebelo e hipocampo são contemplados nessas análises e serão analisados de acordo com os resultados dos testes comportamentais;
- Expandir as análises de neurodesenvolvimento, no doutorado, estudando a migração neuronal e os efeitos da administração, tanto do VPA, quanto do RSV

na organização cortical de regiões importantes para o processamento sensorial.

9. APOIO FINANCEIRO

Este estudo foi desenvolvido primariamente devido ao aporte financeiro fornecido pelos projetos FIPE-HCPA 14-0432 e 14-04301. Além disso, foi apoiado pelo Edital Universal- CNPq 14/2013 nº484145/2013-4 e por recursos do PROAP da PROPG-UFRGS, e os estudantes envolvidos com sua realização receberam bolsas de estudo do CNPq, CAPES ou PROPESQ-UFRGS.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adolphs, R., 2001. The neurobiology of social cognition. *Curr Opin Neurobiol* 11, 231–239. doi:10.1016/S0959-4388(00)00202-6
- Alberts, J.R., May, B., 1984. Nonnutritive, thermotactile induction of filial huddling in rat pups. *Dev. Psychobiol.* 17, 161–181. doi:10.1002/dev.420170207
- Aldinger, K.A., Kogan, J., Kimonis, V., Fernandez, B., Horn, D., Klopocki, E., Chung, B., Toutain, A., Weksberg, R., Millen, K.J., Barkovich, A.J., Dobyns, W.B., 2012. Cerebellar and posterior fossa malformations in patients with autism-associated chromosome 22q13 terminal deletion. *Am J Med Genet A* 161A, 131–136. doi:10.1002/ajmg.a.35700
- Amaral, D.G., Corbett, B.A., 2003. The amygdala, autism and anxiety. *Novartis Found. Symp.* 251, 177–187; discussion 187–197, 281–297.
- American Psychiatric Association, 2000. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision (DSM-IV-TR)*, Text. doi:10.1176/appi.books.9780890423349
- American Psychiatric Association (APA), 1994. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition - DSM IV*.
- American Psychiatry Association (APA), 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition, 5th Ed.* ed. American Psychiatric Publishing, Inc, Washington, DC. doi:10.1176/appi.books.9780890425596.893619
- Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I.N., Van de Water, J., 2011. Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. *J Neuroimmunol* 232, 196–199. doi:S0165-5728(10)00475-3 [pii] 10.1016/j.jneuroim.2010.10.025
- Asperger, H., 1938. *Das Psychisch Abnorme Kind*. Wien Klin Wochenschr.
- Auerbach, B.D., Osterweil, E.K., Bear, M.F., 2011. Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature*. doi:10.1038/nature10658
- Ausderau, K., Sideris, J., Furlong, M., Little, L.M., Bulluck, J., Baranek, G.T., 2014. National survey of sensory features in children with ASD: Factor structure of the sensory experience questionnaire (3.0). *J. Autism Dev. Disord.* 44, 915–925. doi:10.1007/s10803-013-1945-1
- Aylward, E.H., Minshew, N.J., Goldstein, G., Honeycutt, N.A., Augustine, A.M., Yates, K.O., Barta, P.E., Pearlson, G.D., 1999. MRI volumes of amygdala and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults. *Neurology* 53, 2145–2150. doi:10.1212/WNL.53.9.2145
- Bachevalier, J., Loveland, K.A., 2006. The orbitofrontal-amygdala circuit and self-regulation of social-emotional behavior in autism. *Neurosci. Biobehav. Rev.* doi:10.1016/j.neubiorev.2005.07.002

- Bambini-Junior, V., Nunes, G.D.F., Schneider, T., Gottfried, C., 2014a. Comment on “Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring”. *Science* 346, 176. doi:10.1126/science.1255679
- Bambini-Junior, V., Rodrigues, L., Behr, G.A., Moreira, J.C., Riesgo, R., Gottfried, C., 2011. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. *Brain Res* 1408, 8–16. doi:S0006-8993(11)01097-3 [pii] 10.1016/j.brainres.2011.06.015
- Bambini-Junior, V., Zanatta, G., Della Flora Nunes, G., Mueller de Melo, G., Michels, M., Fontes-Dutra, M., Nogueira Freire, V., Riesgo, R., Gottfried, C., 2014b. Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neurosci. Lett.* 583, 176–81. doi:10.1016/j.neulet.2014.09.039
- Baranek, G.T., Boyd, B.A., Poe, M.D., David, F.J., Watson, L.R., 2007a. Hyperresponsive sensory patterns in young children with autism, developmental delay, and typical development. *Am. J. Ment. Retard.* 112, 233–45. doi:10.1352/0895-8017(2007)112[233:HSPIYC]2.0.CO;2
- Baranek, G.T., Boyd, B.A., Poe, M.D., David, F.J., Watson, L.R., 2007b. Hyperresponsive sensory patterns in young children with autism, developmental delay, and typical development. *Am. J. Ment. Retard.* 112, 233–45. doi:10.1352/0895-8017(2007)112[233:HSPIYC]2.0.CO;2
- Baranek, G.T., David, F.J., Poe, M.D., Stone, W.L., Watson, L.R., 2006. Sensory Experiences Questionnaire: Discriminating sensory features in young children with autism, developmental delays, and typical development. *J. Child Psychol. Psychiatry Allied Discip.* 47, 591–601. doi:10.1111/j.1469-7610.2005.01546.x
- Barnes, S.A., Pinto-Duarte, A., Kappe, A., Zembrzycki, A., Metzler, A., Mukamel, E.A., Lucero, J., Wang, X., Sejnowski, T.J., Markou, A., Behrens, M.M., 2015. Disruption of mGluR5 in parvalbumin-positive interneurons induces core features of neurodevelopmental disorders. *Mol. Psychiatry.* doi:10.1038/mp.2015.113
- Bauman, M.D., Iosif, A.M., Smith, S.E.P., Bregere, C., Amaral, D.G., Patterson, P.H., 2014. Activation of the maternal immune system during pregnancy alters behavioral development of rhesus monkey offspring. *Biol. Psychiatry.* doi:10.1016/j.biopsych.2013.06.025
- Bechara, A., Tranel, D., Damasio, H., 2000. Characterization of the decision-making deficit of patients with ventromedial prefrontal cortex lesions. *Brain* 123 (Pt 1, 2189–2202. doi:10.1093/brain/123.11.2189
- Ben-Sasson, A., Cermak, S.A., Orsmond, G.I., Tager-Flusberg, H., Kadlec, M.B., Carter, A.S., 2008. Sensory clusters of toddlers with autism spectrum disorders: Differences in affective symptoms. *J. Child Psychol. Psychiatry Allied Discip.* 49, 817–825. doi:10.1111/j.1469-7610.2008.01899.x
- Ben-Sasson, A., Hen, L., Fluss, R., Cermak, S.A., Engel-Yeger, B., Gal, E., 2009. A meta-analysis of sensory modulation symptoms in individuals with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 39, 1–11. doi:10.1007/s10803-008-0593-3

- Blass, E.M., Teicher, M.H., 1980. Suckling. *Science* 210, 15–22.
- Bleuler, P.E., 1911. *Dementia Praecox Oder Gruppe Der Schizophrenien*. Handb. Der Psychiatr.
- Bourgeron, T., 2009. A synaptic trek to autism. *Curr. Opin. Neurobiol.*
doi:10.1016/j.conb.2009.06.003
- Bristot Silvestrin, R., Bambini-Junior, V., Galland, F., Daniele Bobermim, L., Quincozes-Santos, A., Torres Abib, R., Zanotto, C., Batassini, C., Brolese, G., Goncalves, C.A., Riesgo, R., Gottfried, C., 2011. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Res* 1495, 52–60. doi:S0006-8993(12)01842-2 [pii] 10.1016/j.brainres.2012.11.048
- Bryson, S.E., Rogers, S.J., Fombonne, E., 2003. Autism spectrum disorders: early detection, intervention, education, and psychopharmacological management. *Can J Psychiatry* 48, 506–516.
- Casanova, M.F., 2006. Neuropathological and genetic findings in autism: the significance of a putative minicolumnopathy. *Neuroscientist* 12, 435–441. doi:12/5/435 [pii] 10.1177/1073858406290375
- Cascio, C.J., Moana-Filho, E.J., Guest, S., Nebel, M.B., Weisner, J., Baranek, G.T., Essick, G.K., 2012. Perceptual and Neural Response to Affective Tactile Texture Stimulation in Adults with Autism Spectrum Disorders. *Autism Res.* 5, 231–244. doi:10.1002/aur.1224
- Castro, K., Klein, L. da S., Baronio, D., Gottfried, C., Riesgo, R., Perry, I.S., 2014. Folic acid and autism: What do we know? *Nutr. Neurosci.* doi:10.1179/1476830514Y.0000000142
- Chen, J., Alberts, I., Li, X., 2014. Dysregulation of the IGF-I/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in autism spectrum disorders. *Int. J. Dev. Neurosci.* doi:10.1016/j.ijdevneu.2014.03.006
- Chomiak, T., Hu, B., 2012. Alterations of neocortical development and maturation in autism: insight from valproic acid exposure and animal models of autism. *Neurotoxicol Teratol* 36, 57–66. doi:S0892-0362(12)00146-8 [pii] 10.1016/j.ntt.2012.08.005
- Courchesne, E., Mouton, P.R., Calhoun, M.E., Semendeferi, K., Ahrens-Barbeau, C., Hallet, M.J., Barnes, C.C., Pierce, K., 2001. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA* 306, 2001–2010. doi:306/18/2001 [pii] 10.1001/jama.2011.1638
- Courchesne, E., Pierce, K., 2005. Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: local over-connectivity but long-distance disconnection. *Curr Opin Neurobiol* 15, 225–230. doi:S0959-4388(05)00033-4 [pii] 10.1016/j.conb.2005.03.001
- Critchley, H.D., Daly, E.M., Bullmore, E.T., Williams, S.C., Van Amelsvoort, T., Robertson, D.M., Rowe, A., Phillips, M., McAlonan, G., Howlin, P., Murphy, D.G., 2000. The functional neuroanatomy of social behaviour: changes in cerebral blood flow when people with autistic disorder process facial expressions. *Brain* 123 (Pt 1, 2203–2212.
- Dalton, K.M., Nacewicz, B.M., Alexander, A.L., Davidson, R.J., 2007. Gaze-fixation, brain activation, and amygdala volume in unaffected siblings of individuals with autism. *Biol Psychiatry* 61, 512–520. doi:S0006-3223(06)00663-9 [pii] 10.1016/j.biopsych.2006.05.019

- Dapretto, M., Davies, M.S., Pfeifer, J.H., Scott, A.A., Sigman, M., Bookheimer, S.Y., Iacoboni, M., 2006. Understanding emotions in others: mirror neuron dysfunction in children with autism spectrum disorders. *Nat Neurosci* 9, 28–30. doi:nn1611 [pii] 10.1038/nn1611
- DeCasper, A.J., Fifer, W.P., 1980. Of human bonding: newborns prefer their mothers' voices. *Science* 208, 1174–1176. doi:10.1126/science.7375928
- Delorme, R., Ey, E., Toro, R., Leboyer, M., Gillberg, C., Bourgeron, T., 2013. Progress toward treatments for synaptic defects in autism. *Nat. Med.* 19, 685–94. doi:10.1038/nm.3193
- Ebert, D.H., Greenberg, M.E., 2013. Activity-dependent neuronal signalling and autism spectrum disorder. *Nature* 493, 327–37. doi:10.1038/nature11860
- Favre, M.R., Barkat, T.R., Lamendola, D., Khazen, G., Markram, H., Markram, K., 2013a. General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 88. doi:10.3389/fnbeh.2013.00088
- Favre, M.R., Barkat, T.R., Lamendola, D., Khazen, G., Markram, H., Markram, K., 2013b. General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 88. doi:10.3389/fnbeh.2013.00088
- Fitzgerald, P.J., Pinard, C.R., Camp, M.C., Feyder, M., Sah, A., Bergstrom, H.C., Graybeal, C., Liu, Y., Schlüter, O.M., Grant, S.G., Singewald, N., Xu, W., Holmes, A., 2015. Durable fear memories require PSD-95. *Mol. Psychiatry* 20, 901–12. doi:10.1038/mp.2014.161
- Fombonne, E., Quirke, S., Hagen, A., 2009. Prevalence and interpretation of recent trends in rates of pervasive developmental disorders. *Mcgill J Med* 12, 73.
- Foti, S.B., Chou, A., Moll, A.D., Roskams, A.J., 2013. HDAC inhibitors dysregulate neural stem cell activity in the postnatal mouse brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 31, 434–47. doi:10.1016/j.ijdevneu.2013.03.008
- Gadia, C.A., Tuchman, R., Rotta, N.T., 2004. [Autism and pervasive developmental disorders]. *J Pediatr (Rio J)* 80, S83–94.
- Galef, B.G., Kaner, H.C., 1980. Establishment and maintenance of preference for natural and artificial olfactory stimuli in juvenile rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 94, 588–595. doi:10.1037/h0077693
- Gandal, M.J., Edgar, J.C., Ehrlichman, R.S., Mehta, M., Roberts, T.P.L., Siegel, S.J., 2010. Validating γ oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biol. Psychiatry* 68, 1100–1106. doi:10.1016/j.biopsych.2010.09.031
- Garber, K., 2007. Neuroscience. Autism's cause may reside in abnormalities at the synapse. *Science.* doi:10.1126/science.317.5835.190
- Geschwind, D.H., 2009. Advances in autism. *Annu Rev Med* 60, 367–380. doi:10.1146/annurev.med.60.053107.121225
- Gesundheit, B., Rosenzweig, J.P., Naor, D., Lerer, B., Zachor, D.A., Procházka, V., Melamed, M., Kristt, D.A., Steinberg, A., Shulman, C., Hwang, P., Koren, G., Walfisch, A., Passweg, J.R.,

- Snowden, J.A., Tamouza, R., Leboyer, M., Farge-Bancel, D., Ashwood, P., 2013. Immunological and autoimmune considerations of Autism Spectrum Disorders. *J. Autoimmun.* doi:10.1016/j.jaut.2013.05.005
- Gottfried, C., Bambini-junior, V., Baronio, D., Zanatta, G., Silvestrin, R.B., Vaccaro, T., 2013. Valproic Acid in Autism Spectrum Disorder : From an Environmental Risk Factor to a Reliable Animal Model.
- Green, S.A., Ben-Sasson, A., 2010. Anxiety disorders and sensory over-responsivity in children with autism spectrum disorders: Is there a causal relationship? *J. Autism Dev. Disord.* doi:10.1007/s10803-010-1007-x
- Green, S.A., Rudie, J.D., Colich, N.L., Wood, J.J., Shirinyan, D., Hernandez, L., Tottenham, N., Dapretto, M., Bookheimer, S.Y., 2013. Overreactive brain responses to sensory stimuli in youth with autism spectrum disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 52, 1158–1172. doi:S0890-8567(13)00540-6 [pii] 10.1016/j.jaac.2013.08.004
- Groen, W., Teluij, M., Buitelaar, J., Tendolkar, I., 2010. Amygdala and hippocampus enlargement during adolescence in autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49, 552–560. doi:S0890-8567(10)00200-5 [pii] 10.1016/j.jaac.2009.12.023
- Gürgen, S.G., Erdoğan, D., Coşkun, Z.K., Cansu, A., 2012. The effect of valproic acid and oxcarbazepine on the distribution of adhesion molecules in embryo implantation. *Toxicology* 292, 71–7. doi:10.1016/j.tox.2011.11.010
- Hardan, A.Y., Minshew, N.J., Melhem, N.M., Srihari, S., Jo, B., Bansal, R., Keshavan, M.S., Stanley, J.A., 2008. An MRI and proton spectroscopy study of the thalamus in children with autism. *Psychiatry Res. - Neuroimaging* 163, 97–105. doi:10.1016/j.psychres.2007.12.002
- Harden, C.L., 2013. In utero valproate exposure and autism: long suspected, finally proven. *Epilepsy Curr.* 13, 282–4. doi:10.5698/1535-7597-13.6.282
- Hashimoto, M., Mikoshiba, K., 2004. Neuronal birthdate-specific gene transfer with adenoviral vectors. *J. Neurosci.* 24, 286–296. doi:10.1523/JNEUROSCI.2529-03.2004
- Henry, L.A., Witt, D.M., 2006. Effects of neonatal resveratrol exposure on adult male and female reproductive physiology and behavior. *Dev Neurosci* 28, 186–195. doi:91916 [pii] 10.1159/000091916
- Hong, S.E., Shugart, Y.Y., Huang, D.T., Shahwan, S.A., Grant, P.E., Hourihane, J.O., Martin, N.D., Walsh, C.A., 2000. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat Genet* 26, 93–96. doi:10.1038/79246
- Huguet, G., Ey, E., Bourgeron, T., 2013. The genetic landscapes of autism spectrum disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 14, 191–213. doi:10.1146/annurev-genom-091212-153431
- Imai, K., Iida, T., Yamamoto, M., Komatsu, K., Nukui, Y., Yoshizawa, A., 2014. Psychological and mental health problems in patients with thalidomide embryopathy in Japan. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 68, 479–486. doi:10.1111/pcn.12152

- Ingram, J.L., Peckham, S.M., Tisdale, B., Rodier, P.M., 2000. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol Teratol* 22, 319–324. doi:S0892-0362(99)00083-5 [pii]
- Jian, B., Yang, S., Chaudry, I.H., Raju, R., 2014. Resveratrol restores sirtuin 1 (SIRT1) activity and pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1) expression after hemorrhagic injury in a rat model. *Mol Med* 20, 10–16. doi:10.2119/molmed.2013.00077
- Just, M.A., Cherkassky, V.L., Keller, T.A., Minshew, N.J., 2004. Cortical activation and synchronization during sentence comprehension in high-functioning autism: evidence of underconnectivity. *Brain* 127, 1811–1821. doi:10.1093/brain/awh199 awh199 [pii]
- Kanner, L., 1943. Autistic disturbances of affective contact. *Acta Paedopsychiatr.* doi:10.1105/tpc.11.5.949
- Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., Matsuda, T., 2013. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int J Neuropsychopharmacol* 16, 91–103. doi:S1461145711001714 [pii] 10.1017/S1461145711001714
- Kelleher, R.J., Bear, M.F., 2008. The Autistic Neuron: Troubled Translation? *Cell.* doi:10.1016/j.cell.2008.10.017
- Kenny, E.M., Cormican, P., Furlong, S., Heron, E., Kenny, G., Fahey, C., Kelleher, E., Ennis, S., Tropea, D., Anney, R., Corvin, a P., Donohoe, G., Gallagher, L., Gill, M., Morris, D.W., 2013. Excess of rare novel loss-of-function variants in synaptic genes in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Mol. Psychiatry* 19, 872–879. doi:10.1038/mp.2013.127
- Kim, P., Park, J.H., Kwon, K.J., Kim, K.C., Kim, H.J., Lee, J.M., Kim, H.Y., Han, S.H., Shin, C.Y., 2013. Effects of Korean red ginseng extracts on neural tube defects and impairment of social interaction induced by prenatal exposure to valproic acid. *Food Chem Toxicol* 51, 288–296. doi:S0278-6915(12)00748-X [pii] 10.1016/j.fct.2012.10.011
- Kleinhans, N.M., Johnson, L.C., Richards, T., Mahurin, R., Greenson, J., Dawson, G., Aylward, E., 2009. Reduced neural habituation in the amygdala and social impairments in autism spectrum disorders. *Am. J. Psychiatry* 166, 467–475. doi:10.1176/appi.ajp.2008.07101681
- Kogan, M.D., Blumberg, S.J., Schieve, L.A., Boyle, C.A., Perrin, J.M., Ghandour, R.M., Singh, G.K., Strickland, B.B., Trevathan, E., van Dyck, P.C., 2009. Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. *Pediatrics* 124, 1395–1403. doi:peds.2009-1522 [pii] 10.1542/peds.2009-1522
- Kolb, B., Gibb, R., 2011. Brain plasticity and behaviour in the developing brain. *J. Can. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 20, 265–76.
- Kolozsi, E., Mackenzie, R.N., Rouillet, F.I., Decatanzaro, D., Foster, J.A., 2009. Prenatal exposure to valproic acid leads to reduced expression of synaptic adhesion molecule neuroligin 3 in mice. *Neuroscience* 163, 1201–1210. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.07.021
- Koshino, H., Carpenter, P.A., Minshew, N.J., Cherkassky, V.L., Keller, T.A., Just, M.A., 2005. Functional connectivity in an fMRI working memory task in high-functioning autism.

Neuroimage 24, 810–821. doi:S1053-8119(04)00556-7 [pii]
10.1016/j.neuroimage.2004.09.028

- Kosten, T.A., Nielsen, D.A., 2014. Litter and sex effects on maternal behavior and DNA methylation of the Nr3c1 exon 17 promoter gene in hippocampus and cerebellum. *Int. J. Dev. Neurosci.* 36, 5–12. doi:10.1016/j.ijdevneu.2014.03.010
- Lakshminarasimhan, M., Rauh, D., Schutkowski, M., Steegborn, C., 2013. Sirt1 activation by resveratrol is substrate sequence-selective. *Aging (Albany NY)* 5, 151–154. doi:100542 [pii]
- Landers, M.S., Sullivan, R.M., 2012. The development and neurobiology of infant attachment and fear. *Dev. Neurosci.* 34, 101–114. doi:10.1159/000336732
- Lane, S.J., Reynolds, S., Dumenci, L., 2012. Sensory overresponsivity and anxiety in typically developing children and children with autism and attention deficit hyperactivity disorder: Cause or coexistence? *Am. J. Occup. Ther.* 66, 595–603. doi:10.5014/ajot.2012.004523
- Langen, M., Durston, S., Staal, W.G., Palmen, S.J., van Engeland, H., 2007. Caudate nucleus is enlarged in high-functioning medication-naive subjects with autism. *Biol Psychiatry* 62, 262–266. doi:S0006-3223(06)01213-3 [pii] 10.1016/j.biopsych.2006.09.040
- Lavelle, T.A., Weinstein, M.C., Newhouse, J.P., Munir, K., Kuhlthau, K.A., Prosser, L.A., 2014. Economic burden of childhood autism spectrum disorders. *Pediatrics* 133, 520–542. doi:10.1542/peds.2013-0763
- LeDoux, J., 2003. The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol* 23, 727–738.
- Leon, M., 1992. The neurobiology of filial learning. *Annu. Rev. Psychol.* 43, 377–398. doi:10.1146/annurev.psych.43.1.377
- Lin, H.C., Gean, P.W., Wang, C.C., Chan, Y.H., Chen, P.S., 2013. The amygdala excitatory/inhibitory balance in a valproate-induced rat autism model. *PLoS One* 8, e55248. doi:10.1371/journal.pone.0055248 PONE-D-12-17753 [pii]
- Lionel, A.C., Vaags, A.K., Sato, D., Gazzellone, M.J., Mitchell, E.B., Chen, H.Y., Costain, G., Walker, S., Egger, G., Thiruvahindrapuram, B., Merico, D., Prasad, A., Anagnostou, E., Fombonne, E., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Szatmari, P., Fernandez, B.A., Georgieva, L., Brzustowicz, L.M., Roetzer, K., Kaschnitz, W., Vincent, J.B., Windpassinger, C., Marshall, C.R., Trifiletti, R.R., Kirmani, S., Kirov, G., Petek, E., Hodge, J.C., Bassett, A.S., Scherer, S.W., 2013a. Rare exonic deletions implicate the synaptic organizer Gephyrin (GPHN) in risk for autism, schizophrenia and seizures. *Hum. Mol. Genet.* 22, 2055–66. doi:10.1093/hmg/ddt056
- Lionel, A.C., Vaags, A.K., Sato, D., Gazzellone, M.J., Mitchell, E.B., Chen, H.Y., Costain, G., Walker, S., Egger, G., Thiruvahindrapuram, B., Merico, D., Prasad, A., Anagnostou, E., Fombonne, E., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Szatmari, P., Fernandez, B.A., Georgieva, L., Brzustowicz, L.M., Roetzer, K., Kaschnitz, W., Vincent, J.B., Windpassinger, C., Marshall, C.R., Trifiletti, R.R., Kirmani, S., Kirov, G., Petek, E., Hodge, J.C., Bassett, A.S., Scherer, S.W., 2013b. Rare exonic deletions implicate the synaptic organizer Gephyrin (GPHN) in

- risk for autism, schizophrenia and seizures. *Hum. Mol. Genet.* 22, 2055–66.
doi:10.1093/hmg/ddt056
- Liss, M., Saulnier, C., Fein, D., Kinsbourne, M., 2006. Sensory and attention abnormalities in autistic spectrum disorders. *Autism* 10, 155–172. doi:10.1177/1362361306062021
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.
doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lucchina, L., Depino, A.M., 2013. Altered Peripheral and Central Inflammatory Responses in a Mouse Model of Autism. *Autism Res.* doi:10.1002/aur.1338
- Markram, K., Rinaldi, T., La Mendola, D., Sandi, C., Markram, H., 2008. Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 33, 901–912. doi:1301453 [pii] 10.1038/sj.npp.1301453
- Mayes, S.D., Calhoun, S.L., Murray, M.J., Pearl, A., Black, A., Tierney, C.D., 2014. Final DSM-5 under-identifies mild Autism Spectrum Disorder: Agreement between the DSM-5, CARS, CASD, and clinical diagnoses. *Res. Autism Spectr. Disord.* 8, 68–73.
doi:10.1016/j.rasd.2013.11.002
- Mazurek, M.O., Vasa, R.A., Kalb, L.G., Kanne, S.M., Rosenberg, D., Keefer, A., Murray, D.S., Freedman, B., Lowery, L.A., 2013. Anxiety, sensory over-responsivity, and gastrointestinal problems in children with autism spectrum disorders. *J. Abnorm. Child Psychol.* 41, 165–176. doi:10.1007/s10802-012-9668-x
- Miles, J.H., 2011. Autism spectrum disorders--a genetics review. *Genet. Med.* 13, 278–294.
doi:10.1097/GIM.0b013e3181ff67ba
- Miller, M.T., Stromland, K., 1999. Teratogen update: thalidomide: a review, with a focus on ocular findings and new potential uses. *Teratology* 60, 306–321. doi:10.1002/(SICI)1096-9926(199911)60:5<306::AID-TERA11>3.0.CO;2-Y [pii] 10.1002/(SICI)1096-9926(199911)60:5<306::AID-TERA11>3.0.CO;2-Y
- Miyazaki, K., Narita, N., Narita, M., 2005. Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: implication for pathogenesis of autism. *Int J Dev Neurosci* 23, 287–297. doi:S0736574804000589 [pii] 10.1016/j.ijdevneu.2004.05.004
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R.L., Macklis, J.D., 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 427–437. doi:10.1038/nrn2151
- Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 2014. Prevalence of Autism Spectrum Disorder among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2010, Vol. 63(2). ed. Surveillance Summaries, Washington, DC.
- Mottron, L., Dawson, M., Soulières, I., 2009. Enhanced perception in savant syndrome: patterns, structure and creativity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 1385–1391.
doi:10.1098/rstb.2008.0333

- Muhle, R., Trentacoste, S. V, Rapin, I., 2004. The genetics of autism. *Pediatrics* 113, e472–86.
- Muller, J.F., Mascagni, F., McDonald, A.J., 2006. Pyramidal cells of the rat basolateral amygdala: synaptology and innervation by parvalbumin-immunoreactive interneurons. *J Comp Neurol* 494, 635–650. doi:10.1002/cne.20832
- Murphy, E.R., Foss-Feig, J., Kenworthy, L., Gaillard, W.D., Vaidya, C.J., 2013. Atypical Functional Connectivity of the Amygdala in Childhood Autism Spectrum Disorders during Spontaneous Attention to Eye-Gaze. *Autism Res Treat* 2012, 652408. doi:10.1155/2012/652408
- Nordahl, C.W., Scholz, R., Yang, X., Buonocore, M.H., Simon, T., Rogers, S., Amaral, D.G., 2012. Increased rate of amygdala growth in children aged 2 to 4 years with autism spectrum disorders: a longitudinal study. *Arch Gen Psychiatry* 69, 53–61. doi:69/1/53 [pii] 10.1001/archgenpsychiatry.2011.145
- Paula, C.S., Ribeiro, S.H., Fombonne, E., Mercadante, M.T., 2011. Brief report: Prevalence of pervasive developmental disorder in Brazil: A pilot study. *J. Autism Dev. Disord.* 41, 1738–1742. doi:10.1007/s10803-011-1200-6
- Pierce, K., Muller, R.A., Ambrose, J., Allen, G., Courchesne, E., 2001. Face processing occurs outside the fusiform “face area” in autism: evidence from functional MRI. *Brain* 124, 2059–2073.
- Polan, H.J., Hofer, M.A., 1998. Olfactory preference for mother over home nest shavings by newborn rats. *Dev. Psychobiol.* 33, 5–20. doi:10.1002/(SICI)1098-2302(199807)33:1<5::AID-DEV2>3.0.CO;2-P
- Rapin, I., Tuchman, R.F., 2008. What is new in autism? *Curr Opin Neurol* 21, 143–149. doi:10.1097/WCO.0b013e3282f49579
- Rigon, A., Duff, M.C., Voss, M.W., 2015a. Structural and functional neural correlates of self-reported attachment in healthy adults: evidence for an amygdalar involvement. *Brain Imaging Behav.* doi:10.1007/s11682-015-9446-9
- Rigon, A., Duff, M.C., Voss, M.W., 2015b. Structural and functional neural correlates of self-reported attachment in healthy adults: evidence for an amygdalar involvement. *Brain Imaging Behav.* doi:10.1007/s11682-015-9446-9
- Rinaldi, T., Silberberg, G., Markram, H., 2008. Hyperconnectivity of local neocortical microcircuitry induced by prenatal exposure to valproic acid. *Cereb. Cortex* 18, 763–770. doi:10.1093/cercor/bhm117
- Risser, J.M., Slotnick, B.M., 1987. Nipple attachment and survival in neonatal olfactory bulbectomized rats. *Physiol. Behav.* 40, 545–549. doi:10.1016/0031-9384(87)90042-4
- Roberts, V.H., Pound, L.D., Thorn, S.R., Gillingham, M.B., Thornburg, K.L., Friedman, J.E., Frias, A.E., Grove, K.L., 2014. Beneficial and cautionary outcomes of resveratrol supplementation in pregnant nonhuman primates. *FASEB J* 28, 2466–2477. doi:fj.13-245472 [pii] 10.1096/fj.13-245472

- Rodier, P.M., Ingram, J.L., Tisdale, B., Croog, V.J., 1997. Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. *Reprod Toxicol* 11, 417–422.
- Rodier, P.M., Ingram, J.L., Tisdale, B., Nelson, S., Romano, J., 1996. Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *J. Comp. Neurol.* 370, 247–261. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960624)370:2<247::AID-CNE8>3.0.CO;2-2
- Rojas, D.C., Smith, J.A., Benkers, T.L., Camou, S.L., Reite, M.L., Rogers, S.J., 2004. Hippocampus and amygdala volumes in parents of children with autistic disorder. *Am J Psychiatry* 161, 2038–2044. doi:161/11/2038 [pii] 10.1176/appi.ajp.161.11.2038
- Roulet, F.I., Lai, J.K., Foster, J.A., 2013. In utero exposure to valproic acid and autism--a current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicol Teratol* 36, 47–56. doi:S0892-0362(13)00005-6 [pii] 10.1016/j.ntt.2013.01.004
- Rudimar Riesgo, C.G. and M.B., 2013a. Recent Advances in Autism Spectrum Disorders - Volume I. InTech. doi:10.5772/46001
- Rudimar Riesgo, C.G. and M.B., 2013b. Recent Advances in Autism Spectrum Disorders - Volume I. InTech. doi:10.5772/46001
- Russo, N., Foxe, J.J., Brandwein, A.B., Altschuler, T., Gomes, H., Molholm, S., 2010. Multisensory processing in children with autism: High-density electrical mapping of auditory-somatosensory integration. *Autism Res.* 3, 253–267. doi:10.1002/aur.152
- Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C.M., Reichenberg, A., 2014. The familial risk of autism. *JAMA* 311, 1770–7. doi:10.1001/jama.2014.4144
- Schaal, B., Marlier, L., Soussignan, R., 1995. Responsiveness to the odour of amniotic fluid in the human neonate. *Biol. Neonate* 67, 397–406. doi:10.1159/000244192
- Schneider, T., Przewlocki, R., 2005. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 30, 80–89. doi:10.1038/sj.npp.1300518 1300518 [pii]
- Schneider, T., Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., Schneider, K., Przewlocki, R., 2008. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology* 33, 728–740. doi:S0306-4530(08)00061-9 [pii] 10.1016/j.psyneuen.2008.02.011
- Schoen, S.A., Miller, L.J., Green, K.E., 2008. Pilot study of the sensory over-responsivity scales: Assessment and inventory. *Am. J. Occup. Ther.* 62, 393–406. doi:10.5014/ajot.62.4.393
- Schumann, C.M., Amaral, D.G., 2006. Stereological analysis of amygdala neuron number in autism. *J Neurosci* 26, 7674–7679. doi:26/29/7674 [pii] 10.1523/JNEUROSCI.1285-06.2006
- Selemon, L.D., 2013a. A role for synaptic plasticity in the adolescent development of executive function. *Transl. Psychiatry* 3, e238. doi:10.1038/tp.2013.7

- Selemon, L.D., 2013b. A role for synaptic plasticity in the adolescent development of executive function. *Transl. Psychiatry* 3, e238. doi:10.1038/tp.2013.7
- Shafritz, K.M., Dichter, G.S., Baranek, G.T., Belger, A., 2008. The neural circuitry mediating shifts in behavioral response and cognitive set in autism. *Biol Psychiatry* 63, 974–980. doi:S0006-3223(07)00734-2 [pii] 10.1016/j.biopsych.2007.06.028
- Shionoya, K., Moriceau, S., Bradstock, P., Sullivan, R.M., 2007. Maternal attenuation of hypothalamic paraventricular nucleus norepinephrine switches avoidance learning to preference learning in preweanling rat pups. *Horm. Behav.* 52, 391–400. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.06.004
- Shukla, Y., Singh, R., 2011. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 1215, 1–8. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05870.x
- Singh, V.K., Warren, R., Averett, R., Ghaziuddin, M., 1997. Circulating autoantibodies to neuronal and glial filament proteins in autism. *Pediatr. Neurol.* 17, 88–90.
- Smith, V., Brown, N., 2014. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* 2013–2015. doi:10.1136/archdischild-2013-305636
- Snijders, T.M., Milivojevic, B., Kemner, C., 2013. Atypical excitation-inhibition balance in autism captured by the gamma response to contextual modulation. *NeuroImage Clin.* 3, 65–72. doi:10.1016/j.nicl.2013.06.015
- Sohal, V.S., Zhang, F., Yizhar, O., Deisseroth, K., 2009. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459, 698–702. doi:nature07991 [pii] 10.1038/nature07991
- Sparks, B.F., Friedman, S.D., Shaw, D.W., Aylward, E.H., Echelard, D., Artru, A.A., Maravilla, K.R., Giedd, J.N., Munson, J., Dawson, G., Dager, S.R., 2002. Brain structural abnormalities in young children with autism spectrum disorder. *Neurology* 59, 184–192. doi:10.1212/WNL.59.2.184
- Stanfield, A.C., McIntosh, A.M., Spencer, M.D., Philip, R., Gaur, S., Lawrie, S.M., 2008. Towards a neuroanatomy of autism: a systematic review and meta-analysis of structural magnetic resonance imaging studies. *Eur Psychiatry* 23, 289–299. doi:S0924-9338(07)01334-X [pii] 10.1016/j.eurpsy.2007.05.006
- Sui, L., Chen, M., 2012. Prenatal exposure to valproic acid enhances synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex and fear memories. *Brain Res. Bull.* 87, 556–563. doi:10.1016/j.brainresbull.2012.01.011
- Sullivan, R.M., Toubas, P., 1998. Clinical usefulness of maternal odor in newborns: Soothing and feeding preparatory responses. *Biol. Neonate* 74, 402–408. doi:10.1159/000014061
- Summaries, S., 2007. Prevalence of autism spectrum disorders--autism and developmental disabilities monitoring network, six sites, United States, 2000. *MMWR. Surveill. Summ. Morb. Mortal. Wkly. report. Surveill. Summ.* / CDC 56, 1–11.

- Supekar, K., Uddin, L.Q., Khouzam, A., Phillips, J., Gaillard, W.D., Kenworthy, L.E., Yerys, B.E., Vaidya, C.J., Menon, V., 2013. Brain Hyperconnectivity in Children with Autism and its Links to Social Deficits. *Cell Rep.* 5, 738–747. doi:10.1016/j.celrep.2013.10.001
- Swartz, J.R., Wiggins, J.L., Carrasco, M., Lord, C., Monk, C.S., 2012. Amygdala habituation and prefrontal functional connectivity in youth with autism spectrum disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 52, 84–93. doi:S0890-8567(12)00818-0 [pii] 10.1016/j.jaac.2012.10.012
- Swartz, J.R., Wiggins, J.L., Carrasco, M., Lord, C., Monk, C.S., 2013. Amygdala habituation and prefrontal functional connectivity in youth with autism spectrum disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 52, 84–93. doi:S0890-8567(12)00818-0 [pii] 10.1016/j.jaac.2012.10.012
- Takarae, Y., Minshew, N.J., Luna, B., Sweeney, J.A., 2007. Atypical involvement of frontostriatal systems during sensorimotor control in autism. *Psychiatry Res* 156, 117–127. doi:S0925-4927(07)00067-4 [pii] 10.1016/j.psychres.2007.03.008
- Tan, G.C., Doke, T.F., Ashburner, J., Wood, N.W., Frackowiak, R.S., 2010. Normal variation in fronto-occipital circuitry and cerebellar structure with an autism-associated polymorphism of CNTNAP2. *Neuroimage* 53, 1030–1042. doi:S1053-8119(10)00186-2 [pii] 10.1016/j.neuroimage.2010.02.018
- Teicher, M.H., Flaum, L.E., Williams, M., Eckert, S.J., Lumia, A.R., 1978. Survival, growth and suckling behavior of neonatally bulbectomized rats. *Physiol. Behav.* 21, 553–561. doi:10.1016/0028-2243(79)90042-X
- Tottenham, N., Hertzog, M.E., Gillespie-Lynch, K., Gilhooly, T., Millner, A.J., Casey, B.J., 2014. Elevated amygdala response to faces and gaze aversion in autism spectrum disorder. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* 9, 106–117. doi:10.1093/scan/nst050
- Treloar, H.B., Miller, A.M., Ray, A., Greer, C.A., 2010. Development of the Olfactory System.
- Tsujino, N., Nakatani, Y., Seki, Y., Nakasato, A., Nakamura, M., Sugawara, M., Arita, H., 2007. Abnormality of circadian rhythm accompanied by an increase in frontal cortex serotonin in animal model of autism. *Neurosci Res* 57, 289–295. doi:S0168-0102(06)00291-4 [pii] 10.1016/j.neures.2006.10.018
- Tyzio, R., Nardou, R., Ferrari, D.C., Tsintsadze, T., Shahrokhi, A., Eftekhari, S., Khalilov, I., Tsintsadze, V., Brouchoud, C., Chazal, G., Lemonnier, E., Lozovaya, N., Burnashev, N., Ben-Ari, Y., 2014. Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. *Science (80-.)*. 343, 675–679. doi:343/6171/675 [pii] 10.1126/science.1247190
- Van Kooten, I.A., Palmen, S.J., von Cappeln, P., Steinbusch, H.W., Korr, H., Heinsen, H., Hof, P.R., van Engeland, H., Schmitz, C., 2008. Neurons in the fusiform gyrus are fewer and smaller in autism. *Brain* 131, 987–999. doi:awn033 [pii] 10.1093/brain/awn033
- Van Kooten, I.A.J., Hof, P.R., van Engeland, H., Steinbusch, H.W.M., Patterson, P.H., Schmitz, C., 2005. Autism: Neuropathology, Alterations of the GABAergic System, and Animal Models. *Int. Rev. Neurobiol.* doi:10.1016/S0074-7742(05)71001-1

- Vang, O., Ahmad, N., Baile, C.A., Baur, J.A., Brown, K., Csiszar, A., Das, D.K., Delmas, D., Gottfried, C., Lin, H.Y., Ma, Q.Y., Mukhopadhyay, P., Nalini, N., Pezzuto, J.M., Richard, T., Shukla, Y., Surh, Y.J., Szekeres, T., Szkudelski, T., Walle, T., Wu, J.M., 2011. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One* 6, e19881. doi:10.1371/journal.pone.0019881 PONE-D-11-01755 [pii]
- Verhoeven, J.S., De Cock, P., Lagae, L., Sunaert, S., 2009. Neuroimaging of autism. *Neuroradiology* 52, 3–14. doi:10.1007/s00234-009-0583-y
- Villalobos, M.E., Mizuno, A., Dahl, B.C., Kemmotsu, N., Muller, R.A., 2005. Reduced functional connectivity between V1 and inferior frontal cortex associated with visuomotor performance in autism. *Neuroimage* 25, 916–925. doi:S1053-8119(04)00763-3 [pii] 10.1016/j.neuroimage.2004.12.022
- Voineagu, I., Wang, X., Johnston, P., Lowe, J.K., Tian, Y., Horvath, S., Mill, J., Cantor, R.M., Blencowe, B.J., Geschwind, D.H., 2011. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature* 474, 380–384. doi:10.1038/nature10110
- Wang, Y., Leung, L.K., 2007. Pharmacological concentration of resveratrol suppresses aromatase in JEG-3 cells. *Toxicol Lett* 173, 175–180. doi:S0378-4274(07)00808-9 [pii] 10.1016/j.toxlet.2007.07.009
- Watson, L.R., Patten, E., Baranek, G.T., Poe, M., Boyd, B.A., Freuler, A., Lorenzi, J., 2011. Differential Associations Between Sensory Response Patterns and Language, Social, and Communication Measures in Children With Autism or Other Developmental Disabilities. *J. Speech, Lang. Hear. Res.* doi:10.1044/1092-4388(2011/10-0029)
- Widlund, A.L., Baur, J. a, Vang, O., 2013. mTOR: more targets of resveratrol? *Expert Rev. Mol. Med.* 15, e10. doi:10.1017/erm.2013.11
- Williams, S.C.P., 2012. Searching for answers. *Nature* 491, S4–6. doi:10.1038/491S4a
- Wing, L., Potter, D., 2002. The epidemiology of autistic spectrum disorders: is the prevalence rising? *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8, 151–161. doi:10.1002/mrdd.10029
- Wolff, S.B.E., Gründemann, J., Tovote, P., Krabbe, S., Jacobson, G.A., Müller, C., Herry, C., Ehrlich, I., Friedrich, R.W., Letzkus, J.J., Lüthi, A., 2014. Amygdala interneuron subtypes control fear learning through disinhibition. *Nature* 509, 453–8. doi:10.1038/nature13258
- Zald, D.H., 2003. The human amygdala and the emotional evaluation of sensory stimuli. *Brain Res. Rev.* doi:10.1016/S0165-0173(02)00248-5
- Zikopoulos, B., Barbas, H., 2013. Altered neural connectivity in excitatory and inhibitory cortical circuits in autism. *Front Hum Neurosci* 7, 609. doi:10.3389/fnhum.2013.00609

ANEXOS



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 140430

Data da Versão do Projeto: 03/10/2014

Pesquisadores:

RUDIMAR DOS SANTOS RIEBGO

GUSTAVO DELLA FLORA NUNES

MELLANIE FONTES DUTRA DA SILVA

CARMEM GOTTFRIED

KAMILA CASTRO GROKOSKI

Título: EFEITO DO RESVERATROL EM SUBPOPULAÇÕES DE NEURÔNIOS GABAÉRGICOS NAS CAMADAS CORTICAIS DA ÁREA SOMATOSSENSORIAL PRIMÁRIA E DA REGIÃO DA AMÍGDALA EM RATOS WISTAR EXPOSTOS PRÉ-NATALMENTE AO ÁCIDO VALPRÓICO

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 25 de novembro de 2014.

Profª Iraci Lucena da Silva Torres
Coordenadora CEUA/HCPA

Anexo 2 – Carta de aprovação do projeto 14-0432 pelo CEUA e FIPE-HCPA.



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 140432

Data da Versão do Projeto: 03/10/2014

Pesquisadores:

RUDIMAR DOS SANTOS RIESGO

GUSTAVO DELLA FLORA NUNES

MELANIE FONTES DUTRA DA SILVA

CARMEM GOTTFRIED

KAMILA CASTRO GROKOSKI

Título: EFEITO DO RESVERATROL EM SUBPOPLAÇÕES DE CÉLULAS GLIAIS DA
ÁREA SOMATOSSENSORIAL PRIMÁRIA E NA REGIÃO DA AMÍGDALA EM
RATOS WISTAR EXPOSTOS PRÉ-NATALMENTE AO ÁCIDO VALPRÓICO

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 07 de outubro de 2014.


Profª Iraci Lucena da Silva Torres
Coordenadora CEUA/HCPA