

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Caracterização de parâmetros astrocíticos encefálicos em ratos jovens expostos
prenatalmente ao ácido valpróico

ROBERTA BRISTOT SILVESTRIN

Porto Alegre

2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Caracterização de parâmetros astrocíticos encefálicos em ratos jovens expostos
prenatalmente ao ácido valpróico

ROBERTA BRISTOT SILVESTRIN

Orientadora: Prof. Dra. Carmem Gottfried

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Neurociências.

Porto Alegre

2013

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes."

Marthin Luther King

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, primeiramente e principalmente, à minha orientadora, Carmem Gottfried. Meu doutorado não foi simplesmente a condução de uma pesquisa e construção de uma tese, mas sim uma fase de muito aprendizado e crescimento. Durante essa fase só cresci e evolui por que tenho uma orientadora que é, antes de qualquer coisa, humana. Obrigado, Carmem, por acreditar em mim e me aceitar com “um ano e meio de doutorado há menos”; por ter me permitido e ESTIMULADO a aceitar o convite para atuar como Coordenadora em Caxias; por ter aberto mão de mais um semestre quando iniciei esse trabalho; por ter entendido que meu rendimento não seria o mesmo trabalhando em outro lugar; por ter me permitido ser MUITO feliz no final do meu doutorado!

Meu imenso agradecimento às minhas amigas Cristiane Batassini, Renata Torres Abib (agora) Bertacco, Núbia Broetto e Giovana Brolese. Não tenho palavras para agradecer cada hora de trabalho que vocês doaram para mim e, muito menos, para agradecer a amizade de vocês. Meu doutorado não teria sido o mesmo sem vocês e nem minha vida seria a mesma. Eu amo vocês demais!

Obrigado aos queridos colaboradores que me ajudaram com o desenvolvimento dos experimentos: Paula Lunardi, Márcio Dutra, Caroline Zanotto, Lucas Tortorelli, Larissa Bobermin, Fabiana Galland, André Quincozes-Santos e Victório.

Aos colegas do Lab 27 com os quais queria ter podido trabalhar e conviver mais. Confio em vocês e quero ver o lab crescendo muito com essa equipe! Aos amigos do Lab 33 que sempre me ajudaram e que sempre me receberam bem, seja antes, durante ou depois do período em que trabalhei lá. Ainda, deixo meu “Muito obrigado” ao CA por todo suporte técnico e intelectual. Grande parte deste trabalho foi

realizada junto à equipe e laboratório dele e se meu tempo lá foi tão proveitoso é por que houve o aval e apoio do mesmo!

Ao Guilherme Gomes que, lá em São Paulo, me poupou de muito estresse pois me ajudou muitas vezes enviando programas e me ensinando como fazê-los funcionar, principalmente na reta final, quando me “salvou” após o roubo do meu notebook. Obrigado por me ajudar a deixar minha tese mais bonita (e minha orientadora feliz!) com as figuras, por todos os ajustes e auxílios, por tua paciência e por tua amizade!

À minha família que sempre acreditou em mim, sempre esteve ao meu lado e sempre apoia minhas escolhas. Amo vocês demais!

Às minhas amigas Patrícia Spada, Julia Poeta, Queli Varela e Caroline Dani, por todo apoio que me deram sempre, por me fazerem crescer!

À minha grande amiga Gabriela Cavagnolli que está comigo desde a graduação, que acompanhou meu mestrado e meu doutorado. Fazes parte da minha vida, fazes parte de mim. És um exemplo de superação e minha inspiração. Te amo!

Aos meus amigos que, em algum momento desta trajetória, foram companhia, me ouviram ou me fizeram sorrir: Nitieli, Daniel Z, Cristiano, Daniel, Milene, Cami, Nati Migon e Andresa.

Ao meu ex-orientador, Tadeu Souza, que me compreendeu quando da troca de tese e sempre me apoiou e acreditou em mim!

A todos que, em algum momento, torceram por mim ou me desejaram algo de bom. Que vocês sejam retribuídos em dobro!

Agradeço ainda à UFRGS e ao PPG Neurociências, e também à CAPES, por me fornecerem estrutura e apoio para realização do meu doutorado.

RESUMO

Os Transtornos do Espectro do Autismo, aqui tratados coletivamente sob o termo “autismo”, são distúrbios do desenvolvimento caracterizados por prejuízo no uso da linguagem e na comunicação, redução na interação social e comportamentos e interesses restritos e repetitivos. Evidências sugerem que o autismo é um transtorno multifatorial uma vez que se sabe da existência de um componente genético mas também da contribuição de fatores ambientais como infecções e uso de anticonvulsivantes ao longo da gestação. Apesar do grande número de estudos, a causa do transtorno é desconhecida, não existe tratamento e nenhum marcador diagnóstico foi identificado até o momento. O modelo animal baseado na administração pré-natal de ácido valpróico em ratos foi utilizado como ferramenta de estudo no presente trabalho e, através deste, foram realizadas análises de parâmetros astrocíticos no córtex frontal, hipocampo, estriado e cerebelo de ratos com 4 e 15 dias de idade, além de análises no hipocampo de animais de 120 dias. Os animais de 4 dias de idade apresentam níveis aumentados da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) no cerebelo. Já os animais de 15 dias apresentam maiores níveis de GFAP em todas as estruturas estudadas. Além disso, há aumento nos níveis de vimentina no hipocampo e no conteúdo de S100B no córtex frontal e estriado. A atividade da glutamina sintetase encontra-se aumentada no hipocampo e reduzida no cerebelo e estriado. Além disso, nossos dados mostraram efeito do VPA sobre a transmissão glutamatérgica uma vez que houve aumento na captação desse transmissor, somada à maior expressão de GLT1 e conteúdo de GSH, além de diminuição na atividade da GS em 120 dias. Nossos resultados indicam que o VPA induz um processo de astrogliose reativa no encéfalo e que o cerebelo parece ser uma estrutura particularmente vulnerável. Sugere-se que os padrões regionais específicos das alterações encefálicas sejam causados pela heterogeneidade dos astrócitos e que a astrogliose pode ter papel no estabelecimento das características fisiopatológicas do autismo. Estudos adicionais são necessários para compreender a origem dessas alterações bem como suas consequências e suas implicações no diagnóstico e tratamento do autismo.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorders, which will be called “autism” in the present work, consist of a group of developmental disorders characterized by deficits in language and communication, low social interaction and restricted and repetitive behaviors and interests. It is known as a multifactorial disorder including both genetic and environmental components such as maternal infections and anticonvulsant used during pregnancy. Despite of the increasing number of publications in this area, the cause of autism is still unknown and there is neither treatment nor clinical marker. The animal model of autism based on the prenatal exposure to valproic acid in rats was used here to study different astrocytic parameters in the frontal cortex, hippocampus, striatum and cerebellum of male rats with 4 (P4) and 15 (P15) days of age. Additional analyses were done in the hippocampus of 120 days old rats (P120). The expression of GFAP increased in the cerebellum of P4 and in all brain structures from P15 rats. The number of vimentin+ astrocytes increased in hippocampus from P15 group and S100B levels increased in striatum and prefrontal cortex. The activity of GS in P15 increased in hippocampus and decreased in cerebellum and striatum. The effect of VPA on glutamatergic transmission was investigated in P120 where there was an increase in glutamate uptake, GLT1 expression and GSH content and reduced GS activity. Our results indicate that VPA induces early reactive astrogliosis and that cerebellum seems to be especially vulnerable. Regional patterns of brain alterations are probably due to astrocytic heterogeneity and astrogliosis seems to be relevant in establishing autistic neuropathological features. Additional studies are needed to better understand what triggers these alterations and what are their consequences and implications in autism diagnosis and treatment.

Lista de abreviaturas

3-NT: 3-nitrotirosina

ADI: Entrevista de diagnóstico do autismo

ADOS: Plano de observação do diagnóstico de autismo

AF: Anisotropia fracional

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida

AQP4: aquaporina 4

CA: Corno de Amon

CCA: Córtex cingulado anterior

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CkB8-1/CCL23: quimiocina ligante 23

CPF: córtex pré-frontal

CX43: conexina 43

DISCO: Entrevista Diagnóstica de Distúrbios Sociais e de Comunicação

DSM-V-TR: Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais V – Texto revisado

EAAT: transportador de aminoácidos excitatórios

ELISA: Ensaio imunoenzimático

GABA: Ácido gamaaminobutírico

GAD: glutamato-descarboxilase

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida

Glx: Glutamato+glutamina

GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócito e macrófagos

GS: glutamina sintetase

GSH: glutathiona reduzida

IGFBP-1: proteína ligadora de fator de crescimento semelhante à insulina

IL: Interleucina

INF- α : interferon α

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

ITD: Imagem de tensor de difusão

MCP/CCL-2: proteína quimioatratora de monócitos

MDC/CCL22: quimiocina ligante 22

mGlu_r: receptor glutamatérgico metabotrópico

MIG/CXCL9: quimiocina 9 ligante da família CXC

NAP-2: peptídeo atrator de neutrófilos-2

NF- κ b: fator nuclear kappa B

NOE: Noradrenalina

OPD: o-phenylenediamina

PBS: Salina tamponada com fosfato

PET: Tomografia por emissão de pósitrons

SNC: Sistema nervoso central

SPECT: Tomografia computadorizada por emissão de fóton único

STAT: Ferramenta de Triagem para autismo aos 2 anos

TARC/CCL17: quimiocina ligante 17

TEA: Transtornos do espectro autista

TGD: Transtorno global do desenvolvimento

TGF- β 1: Fator de crescimento tumoral β 1

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

VPA: Ácido valpróico

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.2 Autismo	12
1.1.1 Epidemiologia.....	12
1.1.2 Sintomatologia e comorbidades.....	13
1.1.3 Diagnóstico.....	15
1.1.4 Etiologia	16
1.1.5 Modelo animal.....	17
1.1.6 Neuropatologia.....	25
1.1.7 Neuroquímica	28
1.2 Astrócitos	31
1.3 Glia e autismo	32
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 RESULTADOS	36
Capítulo 1: Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: altered glutamate metabolism in the hippocampus	36
Capítulo 2: Cerebellar astrocytic parameters in animal model of autism induced by valproic acid	46
Capítulo 3: Resultados adicionais	67
4. RESUMO DOS RESULTADOS GERAIS.....	84
5 DISCUSSÃO GERAL	85
5.1 As alterações encefálicas observadas no modelo de autismo mudam de acordo com a idade	87
5.2 O encéfalo de animais com 15 dias de idade apresenta astrogliose reativa e esta pode ter papel central no contexto fisiopatológico do autismo	88
5.3 O encéfalo do indivíduo com autismo apresenta alterações região-específicas	92
5.4 Os astrócitos têm papel significativo nas alterações neuropatológicas e clínicas do autismo	93
5.5 Um novo paradigma	97
6 CONCLUSÕES	100
7 PERSPECTIVAS.....	102
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

Os Transtornos do Espectro do Autismo (TEA) são um grupo heterogêneo de transtornos do desenvolvimento que apresentam grau de severidade bastante variável. Os TEA são caracterizados por déficits na comunicação e interação social, comportamentos repetitivos ou estereotípias e por um padrão restrito de interesses. De acordo com Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais IV – texto revisado (DSM-IV-TR), compõem os TEA o Autismo clássico, a Síndrome de Asperger, e o Transtorno Global do Desenvolvimento (TGD) Sem Outra Especificação. O uso do termo TGD incluía inicialmente neste grupo a síndrome de Rett e o Transtorno Desintegrativo da Infância. Entretanto, atualmente fica cada vez mais claro que estes dois são transtornos muito distintos do grupo e devem ser reclassificados em breve.

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), a prevalência de autismo – termo usado nesta tese para designar os TEA – nos Estados Unidos é de 1 em cada 88 crianças na faixa dos 8 anos de idade. Além disso, o distúrbio é mais prevalente no sexo masculino, atingindo aproximadamente 4-5 homens para cada mulher [1].

O autismo tem se apresentado como um desafio para a comunidade científica e para a sociedade uma vez que não existe tratamento e nenhum marcador diagnóstico foi identificado. A grande questão nesse desafio é o fato da causa do transtorno ainda ser desconhecida. Sabe-se que alterações genéticas contribuem para o desenvolvimento do autismo [2-6]. No entanto, fatores ambientais como a exposição materna a infecções, etanol, talidomida e ácido valpróico (VPA) aumentam o risco de nascimento de crianças com o distúrbio [7, 8].

Outra dificuldade em relação ao estudo do autismo está na interpretação dos dados obtidos através de pesquisas até o momento. Apesar do número de estudos

estar em ascensão, deve-se ter muito cuidado com a análise de dados científicos por diversos motivos: 1) Amostras de tecido encefálico são de difícil obtenção e não sabemos se as alterações encontradas em amostras providas de necropsias referem-se à causa ou à consequência do autismo; 2) o autismo é um transtorno do desenvolvimento que é diagnosticado na infância, no entanto, a participação de crianças em estudos é dificultada devido ao quadro clínico e muitos dados originam-se de indivíduos adultos; 3) trata-se de um transtorno heterogêneo, apresentando-se de maneiras clinicamente diversas; 4) grande parte dos pacientes com autismo apresenta outras comorbidades ou síndromes, o que leva os pesquisadores a questionarem se seus achados são devido ao autismo ou às outras doenças.

1.2 Autismo

1.1.1 Epidemiologia

Desde as primeiras descrições sobre autismo feitas por Hans Asperger em 1938, juntamente com o relato de uma população de 11 crianças com sintomas de autismo, publicado logo a seguir por Leo Kanner em 1943 [9], as concepções médicas e sociais sobre o autismo mudaram tanto quanto a sua epidemiologia. Quando descrito pela primeira vez, há mais de setenta anos, o autismo era considerado uma condição rara afetando não mais que 4 pessoas em cada 10000 indivíduos. No entanto, trata-se de um distúrbio muito mais comum ocorrendo em até 1% da população.

Nos anos 60 e 70, quando os critérios de Kanner eram utilizados, a prevalência documentada era de 0,04-0,05% para o autismo infantil precoce. Já nos anos 80, a prevalência era documentada como sendo em torno de 0,1% e a base para os estudos era o DSM-III, que utiliza critérios um pouco mais amplos que Kanner. A partir dos anos 90, tendo como base o DSM-IV, a prevalência do autismo clássico é

relatada em torno de 0,2-0,5% sendo que este índice passa para em torno de 1% se considerados os TEA [10].

O autismo é um dos transtornos do desenvolvimento neural mais prevalentes entre crianças nos dias de hoje. Mais crianças são diagnosticadas com autismo a cada ano nos EUA do que AIDS, câncer e diabetes juntos [11]. As estimativas de 2009 do CDC apontavam para uma prevalência de 1 em cada 110 crianças de 8 anos, dado que passou para 1 em cada 88 crianças na mesma faixa etária no último ano. Alguns trabalhos recentes relatam taxas ainda maiores de prevalência em locais específicos como, por exemplo, um estudo na Coreia do sul demonstrando que 2.6% das crianças de 7 a 13 anos preenchem os critérios diagnósticos de TEA [12, 13].

De acordo com as estudos epidemiológicos [14, 15] este aumento na prevalência pode ser consequência de diversos fatores, como a ampliação dos critérios diagnósticos, a melhor identificação dos casos, o aumento na conscientização da sociedade bem como substituição diagnóstica e acesso aos serviços, juntamente com fatores de risco ambientais durante a gestação. De qualquer maneira, esses dados devem servir de impulso para a condução de novos estudos epidemiológicos criteriosos uma vez que no Brasil, por exemplo, tais trabalhos são escassos.

1.1.2 Sintomatologia e comorbidades

Os sintomas principais do autismo consistem em déficits de reciprocidade social, prejuízo na comunicação e interesses e comportamentos rígidos e ritualísticos [1]. Apesar de tais sintomas estarem presentes em diversas doenças psiquiátricas, a união de todos em um mesmo indivíduo é que caracteriza o autismo.

Mesmo com as mudanças que têm acontecido nos critérios diagnósticos ao longo dos anos, uma grande variabilidade clínica se mantém no autismo. Alguns pacientes possuem um vasto vocabulário e gramática, enquanto uns utilizam somente

frases padronizadas e repetitivas e outros não falam. Indivíduos com autismo têm dificuldades ao lidar com mudanças em sua rotina e, em resposta a esse e outros estressores, podem apresentar uma gama de movimentos estereotipados [16].

Apesar de não serem necessários ao diagnóstico, uma série de outros sintomas e síndromes associados são frequentes. Muitas crianças com autismo apresentam prejuízo intelectual e aproximadamente 75% precisa de apoio social e educacional significativo [17, 18]. Além disso, pacientes com autismo também podem apresentar hiperatividade, agressão e auto-mutilação, o que é mais comum entre aqueles que possuem déficit cognitivo. Sintomas depressivos, psicóticos e comportamento suicida também podem ocorrer sendo mais ou menos frequentes em diferentes fases da vida [19]. Ainda, impulsividade, déficit de atenção/hiperatividade, transtornos de ansiedade, problemas de conduta, depressão, distúrbios do sono e epilepsia também podem estar presentes [14, 20, 21].

Um achado que é relativamente frequente em pacientes com autismo é a ocorrência de alterações sensoriais. Tais peculiaridades foram mencionadas ainda no relato de Kanner, em 1943, e são descritas pelos pais até hoje. Indivíduos com autismo podem apresentar hipo ou hiper-responsividade a estímulos sonoros, luminosos, táteis [22-24] e podem apresentar menor sensibilidade à dor [25, 26]. Ainda, problemas gastrointestinais, distúrbios hormonais e metabólicos também podem estar presentes nestes indivíduos [18].

A epilepsia é uma das comorbidades mais frequentes, acometendo pelo menos 30% dos pacientes com autismo clássico com picos de ocorrência em diferentes fases da vida [19, 21]. Crianças com autismo e epilepsia possuem maior risco de desenvolver atraso no desenvolvimento e prejuízo intelectual do que aquelas com um ou outro distúrbio [21]. Além disso, doenças como Esclerose tuberosa, X frágil e Síndrome de Angelman também são frequentemente associadas ao autismo [21].

A identificação de comorbidades associadas ao autismo é importante para que, mediante tratamento, a qualidade de vida dos pacientes seja aumentada e também para o desenvolvimento da pesquisa em relação aos mecanismos subjacentes ao distúrbio.

1.1.3 Diagnóstico

O autismo é um diagnóstico de impacto na vida dos pacientes, suas famílias e comunidade. Uma vez que a sua prevalência vem aumentando, o conhecimento sobre o autismo é crucial para os profissionais da saúde que precisam estar cientes das implicações médicas que esse diagnóstico traz.

A maioria dos pacientes com autismo é encaminhada para o diagnóstico por pediatras ou profissionais de família e embora casos típicos sejam fáceis de reconhecer, a identificação de casos mais moderados ou com presença de comorbidades psiquiátricas pode consistir numa tarefa árdua [27]. O desafio diagnóstico é de grande importância uma vez que a identificação precoce é essencial para o direcionamento rápido das estratégias de intervenção, o que é determinante para resultados positivos em longo prazo.

Apesar das mudanças que ocorreram na compreensão da doença, o diagnóstico do autismo continua sendo clínico. Embora escalas e entrevistas padronizadas como o Plano de observação do diagnóstico de autismo (ADOS- Autism Diagnostic Observation Schedule), a Ferramenta de Triagem para autismo aos 2 anos (STAT – Screening Tool for Autism in 2-Years-Olds), a Entrevista de diagnóstico do autismo (ADI – Autism Diagnostic Interview) e a Entrevista Diagnóstica de Distúrbios Sociais e de Comunicação (DISCO – Diagnostic Interview of Social and Communication Disorders) [27] auxiliem no estabelecimento do diagnóstico, não há nenhum exame que detecte o transtorno [28]. Desta forma, o diagnóstico do autismo é

baseado na obtenção de uma história detalhada do desenvolvimento do paciente e realização de uma avaliação sistemática, consistindo num processo que requer tempo e uma equipe multidisciplinar para avaliação de dados comportamentais, história familiar e relatos dos pais [27].

Técnicas de diagnóstico por imagem como eletroencefalograma, tomografia computadorizada e ressonância magnética mostram alterações eletrofisiológicas, anatômicas e funcionais no cérebro de pacientes com autismo que têm sido bastante úteis na pesquisa sobre o distúrbio. No entanto, seu potencial diagnóstico ainda deve ser explorado [29].

Ainda, é importante lembrar que um diagnóstico dicotômico, almejado por pais, escolas e epidemiologistas, é ilusório. Estudos com tamanhos amostrais maiores são de extrema necessidade dado o amplo espectro de etiologias, idades, QI e principalmente a extrema variação na severidade dos sintomas do autismo.

1.1.4 Etiologia

A existência de um componente genético no surgimento e/ou sintomas do autismo não é novidade. Pesquisas com gêmeos sugerem a presença de herdabilidade uma vez que o risco de autismo entre gêmeos monozigóticos é 12 vezes maior que na população normal enquanto que o mesmo parâmetro cai para 4 quando gêmeos dizigóticos são avaliados [30]. Apesar desses achados, nenhum locus gênico demonstrou ser responsável pelo autismo em mais de 1% dos indivíduos afetados. Além disso, análises de variação no número de cópias (*CNVs - copy number variations*) estimam a existência de centenas de loci nos quais mutações podem ocasionar autismo [31].

Diversos fatores genéticos podem contribuir para os fenótipos sobrepostos do autismo através da influência convergente de rotas biológicas comuns. Análises

funcionais de genes de risco para o autismo evidenciaram a importância de genes envolvidos na sinaptogênese e migração neuronal [32-34].

Embora estudos de associação de genoma tenham encontrado envolvimento de variantes genéticas que oferecem risco de autismo, a ausência de replicação entre os estudos e os efeitos pequenos encontrados para cada uma das variantes diminuíram a estimativa do papel das mesmas no autismo [4].

Fatores ambientais também devem ser considerados uma vez que infecções maternas durante o segundo trimestre da gestação aumentam o risco de nascimento de crianças com autismo [35-37]. Além disso, a exposição pré-natal a diferentes teratogênicos como ácido valpróico [38, 39], etanol, talidomida e misoprostol [8, 40] aumentam o risco de desenvolvimento de autismo.

Outros fatores de risco para o autismo incluem idade avançada dos pais, baixo peso ao nascer, sangramento materno, diabetes gestacional e exposição do feto a altos níveis de androgênios intrauterinos [41, 42].

1.1.5 Modelo animal

Os modelos animais de autismo têm sido cada vez mais utilizados pelos pesquisadores da área por possibilitarem o estudo de alvos moleculares, sinápticos e celulares possivelmente ligados à causa do distúrbio. Diversos modelos animais de autismo com base em manipulações genéticas, neuroquímicas, neurofisiológicas ou comportamentais já foram propostos. Mais especificamente, dentre os modelos utilizados podemos citar aqueles baseados em infecções maternas por vírus [43], alterações genéticas em proteínas específicas [44, 45] ou exposição materna a agentes teratogênicos como a talidomida [46] e o ácido valpróico (VPA) [47, 48].

O VPA é um medicamento utilizado no tratamento de diferentes tipos de epilepsia e transtornos de humor. Seu mecanismo de ação inclui potenciação da

neurotransmissão GABAérgica através de inibição da GABA transaminase e aumento na ativação da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) e inibição da neurotransmissão excitatória através do bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem e canais de cálcio tipo T [49]. Além disso, o VPA é um inibidor da acetilase de histonas (HDAC) o que afeta a expressão gênica e impulsiona o uso deste ácido graxo no tratamento de diferentes tipos de patologias [50].

Apesar do uso do VPA estar se tornando cada vez mais amplo, deve-se ter atenção aos efeitos colaterais e teratogênicos dessa droga. Estes últimos receberam muita atenção na década de 80, quando foram publicados o primeiro trabalho sobre a teratogenicidade do VPA [51] e a primeira descrição da Síndrome do Valproato Fetal [52]. Essa síndrome era caracterizada por má formação e atrasos no desenvolvimento além de sintomas semelhantes ao autismo, incluindo déficits de linguagem e comunicação, aparecimento de comportamento estereotípico, hiperexcitabilidade e atrasos globais no desenvolvimento comportamental [53-55]. A partir daí surgiram outros trabalhos associando o VPA com autismo bem como estudos epidemiológicos demonstrando que gestantes sob tratamento com VPA tinham risco maior de terem filhos com o distúrbio [38, 39, 56, 57]. Além disso, um estudo recente realizado na Inglaterra encontrou risco de autismo sete vezes maior entre os filhos de gestantes que faziam uso de VPA quando comparados aos filhos das gestantes pertencentes ao grupo controle [58]. Com base nesses achados, Rodier e colaboradores estabeleceram o modelo animal de autismo através de exposição ao VPA ao mostrarem que a prole de ratas que recebiam administração intraperitoneal dessa droga durante a gestação apresentavam alterações anatomopatológicas no cerebelo e tronco encefálico semelhantes às descritas em pacientes com autismo [59]. Apesar disso, o modelo só ganhou força no momento em que foi feita sua caracterização comportamental – visto que o diagnóstico do autismo se dá através da observação de comportamentos específicos - quando foi demonstrado que os filhotes

de ratas submetidas ao protocolo em questão apresentavam redução no comportamento social e presença de movimentos repetitivos semelhantes a estereotípias, além de outros sintomas presentes no autismo [48]. Esses achados foram de grande importância no estudo do autismo e foram reforçados após as evidências de que algumas alterações causadas pela exposição pré-natal ao VPA eram detectadas somente em filhotes machos [60].

Esse modelo foca especificamente no momento de fechamento do tubo neural no dia gestacional 12.5, o qual se acredita ser o momento de vulnerabilidade para insultos que possam produzir sintomas autistas [61]. O tubo neural é a estrutura embrionária que vai originar o SNC. Nos humanos seu fechamento ocorre entre os dias embrionários 20 e 24, período esse onde ocorre a neurogênese inicial que forma os núcleos motores dos nervos cranianos. No rato, este período corresponde ao dia embrionário 12,5, quando termina a formação dos núcleos dos nervos trigêmeo, abducente e hipoglosso [62]. Apesar disso, outros tempos de indução já foram investigados por outros grupos de pesquisa, conforme tabelas a seguir.

Tabela 1. Alterações neuropatológicas induzidas por administração pré-natal única de ácido valpróico

Estrutura neural	Alterações	Via de administração de VPA, dose e dia gestacional (Gx)	Espécie e idade na qual foi feita análise	Referência
Protocolos fazendo uso de administração via intraperitoneal				
Córtex pré-frontal e hipocampo	Aumento na expressão de wnt1 e wnt2/ estimulação da via Wnt/b-catenin	600 mg/kg, G12,5	Ratos Wistar, P30	[63]
Córtex temporal	Comprometimento da transmissão GABAérgica	600 mg/kg, G12,5	Ratos Sprague Dawley, P23-45	[64]
Estriado dorsal e núcleo accumbens	Redução na expressão do RNAm da PENK	600 mg/kg, G12,5	Ratos Wistar, P60-90	[65]
Cerebelo	Redução do volume Menor número de Células de Purkinje	600 mg/kg, G12,5	Ratos Long Evans, P40	[66]
Cerebelo	Redução no número de Células de Purkinje	600 mg/kg, G12,5	Ratos, P>40	[67]
Hipocampo	Aumento nos níveis de serotonina Menor sensibilidade à dor			
Hipocampo	Diminuição na expressão de GLT1 Maior atividade da GS Aumento na captação de glutamato Aumento na expressão de GLT1 Menor atividade da glutamina sintetase Maior quantidade de GSH	600 mg/kg, G12,5	Ratos Wistar, P15 P120	[68]
Hipocampo	Redução nos níveis de serotonina	600 mg/kg, G12,5	Ratos Wistar, P50	[69]
Colículo superior	Redução de subpopulação de neurônios GABAérgicos Déficit sensorial	600 mg/kg, G12,5	Ratos Sprague Dawley, P60	[70]
Amígdala	Aumento na razão excitação/inibição	500mg/kg, G12,5	Ratos Wistar, P28-35	[71]
Córtex motor	Arborização dendrítica mais	350 mg/kg, G12,5	Ratos Long-Evans, P39-42	[72]

	complexa nos dendritos apicais de células piramidais			
Córtex pré-frontal medial	Maior plasticidade	600 mg/kg, G12	Ratos Sprague-Dawley, P30	[61]
Córtex pré-frontal e hipocampo	Maior expressão de proteínas da densidade pós sináptica Redução nos níveis de GAD Maior expressão de vGluT1, PSD-50, -CAMKII	400 mg/kg, G12	Ratos Sprague Dawley, P20	[73]
Córtex pré-frontal medial	Hiperconectividade e hiperplasticidade	500 mg/kg, G11,5	Ratos Wistar, P15	[74]
Córtex somatosensorial	Maior expressão das subunidades NR2A e NR2B de receptores NMDA e de CaMKII	500 mg/kg, G11,5	Ratos Wistar, P15	[75]
Protocolos fazendo uso de administração via oral				
Córtex orbito-frontal e prefrontal medial, cerebelo	Redução na arborização dendrítica (somente em CPFm e COF) Diminuição na densidade de espinhos	800 mg/kg, G12	Ratos Long Evans, P65-75	[76]
Nervos cranianos trigêmeo, facial, glossofaríngeo e vago	Desenvolvimento anormal	800 mg/kg, G8-11	Ratos Wistar, E13	[77]
Córtex somatosensorial	Prejuízo na discriminação olfatória Menor expressão de RNAm de BDNF	800 mg/kg, G11	Camundongo (linhagem heterogênea), P9-11, P22	[78]
Córtex somatosensorial e hipocampo	Atraso na abertura dos olhos e menor peso corporal (P25) Menor expressão de RNAm de NLGN3	800 mg/kg, G11	Camundongo (linhagem heterogênea), P60	[79]
Ponte	Desenvolvimento anormal da ponte Anormalidades na migração de neurônios	800 mg/kg, G11	Ratos Sprague Dawley, G16	[80]
Núcleo facial motor	Migração alterada dos neurônios dos núcleos motores faciais Redução no tamanho	800 mg/kg, G9,5	Ratos Wistar, E13,5 -15,5	[81]
Núcleos da rafe	Atraso na maturação de neurônios	800 mg/kg, G9	Ratos Wistar, P50	[82]

serotoninérgicos

Protocolos fazendo uso de administração via subcutânea

Córtex	Macrocefalia e aumento do <i>pool</i> de progenitores neurogênicos	400mg/kg, G12	Sprague Dawley, E14 e P2	[83]
---------------	--	---------------	--------------------------	------

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; COF: córtex orbitofrontal; CPFm: córtex pré-frontal medial; PENK: proencefalina; GLT1: transportador de aminoácidos excitatórios 2: transportador vesicular de glutamato; GS: glutamina sintetase; GSH: glutatona reduzida; I.p: intraperitoneal; S.c: subcutânea; G: dia gestacional onde foi feita administração de VPA; E: dia embrionário onde foi feita análise; P: dia pós natal onde foi feita análise; Vglut1: transportador vesicular de glutamato 1; GAD: descarboxilase do ácido glutâmico.

Tabela 2. Alterações comportamentais induzidas por administração pré-natal única de ácido valpróico

Alterações	Via de administração de VPA, dose e dia gestacional (Gx)	Espécie e idade na qual foi feita análise	Referência
Menor interação social Rigidez comportamental Menor preferência por novidade social	I.p, 600 mg/kg, G12,5	Ratos Wistar P35-50 P80-110	[84]
Redução de atividade exploratória em ambiente novo, aumento de ansiedade e diminuição de exploração social	I.p, 600 mg/kg, G12,5	Ratos (espécie não informada), P>40	[67]
Menor sensibilidade à dor e hipersensibilidade a estímulos não dolorosos, redução na inibição pré-pulso, estereotipia, redução na atividade exploratória, redução na interação social	I.p, 600 mg/kg, G12,5	Ratos Wistar, P30–50 e P90–120	[48]
Maior ansiedade	I.p, 600 mg/kg, G12,5	Ratos Wistar, P30–50 e P90–120	[85]
Menor interação social	I.p, 600mg/kg, G12,5	Ratos Wistar, P50	[69]
Menor interação social, aumento na ansiedade, aumento no aprendizado de medo e extinção de memória prejudicada	I.p, 500mg/kg, G12,5	Ratos Wistar, P28-35	[71]
Menor interação social	S.c, 400 mg/kg, G12	Ratos Sprague-Dawley, P20	[86]
Hiperlocomoção	S.c, 400 mg/kg, G12	Ratos Sprague-Dawley, P28	[73]
Menor interação social		P30	
Menor limiar para convulsão		P42	
Comportamento social disfuncional	Oral, 800 mg/kg, G11	Camundongo (linhagem heterogênea), P9-11, P22	[78]
Déficit na procura pelo ninho, déficit no comportamento social	Oral, 800 mg/kg, G11	Camundongo (linhagem heterogênea), P9 e P22	[79]

Além das anormalidades de tronco encefálico e cerebelo [47, 66, 80], semelhantes aos achados em autópsia e em estudos com técnicas de imagem encefálica de pacientes com autismo [87-89], outras alterações como padrões anormais de conectividade, já relatados em humanos [90-92], também foram reproduzidos em animais que receberam VPA no 12º dia gestacional [74]. A Tabela 1 apresenta as principais alterações neuropatológicas que foram descritas em filhotes de roedores expostos pré-natalmente à dose única de VPA e está organizada de acordo com a via de administração e ordem decrescente referente ao dia de administração e dose.

Ainda, filhotes expostos prenatalmente ao VPA no 12º dia gestacional apresentam sintomas clássicos do autismo como interação social prejudicada [48, 84] e comportamentos repetitivos aumentados, reforçando o valor de face do modelo. O protocolo em questão também faz com que a prole apresente maiores níveis de ansiedade [67, 85], maior risco de convulsões e alterações sensoriais, sintomas frequentemente presentes em indivíduos com autismo. Na Tabela 2 estão apresentadas as diferentes alterações comportamentais causadas por administrações únicas de VPA em roedores durante a gestação.

Nosso grupo documentou recentemente alterações comportamentais em ratos expostos ao VPA *in utero*. Viu-se que os animais apresentaram menor interação social e rigidez comportamental, sem alterações no labirinto aquático de Morris [84]. Seguindo a mesma linha de pensamento, a análise de tais comportamentos motivou a escolha das regiões encefálicas que seriam alvo desta tese. Uma vez que o comportamento social em ratos é influenciado pelo funcionamento do córtex pré-frontal e que esta estrutura, juntamente com o hipocampo, pode mediar aspectos da rigidez comportamental [93], essas duas estruturas foram escolhidas. Além disso, as duas tarefas onde foram encontradas as alterações – Y Maze e Três Câmaras – são baseadas na exploração de um ambiente novo, o que requer a integridade de vias

límbicas e não-límbicas que incluem o hipocampo, o córtex pré-frontal (CPF), o estriado, o cerebelo, entre outros [94]. Desta forma, a presente tese tem como foco o hipocampo, cerebelo, CPF e estriado.

1.1.6 Neuropatologia

Apesar da causa do autismo ser desconhecida, diversas alterações neuropatológicas já foram documentadas e o número de estudos clínicos mostrando modificações a nível anatômico, celular e molecular vem crescendo a cada ano.

Em relação à macroanatomia, o aumento na circunferência craniana é um dos achados mais consistentes. Apesar de ser usualmente normal ao nascer, a velocidade média de crescimento encefálico excede o padrão da infância e início da adolescência, voltando ao normal na idade adulta [43, 95].

Alterações significativas na substância branca e na substância cinzenta são documentadas com frequência e podem variar de acordo com a estrutura analisada, idade amostral e quadro clínico. Análises de densidade, tamanho, mielinização e organização de fibras no encéfalo com autismo apontam para um aumento das conexões córtico-corticais intra-hemisféricas de curta e média distância enquanto há redução nas conexões inter-hemisféricas de longa distância [90, 96]. Além disso, existem evidências de mudanças na organização tanto anatômica laminar quanto funcional colunar do neocórtex no autismo [97-99]. Quanto à substância cinzenta, indivíduos com autismo apresentaram volumes reduzidos da mesma no córtex cingulado anterior (CCA), sulco temporal superior posterior e giro temporal médio [100] além de densidade de axônios alterada e prejuízo na mielina da substância cinzenta frontolímbica *post mortem* [101]. Ao mesmo tempo, aumento do volume da substância cinzenta frontal e temporal também foi documentado [102].

Visto que a linguagem, funções executivas, interação social e comportamento emocional estão prejudicados no autismo, muitos estudos têm como foco o CPF, no qual foi relatado, por exemplo, aumento de 67% no número de neurônios em encéfalos de pacientes com autismo [103]. As alterações de conectividade estão entre os achados mais consistentes e o relato de diminuição na conectividade a longa distância entre córtices frontal e temporal e entre esses e outras estruturas foi documentado por alguns grupos de pesquisa [104-106]. Enquanto isso, localmente, hiperconectividade foi descrita [90] acompanhada de aumento no número de colunas e diminuição da espessura das mesmas [96].

Alterações funcionais também são documentadas com frequência. Estudos utilizando diagnóstico por imagem do CPF demonstram atividade anormal desta área durante a realização de algumas tarefas. Ao realizar tarefas sociais, por exemplo, indivíduos autistas mostraram ativação reduzida ou deslocada do córtex pré-frontal medial [107, 108], enquanto que ao longo de tarefas cognitivas essa região não apresentou o padrão de inativação esperado [109]. Além disso, o recrutamento prejudicado de áreas específicas do CPF pode ser a base do julgamento social de comunicação verbal-não verbal incongruente [110]. Interessantemente, genes envolvidos na diferenciação entre córtex temporal e frontal durante o desenvolvimento estão diminuídos no encéfalo de pacientes com autismo [111].

O CCA é um componente-chave do sistema límbico e que contribui para os comportamentos afetivos e cognitivos, bem como atividade motora. Juntamente com áreas neocorticais relacionadas, o funcionamento do CCA está implicado na interação social [112], teoria da mente e atenção [113]. Não é surpresa, portanto, que alterações nessa estrutura sejam relatadas com frequência em pacientes com autismo. Em uma análise microscópica do CCA, foi demonstrada redução no tamanho e na densidade celular de camadas específicas além de laminação irregular e maior densidade de neurônios na substância branca subcortical [114]. Além disso, já foi documentada

redução na substância cinzenta [100] e hipoativação das áreas específicas do CCA em tarefas sociais e não sociais [115, 116].

As anormalidades no cerebelo, o qual tem papel em várias funções motoras e cognitivas, consistem em achados frequentes. Dentre as alterações cerebelares, a redução no número e tamanho das Células de Purkinje são mais comumente documentadas [87, 117, 118]. Existem evidências de neuroinflamação e estresse oxidativo no cerebelo de pacientes com autismo, além de anormalidades em diferentes sistemas de neurotransmissores como GABA, glutamato, dopamina e outros [119]. Além disso, genes envolvidos no desenvolvimento do cerebelo foram associados ao autismo [120-122].

Os indivíduos com autismo apresentam, também, alterações no desenvolvimento da amígdala e do hipocampo. O hipocampo, necessário para aprendizado e memória de curto prazo, apresentou aumento no tamanho [123, 124]. Já os resultados em relação ao tamanho da amígdala apresentam um pouco mais de variação uma vez que estudos já demonstraram aumento [123, 125] e diminuição na amígdala [126]. Outros dados incluem redução no número de neurônios na amígdala [127] bem como conectividade atípica e redução da habituação da amígdala correlacionada com escala de responsividade social [128, 129]

Dada a presença de comportamentos repetitivos e estereotipados em pacientes com autismo, alterações nos núcleos da base também já foram encontradas. Sabe-se que o desenvolvimento do caudado é diferente entre autistas e controles [130] e que existem prejuízos funcionais e estruturais nesta região [130-132] como, por exemplo, hiperativação durante processos sensório-motores [133]. Encontrou-se, ainda, correlação positiva entre o tamanho do caudado direito e do putâmem com o escore de comportamentos repetitivos em uma escala padronizada [130, 134]. Durante imitação de expressões faciais e tarefas de flexibilidade cognitiva, pacientes com autismo apresentam hipoativação do estriado [135, 136], estrutura que

apresenta excesso de conexões funcionais com áreas como tronco encefálico e ínsula [137]

Outras estruturas afetadas incluem o giro fusiforme, localizado no lobo temporal ventral, o qual tem papel no reconhecimento de faces e cuja atividade encontra-se reduzida durante processamento de faces em pacientes com autismo [138-140]. Existem evidências de disfunção do sistema de neurônios espelho, o qual está envolvido com a Teoria da Mente [141] e também das Áreas de Broca e Wernicke, envolvidas com a linguagem, que mostram ativação anormal no autismo [142].

1.1.7 Neuroquímica

Evidências oriundas de estudos genéticos, epigenéticos, com modelos animais e com amostras humanas apontam para alterações em diferentes substâncias no encéfalo autista.

Alterações na transmissão serotoninérgica estão entre os achados mais frequentes e mais “antigos” da pesquisa sobre as bases biológicas do autismo. Sabe-se que pacientes com autismo apresentam quantidades elevadas de serotonina periférica [143] ao passo que os dados apontam para redução na atividade serotoninérgica a nível central [144].

Sabe-se que reduções nos níveis de triptofano exacerbam comportamentos repetitivos e compulsivos em adultos com autismo sem tratamento farmacológico [145] e que animais com depleção de serotonina central apresentam características do tipo autista [144]. Além disso, polimorfismos no gene da triptofano-hidroxilase, uma enzima limitante na síntese de serotonina foram associados com comportamentos repetitivos e com autismo em alguns estudos [146-148]. Estudos de neuroimagem também fornecem evidências convincentes de que a transmissão serotoninérgica encontra-se

alterada no autismo uma vez que alterações na síntese, transportadores e receptores de serotonina foram avaliados usando PET e SPECT e diferentes traçadores em pequenos grupos de crianças e adultos com autismo comparados com controles [149].

Apesar dos estudos, uma conclusão bem definida em relação ao papel da serotonina no desenvolvimento do distúrbio se torna difícil quando verificamos que medicações utilizadas no tratamento de alguns sintomas possuem diferentes ações sobre a serotonina e que as alterações encontradas variam entre as estruturas encefálicas [96].

Um cenário semelhante existe em relação à dopamina. Alterações na função dopaminérgica em regiões corticais frontais de crianças e adultos com autismo foram documentadas. No entanto, apesar do padrão de atividade dopaminérgica diferir dependendo da região estudada, os achados apontam para uma hiperdopaminergia levando ao desenvolvimento anormal das regiões frontal e temporal [96]. Além disso, sabe-se que agentes dopaminérgicos aliviam alguns sintomas do autismo, o que pode indicar contribuição do neurotransmissor no desenvolvimento da patologia [150, 151].

Dado o papel do glutamato no desenvolvimento do SNC, bem como seu envolvimento na epilepsia – comorbidade frequentemente encontrada em pacientes com autismo - este neurotransmissor também tem sido alvo de diferentes estudos sobre o autismo. Assim como a serotonina, níveis séricos elevados de glutamato também foram encontrados em adultos com autismo [152, 153]. As diferenças nas concentrações de glutamato/glutamina (Glx) entre pacientes com autismo e pessoas com desenvolvimento neurotípico variam de acordo com a região pesquisada. Foi encontrado aumento na concentração de Glx na região da amígdala/hipocampo mas não na região parietal em pessoas com autismo [154], ao passo que o mesmo índice se mostrou diminuído no CCA direito e na junção temporoparietal esquerda [155], nos hemisférios cerebrais e no cerebelo, sugerindo redução na integridade neuronal da substância cinzenta e disfunção dos neurônios glutamatérgicos corticais e cerebelares

[156]. Além disso, genes de diferentes receptores e transportadores glutamatérgicos estão associados com o autismo [157, 158].

Sabe-se que o equilíbrio entre as transmissões glutamatérgica e GABAérgica é essencial na regulação da cognição e de comportamentos emocionais e, não surpreendentemente, a excitotoxicidade proveniente do desbalanço entre glutamato e GABA foi ligada ao autismo [159]. Além disso, paralelamente aos dados que mostram maior ativação da transmissão glutamatérgica, existem evidências de redução da transmissão inibitória no encéfalo do paciente com autismo.

Padrões anormais de expressão de genes de receptores e enzimas ligadas à neurotransmissão GABAérgica foram documentados [160]. Pacientes com autismo apresentam redução de 50% nos níveis proteicos das enzimas GAD65 e GAD67 nos córtices parietal e cerebelar [161]. Além disso, defeitos nas fibras GABAérgicas foram relacionados com a maior prevalência de convulsões em pacientes autistas [97]. Estudos utilizando técnicas de diagnóstico por imagem mostram menor ligação aos receptores GABA_A na amígdala, verme cerebelar, córtices frontal, parietal e occipital de pacientes com doenças genéticas onde o comportamento autista está presente [162]. A região 15q11-q13 contém diferentes genes que codificam subunidades dos receptores GABA_A e, interessante, diversas alterações cromossômicas envolvendo este segmento do cromossomo 15 estão ligadas ao desenvolvimento do autismo [160]. Observou-se, ainda, redução significativa no receptor GABA_B no CCA e no giro fusiforme de pacientes com autismo [163].

Diferentemente de outros neurotransmissores, as concentrações de noradrenalina (Noe) central e periférica possuem correlação. Alguns trabalhos já demonstraram que pacientes com autismo apresentam níveis plasmáticos maiores de Noe [149]. Em relação aos níveis centrais, estudos mostram redução de Noe em regiões encefálicas como cerebelo, região do hipocampo/amígdala e algumas áreas

do lobo temporal [164-166]. No entanto, as evidências não apontam para um papel significativo da Noe no autismo [149, 162].

1.2 Astrócitos

Os astrócitos são as células mais numerosas no SNC [167]. Após diversos anos onde os neurônios eram os únicos protagonistas da neurociência, essas células assumiram papel de componentes sofisticados que participam em uma ampla e diversa gama de funções vitais para o desenvolvimento normal do encéfalo bem como para a fisiologia e patologia adultas.

Sabe-se hoje que os astrócitos ocupam territórios (domínios astrocíticos) que fisiologicamente não se sobrepõem mais do que 10% e que uma única dessas células pode estabelecer contato com centenas de neuritos e múltiplos corpos neuronais [168]. Além da interação física entre astrócitos e elementos pré- e pós-sinápticos, hoje sabe-se que existe participação dessas células na troca de informações uma vez que as mesmas respondem à estimulação neuronal e regulam a transmissão sináptica [168-170]. Estes dados que comprovaram a comunicação bidirecional entre astrócito e neurônio trouxeram à tona a chamada “sinapse tripartite” [169].

Após anos de pesquisa intensa desde a descoberta pioneira das ondas de Cálcio astrocíticas e liberação de glutamato sobre os neurônios *in vitro*, diversas perguntas em relação a essas células têm sido respondidas graças aos avanços tecnológicos. Atualmente se sabe que os astrócitos desempenham diversas funções como (1) produção de matriz extracelular e fatores tróficos controlando processos como a neurogênese; (2) formação e manutenção da barreira hemato-encefálica além de controle da permeabilidade; (3) tamponamento de potássio; (4) captação de glutamato e GABA, (5) suporte metabólico, (6) modulação da transmissão e

plasticidade sináptica através de gliotransmissores e junções comunicantes e (7) funções imunológicas [169, 171].

Não é necessário muito esforço para percebermos o quanto a função astrocítica pode, portanto, influenciar o desempenho neuronal. O papel dessas células na patologia do sistema nervoso tem sido elucidado e já se conhece sua contribuição em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, na epilepsia, na doença de Alexander, na hipóxia/isquemia e também em doenças psiquiátricas [172, 173].

Reforçamos aqui o fato dos astrócitos responderem a todas as formas de dano ao SNC através de um processo chamado de astrogliose reativa, o qual se tornou uma característica patológica de lesões estruturais do SNC. A compreensão sobre as funções e mecanismos da astrogliose reativa é cada vez maior e, com isso a identificação do papel dos astrócitos nas doenças e patologias do SNC vem se expandindo [173, 174].

Hoje está claro que a astrogliose reativa não é um simples fenômeno de tudo-ou-nada mas, sim, um processo gradual de alterações que depende do contexto e que é regulado por eventos sinalizadores específicos. Tais alterações variam de mudanças reversíveis na expressão gênica e hipertrofia celular até a formação de cicatriz a longo prazo com rearranjo da estrutura tecidual [174].

Evidências crescentes apontam para o papel potencial da astrogliose reativa nas doenças do SNC através da perda de funções astrocíticas normais ou ganho de efeitos anormais, o que reforça a necessidade cada vez maior de compreendermos o papel dos astrócitos na patologia do sistema nervoso.

1.3 Glia e autismo

Mesmo ganhando cada vez mais espaço no campo das neurociências, a compreensão do papel das células gliais no autismo ainda apresenta diversas lacunas. Apesar da escassez de trabalhos, mudanças na morfologia e densidade microgliais, por exemplo, já foram documentadas no autismo [175].

Em 2005, dois trabalhos buscando alterações gliais no encéfalo de pacientes com autismo foram conduzidos e ambos encontraram níveis aumentados de GFAP nas amostras utilizadas. Em um dos trabalhos os autores documentaram níveis maiores de GFAP nos córtices frontal, parietal e cerebelar de cérebros de pacientes com autismo, indicando gliose reativa e dano ao tecido encefálico [176]. No outro estudo foram encontradas evidências de ativação glial e neuroinflamação no encéfalo demonstradas através do aumento na expressão de GFAP e níveis elevados de citocinas MCP-1 e TGF β 1 no cerebelo, giro do cíngulo e médio-frontal córtex dos mesmos [177]. Outros dois marcadores astrocíticos foram pesquisados em amostras de tecido encefálico obtidas de necropsias de pacientes com autismo. Foram encontrados aumento da expressão da conexina 43 no córtex frontal superior e diminuição da aquaporina 4 no cerebelo [178].

Alterações na microglia como maior densidade dessas células nos córtices fronto-insular e visual [179] e diferenças na distribuição de células microgliais em relação aos neurônios no córtex pré-frontal dorsolateral também foram documentadas [180].

É importante ressaltar que o número de estudos apontando para disfunções neuroimunológicas no autismo é cada vez maior. Sabe-se, atualmente, que a microglia e a astroglia secretam citocinas, quimiocinas e metaloproteinases que aumentam a magnitude das reações imunes no SNC [181] e, portanto, não é possível tratar sobre neuroimunologia sem abordar as células gliais. Evidências apontam para a existência de processo neuroinflamatório no encéfalo de pacientes com autismo, incluindo

aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no líquido [182] e no tecido encefálico [183] o que indica a participação da glia na fisiopatologia do autismo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar parâmetros astrocíticos em diferentes estruturas encefálicas de ratos Wistar machos expostos *in utero* ao ácido valpróico.

2.2 Objetivos específicos

Hipocampo

- Quantificar astrócitos GFAP⁺ e vimentina⁺ (P4 e P15)
- Quantificar a expressão protéica de GFAP e S100B (P4 e P15)
- Avaliar a atividade da enzima glutamina sintetase (P4, P15 e P120)
- Avaliar o conteúdo de glutathiona reduzida (P4, P15 e P120)
- Avaliar captação de glutamato (P15 e P120)
- Quantificar a expressão protéica dos transportadores de glutamato gliais EAAT1 e EAAT2 (P15 e P120)

Cerebelo

- Quantificar astrócitos GFAP⁺ e vimentina⁺ (P4 e P15)
- Quantificar a expressão protéica de GFAP e S100B (P4 e P15)
- Avaliar a atividade da enzima glutamina sintetase (P4 e P15)
- Avaliar o conteúdo de glutathiona reduzida (P4 e P15)

Estriado

- Quantificar a expressão protéica de GFAP (P4 e P15)
- Quantificar a expressão protéica de S100B (P15)
- Avaliar a atividade da enzima glutamina sintetase (P15)
- Avaliar o conteúdo de glutathiona reduzida (P15)

Cortex pré-frontal

- Quantificar a expressão protéica de GFAP e S100B (P4 e P15)
- Avaliar a atividade da enzima glutamina sintetase (P4 e P15)
- Avaliar o conteúdo de glutathiona reduzida (P4 e P15)

3 RESULTADOS

**Capítulo 1: Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate:
altered glutamate metabolism in the hippocampus**

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres

Brain Research



Research Report

Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Altered glutamate metabolism in the hippocampus

Roberta Bristot Silvestrin^{a,b,c,*}, Victorio Bambini-Junior^{a,b,c,1}, Fabiana Galland^b, Larissa Daniele Bobermim^b, André Quincozes- Santos^b, Renata Torres Abib^{a,b}, Caroline Zanotto^b, Cristiane Batassini^b, Giovana Brolese^b, Carlos-Alberto Gonçalves^b, Rudimar Riesgo^{a,c,d}, Carmem Gottfried^{a,b,c}

^aResearch Group in Neuroglial Plasticity at the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^bDepartment of Biochemistry, Institute of Health's Basic Science and Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^cTranslational Research Group in Autism Spectrum Disorders (GETEA) at the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^dPediatric Neurology Center, Porto Alegre Clinical Hospital (HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 28 November 2012

Available online 5 December 2012

Keywords:

Autism

Valproic acid

Animal model

Glutamate

Astrocyte

ABSTRACT

Autism spectrum disorders (ASD) are characterized by deficits in social interaction, language and communication impairments and repetitive and stereotyped behaviors, with involvement of several areas of the central nervous system (CNS), including hippocampus. Although neurons have been the target of most studies reported in the literature, recently, considerable attention has been centered upon the functionality and plasticity of glial cells, particularly astrocytes. These cells participate in normal brain development and also in neuropathological processes. The present work investigated hippocampi from 15 (P15) and 120 (P120) days old male rats prenatally exposed to valproic acid (VPA) as an animal model of autism. Herein, we analyzed astrocytic parameters such as glutamate transporters and glutamate uptake, glutamine synthetase (GS) activity and glutathione (GSH) content. In the VPA group glutamate uptake was unchanged at P15 and increased 160% at P120; the protein expression of GLAST did not change neither in P15 nor in P120, while GLT1 decreased 40% at P15 and increased 92% at P120; GS activity increased 43% at P15 and decreased 28% at P120; GSH content was unaltered at P15 and had a 27% increase at P120. These data highlight that the astrocytic clearance and destination of glutamate in the synaptic cleft might be altered in autism, pointing out important aspects to be considered from both pathophysiological and pharmacological approaches in ASD.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Correspondence to: Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, BRAZIL. fax: +55 51 3308 5540.

E-mail address: betasilvestrin@yahoo.com.br (R. Bristot Silvestrin).

¹ Both authors contributed equally to this work.

1. Introduction

The term Autism Spectrum Disorder (ASD) refers to a group of conditions characterized by deficits in social interaction, language and communication impairments and repetitive and stereotyped behaviors. As stated in the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV-Text Revision (DSM-IV-TR), ASD comprises Autistic Disorder (also called “classic” autism), Pervasive Development Disorder Not Otherwise Specified (PDD-NOS), and Asperger's Disorder (Gadia et al., 2004). According to the DSM-V draft, the autism spectrum described in DSM-IV will be reorganized as a single category of ASD.

Although different theories have emerged trying to solve the autism puzzle and research has evolved, its etiology remains unknown and we still lack an objective diagnostic criteria and treatment options. Genetic factors such as mutations, deletions and copy number variants are implicated in causation of autism (Abrahams and Geschwind, 2008; Grigorenko, 2009). However, epidemiological studies have evidenced that adverse environmental conditions such as maternal exposure to infections, ethanol, thalidomide and Valproic Acid (VPA) increase the risk of autistic offspring (Arndt et al., 2005; Dufour-Rainfray et al., 2011). This might be one of the explanations to the increasing autism prevalence mainly when combined with changes in diagnostic practice. In fact, the number of children known to have autism has increased dramatically since the 1980s. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estimate the prevalence of autism in the United States to be 1 in 88 children, which generates a national cost of \$137 billion per year.

After clinical and animal studies, many encephalic structures have been implicated in autism pathology and these include the cerebellum (Amaral et al., 2008; Courchesne and Pierce, 2005), frontal cortex (Courchesne and Pierce, 2005), amygdala (Schultz, 2005), cingulate cortex (Oblak et al., 2009, 2011) and the hippocampus (Courchesne and Pierce, 2005; Raymond et al., 1996). Some alterations documented in autism are however, age-dependent. Brain size, for example, which is greater in autistic child when compared to control individuals but reaches normal values when analyzed in adolescents or adults, is one of the most consistent alterations (Amaral et al., 2008) and seems to be related to another discovery showing cortical thinning with age in autism (Wallace et al., 2010). Gray matter and amygdala volumes have also been studied in autistic subjects and different results were found depending on age (Greimel et al., 2012; Schumann et al., 2004). In a recent publication, age-dependent patterns of gene expression were found in the autistic prefrontal cortex. Some authors have shown that in autism, young prefrontal cortex shows impaired developmental pathways while the adult one displays arrested growth and degeneration (Chow et al., 2012).

There are also evidences showing that specific neurotransmitter systems may be altered; such as serotonin, GABA (Oblak et al., 2009; Oblak et al., 2010), glutamate (Choudhury et al., 2011) and others (Lam et al., 2006).

Although most studies focus on neuronal parameters, glial cells have been gaining more attention in the last years. It is known that astrocytes, the third component of the synapse (Araque et al., 1999), are able to process synaptic information displaying bidirectional communication with neurons

(Araque et al., 2001; Perea et al., 2009). These cells have also emerged as sophisticated elements participating in a variety of processes required to normal brain development and, consequently, might be involved in different brain disorders. Some studies have found astroglial activation in brains from patients with autism (Anderson et al., 2008; Vargas et al., 2005) with increased GFAP expression (Laurence and Fatemi, 2005), alterations in aquaporins and connexins (Fatemi et al., 2008) and mutant glial adhesion molecules (Lopez-Hernandez et al., 2011).

When looking at astrocytes, it is important to take the glutamatergic system into account once those cells are essential to the homeostasis of this neurotransmitter. After the uptake of glutamate through excitatory amino acid transporters 1 (GLAST) and 2 (GLT1), astrocytes are able to convert this neurotransmitter into glutamine via glutamine synthetase (GS) (Bak et al., 2006; Danbolt, 2001). Glutamine, in turn, is taken up by glutamatergic neurons and used for the resynthesis of glutamate. Glutamate can also be used as a substrate per se for glutathione (GSH) synthesis (Dringen et al., 1999). Glutamate is known to be involved in the control of neuronal migration, differentiation, neurite outgrowth, synaptogenesis and neuron survival in the developing brain (Choudhury et al., 2011). In addition, some authors hypothesize that many core features of autism are caused by abnormalities in glutamatergic system (Blaylock and Strunecka, 2009; Choudhury et al., 2011; Gadow et al., 2010; Gottfried and Riesgo, 2011; Purcell et al., 2001). Thus, by means of the VPA-induced animal model of autism (Bambini-Junior et al., 2011) we characterized important astrocytic parameters named glutamate uptake, GLAST and GLT1 immunoccontent, GS activity and the amount of GSH, in the hippocampus from young and adult male rats prenatally exposed to VPA.

2. Results

2.1. Glutamate uptake

As the excitotoxicity of the neurotransmitter glutamate has been shown to be connected with many acute and chronic diseases of the CNS, particularly in the hippocampus, and that the high affinity sodium-dependent glutamate transporters play a key role in maintaining adequate levels of extracellular glutamate, we decided to evaluate the *in vitro* profile of hippocampal glutamate uptake at P15 and P120 rats from both VPA and control groups (Fig. 1). Values are expressed as nmol/mg protein/min. The glutamate uptake at P15 was unchanged between VPA (1.83 ± 0.22) and control (1.85 ± 0.20) groups. However, at P120, there was a significantly increase in glutamate uptake in VPA group (0.99 ± 0.07), compared to the control (0.38 ± 0.05), $P < 0.01$. Interestingly, among control groups, glutamate uptake was 80% lower in P120 than in P15.

2.2. GLAST and GLT1 immunoccontent

Once glutamate uptake depends mainly upon astrocytic glutamate transporters, named GLAST and GLT1, we decided to evaluate their immunoccontent in order to understand the differences found in glutamate uptake.

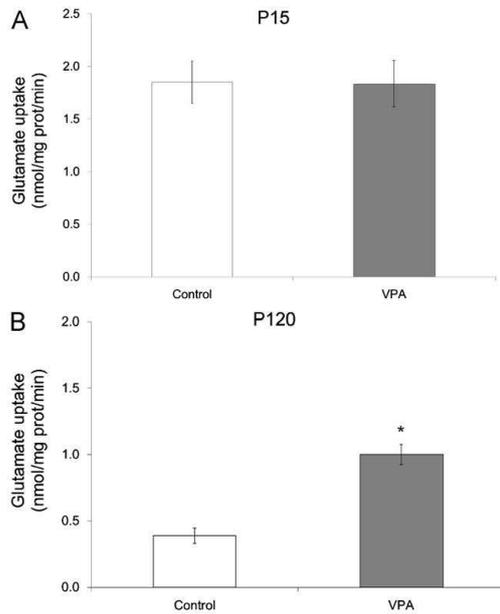


Fig. 1 – The effect of prenatal exposure to VPA on hippocampal glutamate uptake. Homogenized tissue samples were incubated as described in experimental procedure section. Each sample was measured in triplicate and data analysis was performed by Student's t test. Data represent the mean \pm SE values. (A) P15 ($n=5$) and (B) P120 ($n=4$) days old rats. Statistically significant difference from control values is indicated by * $P<0.01$.

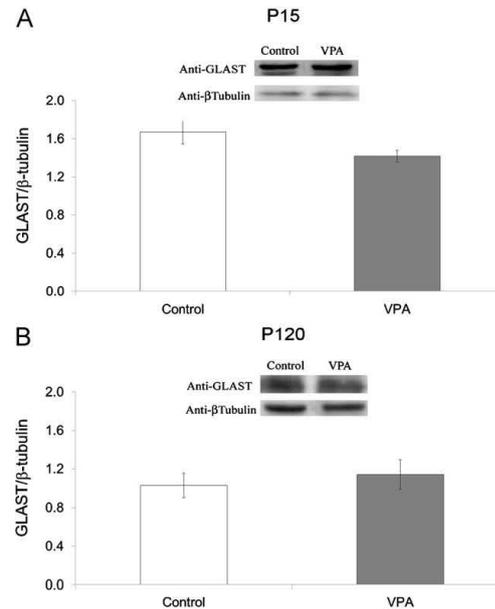


Fig. 2 – The effect of prenatal exposure to VPA on hippocampal GLAST immunocent. Homogenized tissue samples were incubated as described in experimental procedure section. Each sample was measured in duplicate and data analysis was performed by Student's t test. Data represent the mean \pm SE values. (A) P15 ($n=4$) and (B) P120 ($n=4$) days old rats. Statistically significant difference from control values is indicated by * $P<0.05$ and # $P<0.01$.

The immunocent of GLAST (Fig. 2) was unchanged when VPA group was compared to the control group in both P15 (1.42 ± 0.06 and 1.67 ± 0.12 , respectively) and P120 (1.14 ± 0.15 and 1.02 ± 0.12 , respectively) rats. However, GLT1 immunocent decreased 40% in VPA-P15 animals (1.48 ± 0.22) when compared to the control group (0.88 ± 0.06), $P<0.05$ (Fig. 3A). Interestingly, GLT1-P120 (Fig. 3B) increased 92% in VPA (0.70 ± 0.07) group when compared to the control group (1.35 ± 0.19), $P<0.01$.

2.3. Glutamine synthetase activity

Aiming to understand a possible destiny to the intracellular glutamate, particularly at P120 which had a higher glutamate uptake, we investigated hippocampal GS activity (expressed as $\mu\text{mol/h/mg}$ protein). At P15 (Fig. 4A), GS activity increased 43% in VPA group (3.13 ± 0.28) when compared to control rats (2.19 ± 0.1), $P<0.05$. However, for our surprise, at P120 (Fig. 4B) the activity of GS decreased 28% (0.15 ± 0.01) in VPA when compared to the control group (0.21 ± 0.01), $P<0.01$.

2.4. Glutathione content

Other metabolic destiny of glutamate is GSH, synthesized in the cytosol via two ATP-requiring enzymatic steps: the formation

of g-glutamylcysteine from L-glutamate and L-cysteine, and the formation of GSH from g-glutamylcysteine and glycine. As showed in Table 1, although there was a higher GSH content in VPA rats at P15, this difference was not statistically significant. On the other hand, VPA group showed a significantly increase (27%) in GSH content at P120. The absolute values (nmol/mg protein) changed from 1.0 ± 0.40 (control) to 1.8 ± 0.5 (VPA) at P15 and from 51.77 ± 4.06 (control) to 65.69 ± 3.59 (VPA), at P120 ($P<0.05$).

3. Discussion

The involvement of glial alterations in a large variety of CNS diseases is now easy to conceive once it is well established that the active brain displays a network of integrated and interactive neurons and glial cells. Yet, only recently this concept has been applied in understanding the pathogenesis and pathophysiology of autism, including studies on microglia (Morgan et al., 2010), oligodendrocytes (Carmody and Lewis, 2010) and astrocytes (Fatemi et al., 2008).

Astrocytes may represent an important and potential source of investigation to evaluate mechanisms that might be related to brain dysfunctions in ASD. Given their critical role in maintenance of neuronal microenvironment and modulation

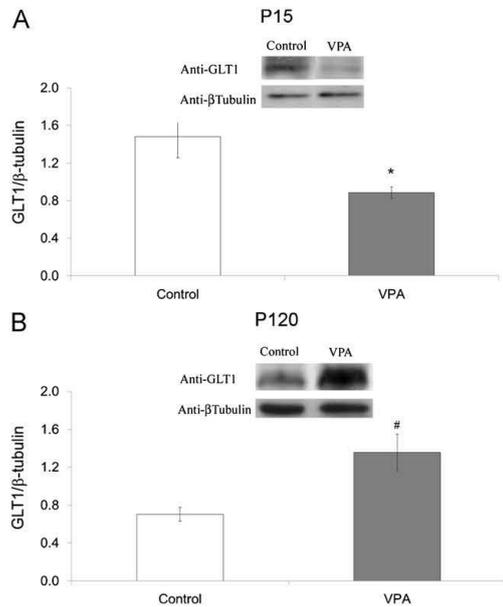


Fig. 3 – The effect of prenatal exposure to VPA on hippocampal GLT1 immunoccontent. Homogenized tissue samples were incubated as described in experimental procedure section. Each sample was measured in duplicate and data analysis was performed by Student's t test. Data represent the mean ± SE values. **A)** P15 (n=4) and **B)** P120 (n=4) days old rats. Statistically significant difference from control values is indicated by *P<0.05 and #P<0.01.

of excitatory synapses, individual astrocytes occupy distinct, non-overlapping domains and extend fine membranous processes that may ensheat about 140,000 synapses (Benarroch, 2009). It has also been estimated that more than 99% of cerebrovascular surface is ensheathed by astrocytic processes (Nimmerjahn, 2009). Hence, the comprehension of astrocyte functions and the involvement of these cells in ASD offer the potential for developing novel strategies to improve autism symptoms. In addition, as most of basic research on autism focuses on adolescent or adult rats, there is a clearly lack for studies in early postnatal stages of development. In the present work, samples from young rats (P15) were included for the first time in the evaluation demonstrating, in addition of prenatal VPA effects, interesting differences between young and adult ages. Our experiments were done using the hippocampus as the target structure once it might be responsible for the cognitive deficits and impairments in affective behavior and emotional regulation in patients with autism (Bauman and Kemper, 2005; Dager et al., 2007; Groen et al., 2010; Schumann et al., 2004).

In this context, the present data contribute to a better understanding of neural alterations, closer to the time point of VPA induction, in which autism-like features are triggered in this experimental model. As it is difficult to determine if the neural alterations observed in older VPA treated rats are cause or consequence of the disorder, the understanding

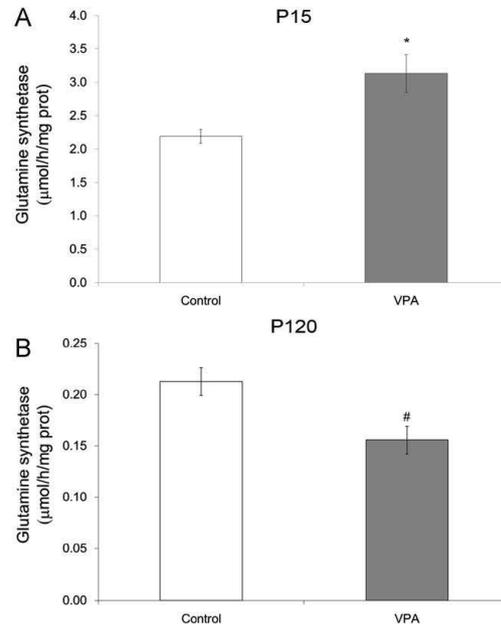


Fig. 4 – The effect of prenatal exposure to VPA on hippocampal GS activity. Homogenized tissue samples were incubated as described in experimental procedure section. Each sample was measured in triplicate and data analysis was performed by Student's t test. Data represent the mean ± SE values. **(A)** P15 (n=8 for control group and n=10 for VPA group) and **(B)** P120 (n=4) days old rats. Statistically significant difference from control values is indicated by *P<0.05 and #P<0.01.

Table 1 – The effect of prenatal exposure to VPA on hippocampal GSH.

	P15	P120
Control	1.0±0.40	51.77±4.06
VPA	1.8±0.50	65.69±3.59*

Homogenized tissue samples were incubated as described in experimental procedure section. Each sample was measured in triplicate and data analysis was performed by Student's t test. Data are expressed as mean ± SE at P15 (n=4) and P120 (n=7) days old rats. Significant difference from control values is indicated by *P<0.05.

of early postnatal neural changes are of great relevance in ASD studies. Accordingly, from a translational perspective (Clancy et al., 2001), this kind of study may provide new clues concerning the factors involved in triggering ASD and may contribute to the development of new therapeutic strategies or diagnostic criteria.

In the present data we are showing, for the first time, an important age dependent difference in hippocampal glutamate uptake from rats after prenatal exposure to VPA, with a significant increase in glutamate uptake at P120. Glutamate

seems to play an important role on autism development (Choudhury et al., 2011) and, once its homeostasis is strongly dependent upon glial status (McKenna, 2007; Wang and Bordey, 2008), our findings could highlight a biologically significant pathway possibly involved on the pathophysiology of autism.

Our data show an age-dependent reduction in glutamate uptake, as evidenced by results obtained with P15 and P120 control rats, which is in accordance with the literature (Thomazi et al., 2004). We found that this effect was still observed after prenatal exposure to VPA. Once this effect may be explained by higher glutamate transporter expression (GLAST and GLT-1), as described in the literature (Thomazi et al., 2004), we decided to investigate the protein expression of the glial glutamate transporters. Despite the changes in glutamate uptake observed in VPA group at P15 and P120, the protein expression of GLAST was unchanged both in young and adult rats. Interestingly, prenatal exposure to VPA induced an age-dependent pattern of GLT1 expression, with 40% reduction in P15 and 92% increase in P120. Developmental studies showed that GLT1 display a significant transition period between postnatal 10 and 20 days with huge variations in its expression, while hippocampal GLAST is more stable around the same period (Furuta et al., 1997; Kugler and Schleyer, 2004). Therefore, the instability of GLT1 expression may explain the different profile in glutamate uptake observed in young animals. We also must have in mind that, although GLT1 is decreased in P15, we do not have information about its functionality and since we are dealing with a brain maturation period, the effectiveness of glutamate uptake may not be a direct reflect of transporters amount. In addition, it is known that neuronal activity exerts influence over GLT1 dynamics (Benediktsson et al., 2012). Since P15 brain is still in development, changes in neuronal number and function may also contribute to this unstable context of transporter amount and uptake efficacy.

To clarify the fate of astrocytic glutamate, which is increased on hippocampus from adult VPA rats, we investigated GS activity since it is expected that glutamate could be naturally converted in glutamine by astrocytes. However, GS activity was increased only at P15 in spite of the unchanged glutamate uptake observed at this age. In addition, a decreased activity of GS was observed in hippocampus from P120 rats, contrasting with the increased glutamate uptake found in this age, indicating that the additional amount of astrocytic glutamate has probably been deviated to other pathway. A plausible possibility is that glutamate might have been directed to energetic metabolism to compensate a disturbance of mitochondrial energy production, considering that in humans there is evidence of mitochondrial alterations in autism (Guevara-Campos et al., 2011). In addition, there is evidence that excessive Ca^{2+} levels are responsible for boosting aspartate–glutamate carrier (AGC) activity, mitochondrial metabolism and, in a more variable degree, oxidative stress in brains from patients with ASD (Palmieri et al., 2010; Palmieri and Persico, 2010). Besides, considering that GS activity has been associated with astrocyte maturation during nervous system development Patel et al. (1983)), the decreased GS activity observed in adult rats may therefore reflect impairment in astrocytic maturation in prenatally exposed VPA rats.

The activity of GS displayed an age-dependent decrease as shown by control group results. It is well known that the aged brain display neural environment alterations which makes it more susceptible to neurodegenerative diseases. Some of these alterations include a pro-inflammatory profile characterized by higher levels of reactive species and pro-inflammatory cytokines (Bodles and Barger, 2004; Campuzano et al., 2009). In this context some authors have shown that oxygen reactive species and cytokines such as TNF- α are known to negatively influence GS activity (Santin et al., 2011; Zou et al., 2010), which might therefore, explain our results. Besides, despite the increased glutamate uptake observed in P120 VPA rats, this group showed also increased GSH levels. This is consistent with an endogenous protection against a pro-oxidative environment, consuming glutamate, decreasing it as a substrate for GS function, which in turn may decrease its activity.

Nevertheless, glutamate also serves as a substrate *per se* for GSH synthesis. In addition, it acts in the glutamate–cysteine antiporter, promoting the increase of intracellular cysteine, another substrate for GSH synthesis (Dringen et al., 1999). Interestingly, we observed a significantly increase in the content of reduced GSH in VPA group at P120, reinforcing the antioxidant role of astroglial cells mediated by prenatal exposure to VPA. In fact, the pathology of autism has been correlated with alterations in oxidative stress parameters (James et al., 2006), including GSH metabolism, mitochondrial dysfunctions and elevation of oxidative stress markers. Besides, increased levels of reactive species in the hippocampus from patients with autism have been documented (Palmieri et al., 2010; Palmieri and Persico, 2010) and this might be a possible explanation for the persistently increase of GSH levels demonstrated in the present work. Although both GSH and GSSG occur in tissues, more than 99.5% of the total tissue glutathione (i.e., GSH+GSSG, in GSH equivalents) are in the form of reduced GSH (Anderson et al., 1985). Thus, an increased hippocampal content of reduced GSH could at least partially explain one of the fate of glutamate, towards GSH biosynthesis.

Furthermore, the increased AGC activity in autistic brain could imply in a higher transport of glutamate into the mitochondrial matrix (Napolioni et al., 2011; Palmieri et al., 2010; Palmieri and Persico, 2010). As a consequence, an increased feeding of the TCA cycle with this amino acid could amplify the loading of energetic metabolism pathways (Chauhan et al., 2011; Weissman et al., 2008), with a respiratory chain overload, triggering the production of reactive species and thereby justifying the requirement of high GSH levels. In this way, the GSH role in autism core could be more important than actually believed.

The present data are summarized in Fig. 5, which also demonstrates a neuroglial hypothesis to the glutamate metabolism alterations in ASD. Physiologically, once into the astrocyte, glutamate can be directed to four major pathways (McKenna, 2007): (1) Protein synthesis and degradation, which flows as an essential and continuous cellular process; (2) glutamine synthesis through GS, which converts glutamate plus ammonia and ATP into glutamine and ADP; (3) GSH synthesis, the most abundant non-protein thiol and (4) energetic metabolism, since glutamatergic synapse represents a major energetic cost (Alle et al., 2009) and involves metabolic coupling between neurons and perisynaptic astroglial processes (Magistretti, 2009). Interestingly, The VPA group showed and

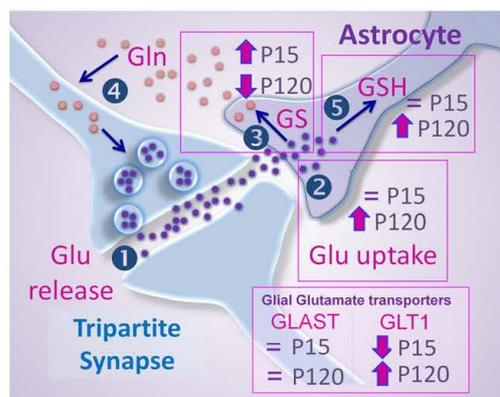


Fig. 5 – Glutamate metabolism at the tripartite synapse. Hypothesis for the influence of animal model of autism in rats prenatally exposed to VPA on glutamate metabolism at P15 and P120 days-old. The scheme illustrates: (1) Glu release at the synaptic cleft; (2) Glu uptake by astrocytes which is mediated two glutamate transporters: GLAST, which had no alterations in its protein expression and GLT1, which was decreased in P15 and increased in P120; (3) Glu conversion into glutamine (Gln) by the enzyme Glu synthetase (GS) and (4) the uptake of Gln by neurons followed by Glu resynthesis via glutaminase. Rats prenatally exposed to VPA at P15 increased GS activity, while at P120 increased glutamate uptake and decreased GS activity. Additionally, VPA group increased the synthesis of (5) glutathione (GSH) at P120, another important fate of glutamate in astrocytes. ↑ = increase, ↓ = decrease.

increased GS activity at P15 accompanied by a decrease in GLT1 amounts, which is a pattern observed in acute brain injuries (Lehmann et al., 2009; Sheldon and Robinson, 2007). On the other hand, GS activity was higher in P120 VPA rats, which also showed an increase in GLT1 content and in glutamate uptake. These findings have stimulated the view that the active brain should be regarded as a circuit of integrated and interactive neurons and glial cells. Consequently, astrocyte cells could also have important roles in ASD and an improved understanding of astrocyte biology and heterogeneity and the involvement of these cells in autism offers the potential for developing novel strategies to treat neurological disorders.

In summary, the present data highlights that the astrocyte clearance of glutamate from the synaptic cleft and its metabolic destiny are important aspects to be considered from both pathophysiological and pharmacological approaches in ASD

4. Experimental procedure

4.1. Subjects

Female Wistar rats were obtained from the local breeding colony (ICBS-Federal University of Rio Grande do Sul), with 12:12 light cycle (lights on at 7:00 and lights off at 19:00),

controlled temperature (22 ± 1 °C), water and food *ad libitum*. They were handled in accordance to the governmental and Brazilian Experimental Biology Societies Federation guidelines. The estrous cycle was monitored and females were mated overnight. The first day of gestation was considered when spermatozoa were found in the vaginal smear. Valproic acid (Acros Organics, New Jersey, USA) was purchased as the sodium salt and dissolved in 0.9% saline for a concentration of 250 mg/mL. Females received a single intraperitoneal injection of valproic acid (600 mg/kg, 250 mg/mL diluted in NaCl 0.9%) in the 12.5th day of pregnancy and control females received physiological saline at the same time as previously described (Bambini-Junior et al., 2011; Schneider and Przewlocki, 2005). Females were housed individually and were allowed to raise their own litters. The offspring rats were housed separately by sex. Male pups from three different litters were killed by decapitation at postnatal day 15 (P15 group) or 120 (P120 group). The brains were removed and hippocampal samples were kept in -80 °C until the assays were performed, except those used for glutamate uptake evaluation, which need fresh tissue to be realized. The number of animals used in each technique varied and is described in the following sections.

4.2. Glutamate uptake assay

Glutamate uptake was performed as previously described (Gottfried et al., 2002). Briefly, hippocampal sections obtained from P15 ($n=5$) and P120 ($n=4$) rats were incubated at 37 °C in a Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl; 5.36 KCl, 1.26 CaCl₂, 0.41 MgSO₄, 0.49 MgCl₂, 0.63 Na₂HPO₄ · 7H₂O, 0.44 KH₂PO₄, 4.17 NaHCO₃ and 5.6 glucose, adjusted to pH 7.4. The assay was started by addition of 0.1 mM L-glutamate and 0.33 μCi/ml L-[2,3-³H] glutamate. Incubation was stopped after 10 min by removal of the medium and rinsing the cells twice with ice-cold HBSS. The cells were then lysed in a solution containing 0.5 M NaOH. Radioactivity was measured in a scintillation counter. Final glutamate uptake (expressed as nmol/mg prot/min) was obtained by discounting non-specific uptake in assays carried out in sodium-free medium, prepared by replacing NaCl with choline chloride in the HBSS.

4.3. Protein expression of GLAST and GLT1

Hippocampal tissue homogenates obtained from P15 and P120 rats ($n=4$ for both VPA and control groups) were used. Equal amounts (20 μg) of proteins from each sample were boiled in sample buffer (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 5% (w/v) β-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, 0.002% (w/v) bromophenol blue) and electrophoresed in 10% (w/v) SDS-polyacrylamide gel. The separated proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane. Equal loading of each sample was confirmed with Ponceau S staining (Sigma) and using an anti-β-tubulin (MAB1637, Millipore). Membranes were blocked (overnight, 4 °C) with 5% albumin in T-TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) Anti-EAAT1 (AB416, Abcam) and Anti-EAAT2 (AB41621, Abcam) were used at a dilution of 1:1000. After incubating with the primary antibody overnight at 4 °C, membranes were washed and incubated

with peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulin (NA931V IgG, GE) at a dilution of 1:2000 at 4 °C overnight. The chemiluminescence signal was detected using an ECL kit from Amersham. Images were analyzed using Scion Image for Windows.

4.4. Glutamine synthetase activity

The enzymatic assay was performed as previously described (dos Santos et al., 2006). Briefly, tissue homogenate (0.1 mL) from P15 ($n=8$ for control group and $n=10$ for VPA group) and P120 ($n=4$ in both groups) rats were added to 0.1 mL of the reaction mixture containing (in mM): 10 MgCl₂; 50 L-glutamate; 100 imidazole-HCl buffer (pH 7.4); 10 2-mercaptoethanol; 50 hydroxylamine-HCl; 10 ATP and incubated for 30 min at 37 °C. The reaction was stopped by the addition of 0.4 ml of a solution containing (in mM): 370 ferric chloride; 670 HCl; 200 trichloroacetic acid. After centrifugation, the supernatant's absorbance was measured at 530 nm and compared to the absorbance generated by standard quantities of γ -glutamylhydroxamate, treated with ferric chloride reagent.

4.5. Glutathione content

The GSH content was determined, as described before (Browne and Armstrong, 1998). Briefly, hippocampal samples obtained from P15 ($n=4$) and P120 ($n=7$) rats homogenized in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) containing 5 mM EDTA and protein were precipitated with 1.7% metaphosphoric acid. The supernatant was assayed with *o*-phthalaldehyde (1 mg/mL of methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm, respectively. A calibration curve (0–500 μ M) was performed with standard GSH solution. Results are expressed as % of control and the number of animals used was four and seven rats per group at P15 and P120, respectively.

4.6. Protein determination

Protein content was determined as previously described (Lowry et al., 1951), using bovine serum albumin as standard.

4.7. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SE and were analyzed statistically by Student's *t* test and $P < 0.05$ was considered as statistically significant. All analyses were carried out using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software.

Acknowledgments

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the INCT-EN National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection.

REFERENCES

- Abrahams, B.S., Geschwind, D.H., 2008. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat. Rev. Genet.* 9, 341–355.
- Alle, H., Roth, A., Geiger, J.R., 2009. Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers. *Science* 325, 1405–1408.
- Amaral, D.G., Schumann, C.M., Nordahl, C.W., 2008. Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci.* 31, 137–145.
- Anderson, M.E., Powrie, F., Puri, R.N., Meister, A., 1985. Glutathione monoethyl ester: preparation, uptake by tissues, and conversion to glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 239, 538–548.
- Anderson, M.P., Hooker, B.S., Herbert, M.R., 2008. Bridging from cells to cognition in autism pathophysiology: biological pathways to defective brain function and plasticity. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 4, 10.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G., 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., 2001. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Ann. Rev. Physiol.* 63, 795–813.
- Arndt, T.L., Stodgell, G.J., Rodier, P.M., 2005. The teratology of autism. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23, 189–199.
- Bak, L.K., Schousboe, A., Waagepetersen, H.S., 2006. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* 98, 641–653.
- 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.
- Bauman, M.L., Kemper, T.L., 2005. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23, 183–187.
- Benarroch, E.E., 2009. Astrocyte–neuron interactions: implications for epilepsy. *Neurology* 73, 1323–1327.
- Benediktsson, A.M., Marrs, G.S., Tu, J.C., Worley, P.F., Rothstein, J.D., Bergles, D.E., Dailey, M.E., 2012. Neuronal activity regulates glutamate transporter dynamics in developing astrocytes. *Glia* 60, 175–188.
- Blaylock, R.L., Strunecka, A., 2009. Immune-glutamatergic dysfunction as a central mechanism of the autism spectrum disorders. *Curr. Med. Chem.* 16, 157–170.
- Bodles, A.M., Barger, S.W., 2004. Cytokines and the aging brain—what we don't know might help us. *Trends Neurosci.* 27, 621–626.
- Browne, R.W., Armstrong, D., 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol. Biol.* 108, 347–352.
- Campuzano, O., Castillo-Ruiz, M.M., Acarin, L., Castellano, B., Gonzalez, B., 2009. Increased levels of proinflammatory cytokines in the aged rat brain attenuate injury-induced cytokine response after excitotoxic damage. *J. Neurosci. Res.* 87, 2484–2497.
- Camody, D.P., Lewis, M., 2010. Regional white matter development in children with autism spectrum disorders. *Dev. Psychobiol.* 52, 755–763.
- Chauhan, A., Gu, F., Essa, M.M., Wegiel, J., Kaur, K., Brown, W.T., Chauhan, V., 2011. Brain region-specific deficit in mitochondrial electron transport chain complexes in children with autism. *J. Neurochem.* 117, 209–220.
- Choudhury, P.R., Lahiri, S., Rajamma, U., 2011. Glutamate mediated signaling in the pathophysiology of autism spectrum disorders. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 100, 841–849.
- Chow, M.L., Pramparo, T., Winn, M.E., Barnes, C.C., Li, H., Weiss, L., Fan, J., Murray, S., April, C., Belinson, H., Fu, X., Wynshaw-Boris, B., 2011. Brain region-specific deficit in mitochondrial electron transport chain complexes in children with autism. *J. Neurochem.* 117, 209–220.

- A., Schork, N.J., Courchesne, E., 2012. Age-dependent brain gene expression and copy number anomalies in autism suggest distinct pathological processes at young versus mature ages. *PLoS Genet.* 8, e1002592.
- Clancy, B., Darlington, R.B., Finlay, B.L., 2001. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105, 7–17.
- 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.
- Dager, S.R., Wang, L., Friedman, S.D., Shaw, D.W., Constantino, J.N., Artru, A.A., Dawson, G., Csernansky, J.G., 2007. Shape mapping of the hippocampus in young children with autism spectrum disorder. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 28, 672–677.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65, 1–105.
- dos Santos, A.Q., Nardin, P., Funchal, C., de Almeida, L.M., Jacques-Silva, M.C., Wofchuk, S.T., Goncalves, C.A., Gottfried, C., 2006. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 453, 161–167.
- Dringen, R., Pfeiffer, B., Hamprecht, B., 1999. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J. Neurosci.* 19, 562–569.
- Dufour-Rainfray, D., Vourc'h, P., Touriet, S., Guilloteau, D., Chalon, S., Andres, C.R., 2011. Fetal exposure to teratogens: evidence of genes involved in autism. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1254–1265.
- Fatemi, S.H., Folsom, T.D., Reutiman, T.J., Lee, S., 2008. Expression of astrocytic markers aquaporin 4 and connexin 43 is altered in brains of subjects with autism. *Synapse* 62, 501–507.
- Furuta, A., Rothstein, J.D., Martin, L.J., 1997. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.* 17, 8363–8375.
- Gadia, C.A., Tuchman, R., Rotta, N.T., 2004. Autism and pervasive developmental disorders. *J. Pediatr. (Rio J)* 80, S83–S94.
- Gadow, K.D., Roohi, J., DeVincent, C.J., Kirsch, S., Hatchwell, E., 2010. Glutamate transporter gene (SLC1A1) single nucleotide polymorphism (rs301430) and repetitive behaviors and anxiety in children with autism spectrum disorder. *J. Autism Dev. Disord.* 40, 1139–1145.
- Gottfried, C., Tramontina, F., Goncalves, D., Goncalves, C.A., Moriguchi, E., Dias, R.D., Wofchuk, S.T., Souza, D.O., 2002. Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mech. Ageing Dev.* 123, 1333–1340.
- Gottfried, C., Riesgo, R., 2011. Antipsychotics in the Treatment of Autism, Vol. 1, Intech.
- Greimel, E., Nehrkom, B., Schulte-Rüther, M., Fink, G.R., Nickl-Jockschat, T., Herpertz-Dahlmann, B., Konrad, K., Eickhoff, S.B., 2012. Changes in gray matter development in autism spectrum disorder. *Brain Struct. Funct.* [Epub ahead of print].
- Grigorenko, E.L., 2009. Pathogenesis of autism: a patchwork of genetic causes. *Future Neurol.* 4, 591–599.
- 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.
- Guevara-Campos, J., Gonzalez-Guevara, L., Briones, P., Lopez-Gallardo, E., Bulan, N., Ruiz-Pesini, E., Ramnarine, D., Montoya, J., 2011. Autism associated to a deficiency of complexes III and IV of the mitochondrial respiratory chain. *Invest. Clin.* 51, 423–431.
- James, S.J., Melnyk, S., Jernigan, S., Cleves, M.A., Halsted, C.H., Wong, D.H., Cutler, P., Bock, K., Boris, M., Bradstreet, J.J., Baker, S.M., Gaylor, D.W., 2006. Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 141B, 947–956.
- Kugler, P., Schleyer, V., 2004. Developmental expression of glutamate transporters and glutamate dehydrogenase in astrocytes of the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* 14, 975–985.
- Lam, K.S., Aman, M.G., Arnold, L.E., 2006. Neurochemical correlates of autistic disorder: a review of the literature. *Res. Dev. Disabil.* 27, 254–289.
- Laurence, J.A., Fatemi, S.H., 2005. Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects. *Cerebellum* 4, 206–210.
- Lehmann, C., Bette, S., Engele, J., 2009. High extracellular glutamate modulates expression of glutamate transporters and glutamine synthetase in cultured astrocytes. *Brain Res.* 1297, 1–8.
- Lopez-Hernandez, T., Ridder, M.C., Montolio, M., Capdevila-Nortes, X., Polder, E., Sirisi, S., Duarri, A., Schulte, U., Fakler, B., Nunes, V., Scheper, G.C., Martinez, A., Estevez, R., van der Knaap, M.S., 2011. Mutant GlialCAM causes megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, benign familial macrocephaly, and macrocephaly with retardation and autism. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 422–432.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Magistretti, P.J., 2009. Neuroscience. Low-cost travel in neurons. *Science* 325, 1349–1351.
- McKenna, M.C., 2007. The glutamate–glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J. Neurosci. Res.* 85, 3347–3358.
- Morgan, J.T., Chana, G., Pardo, C.A., Achim, C., Semendeferi, K., Buckwalter, J., Courchesne, E., Everall, I.P., 2010. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biol. Psychiatry* 68, 368–376.
- Napolioni, V., Persico, A.M., Porcelli, V., Palmieri, L., 2011. The mitochondrial aspartate/glutamate carrier AGC1 and calcium homeostasis: physiological links and abnormalities in autism. *Mol. Neurobiol.* 44, 83–92.
- Nimmerjahn, A., 2009. Astrocytes going live: advances and challenges. *J. Physiol.* 587, 1639–1647.
- Oblak, A., Gibbs, T.T., Blatt, G.J., 2009. Decreased GABA_A receptors and benzodiazepine binding sites in the anterior cingulate cortex in autism. *Autism Res.* 2, 205–219.
- Oblak, A.L., Gibbs, T.T., Blatt, G.J., 2010. Decreased GABA(B) receptors in the cingulate cortex and fusiform gyrus in autism. *J. Neurochem.* 114, 1414–1423.
- Oblak, A.L., Rosene, D.L., Kemper, T.L., Bauman, M.L., Blatt, G.J., 2011. Altered posterior cingulate cortical cytoarchitecture, but normal density of neurons and interneurons in the posterior cingulate cortex and fusiform gyrus in autism. *Autism Res.* 4, 200–211.
- Palmieri, L., Papaleo, V., Porcelli, V., Scarcia, P., Gaita, L., Sacco, R., Hager, J., Rousseau, F., Curatolo, P., Manzi, B., Militeri, R., Bravaccio, C., Trillo, S., Schneider, C., Melmed, R., Elia, M., Lenti, C., Saccani, M., Pascucci, T., Puglisi-Allegra, S., Reichelt, K.L., Persico, A.M., 2010. Altered calcium homeostasis in autism-spectrum disorders: evidence from biochemical and genetic studies of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier AGC1. *Mol. Psychiatry* 15, 38–52.
- Palmieri, L., Persico, A.M., 2010. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: cause or effect?. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1130–1137.
- Patel, A.J., Hunt, A., Tahourdin, C.S.M., 1983. Regional development of glutamine synthetase activity in the rat brain and its association with the differentiation of astrocytes. *Dev. Brain Res.* 8, 31–37.
- Perea, G., Navarrete, M., Araque, A., 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32, 421–431.

- Purcell, A.E., Jeon, O.H., Zimmerman, A.W., Blue, M.E., Pevsner, J., 2001. Postmortem brain abnormalities of the glutamate neurotransmitter system in autism. *Neurology* 57, 1618–1628.
- Raymond, G.V., Bauman, M.L., Kemper, T.L., 1996. Hippocampus in autism: a Golgi analysis. *Acta Neuropathol.* 91, 117–119.
- Santin, K., da Rocha, R.F., Cechetti, F., Quincozes-Santos, A., de Souza, D.F., Nardin, P., Rodrigues, L., Leite, M.C., Moreira, J.C., Salbego, C.G., Goncalves, C.A., 2011. Moderate exercise training and chronic caloric restriction modulate redox status in rat hippocampus. *Brain Res.* 1421, 1–10.
- Schneider, T., Przewlocki, R., 2005. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 30, 80–89.
- Schultz, R.T., 2005. Developmental deficits in social perception in autism: the role of the amygdala and fusiform face area. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23, 125–141.
- Schumann, C.M., Hamastra, J., Goodlin-Jones, B.L., Lotspeich, L.J., Kwon, H., Buonocore, M.H., Lammers, C.R., Reiss, A.L., Amaral, D.G., 2004. The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. *J. Neurosci.* 24, 6392–6401.
- Sheldon, A.L., Robinson, M.B., 2007. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem. Int.* 51, 333–355.
- Thomazi, A.P., Godinho, G.F., Rodrigues, J.M., Schwalm, F.D., Frizzo, M.E., Moriguchi, E., Souza, D.O., Wofchuk, S.T., 2004. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech. Ageing Dev.* 125, 475–481.
- Vargas, D.L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A.W., Pardo, C.A., 2005. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann. Neurol.* 57, 67–81.
- Wallace, G.L., Dankner, N., Kenworthy, L., Giedd, J.N., Martin, A., 2010. Age-related temporal and parietal cortical thinning in autism spectrum disorders. *Brain.* 133, 3745–3754.
- Wang, D.D., Bordey, A., 2008. The astrocyte odyssey. *Prog. Neurobiol.* 86, 342–367.
- Weissman, J.R., Kelley, R.I., Bauman, M.L., Cohen, B.H., Murray, K.F., Mitchell, R.L., Kern, R.L., Natowicz, M.R., 2008. Mitochondrial disease in autism spectrum disorder patients: a cohort analysis. *PLoS One* 3, e3815.
- Zou, J., Wang, Y.X., Dou, F.F., Lu, H.Z., Ma, Z.W., Lu, P.H., Xu, X.M., 2010. Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. *Neurochem. Int.* 56, 577–584.

Capítulo 2: Cerebellar astrocytic parameters in animal model of autism induced by valproic acid

Roberta Bristot Silvestrin^{1,2,3##}, Caroline Zanotto², Lucas Tortorelli², Núbia Broetto Cunha², Giovana Brolese², Cristiane Batassini², Márcio Dutra², Carlos-Alberto Gonçalves², Rudimar Riesgo^{1,3,4}, Carmem Gottfried^{1,2,3}.

Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil: ¹Research Group in Neuroglial Plasticity at the ²Department of Biochemistry, Institute of Health's Basic Science and ³Translational Research Group in Autism Spectrum Disorders (GETEA) at the ⁴Pediatric Neurology Center, Porto Alegre Clinical Hospital (HCPA).

***CORRESPONDENCE ADDRESS:**

Roberta Bristot Silvestrin

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo

90035 - 003 - Porto Alegre, RS - BRAZIL

Fax: +55 51 3308 5540 Phone: +55 51 3308 5565

E-mail: betasilvestrin@yahoo.com.br

Introduction

Autism Spectrum Disorders (ASD) consist of a heterogeneous group of illnesses diagnosed in the presence of impaired social interaction, communication deficits and repetitive/stereotyped behaviors in a wide range of severity (Levy, Mandell et al. 2009; Rutter 2011). This clinical context requires multiprofessional treatment approaches and hardly affects the life of those patients' families, thereby giving rise to significant economic and social impacts. According to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) the prevalence of autism – the term used in this text to refer to ASD - in the United States among children aged 8 years is 1 in 88 (MMWR 2012). The growing prevalence of autism in the last 2 decades has been associated to diagnosis improvement together with the exposure to environmental risk factors during pregnancy (Fombonne 2009; Duchan and Patel 2012). The challenge of autism lays on its unknown etiologic factor. Although several genetic variants are said to contribute to the triggering of autism (Abrahams and Geschwind 2008; Grigorenko 2009; Ameis and Szatmari 2012), epidemiological data show that environmental factors such as maternal exposure to infections, ethanol, thalidomide and valproic acid (VPA) increase the risk of autistic offspring (Arndt, Stodgell et al. 2005; Dufour-Rainfray, Vourc'h et al. 2011). In addition, despite the increase in research and publications in this area, a good clinical marker has not been determined yet and available treatment strategies target only associated features and not autism directly.

Albeit research in autism develops fast, some difficulties have not been overcome yet, including brain sample obtainment limited to postmortem studies

and data interpretation problems due to the associated comorbidities (Schmitz and Rezaie 2008).

Those are some reasons why animal models of autism are important to scientific community and to society. In this line, the animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid (VPA) has been used to increase the knowledge in this area (Schneider and Przewlocki 2005; Bambini-Junior, Rodrigues et al. 2011) .

Clinical and animal studies have shown that many encephalic structures are implicated in autism pathophysiology. Changes in neuronal parameters such as cell density, connectivity and neurotransmitter systems have been demonstrated in the cerebellum (Courchesne and Pierce 2005; Amaral, Schumann et al. 2008), hippocampus (Raymond, Bauman et al. 1996; Groen, Teluij et al. 2010), amygdala (Schumann and Amaral 2006), cingulate cortex (Simms, Kemper et al. 2009) and others.

Despite the requirement of adequate glial function for normal neuronal activity, few works have focused on glial cells. Postmortem studies from patients with autism have shown astroglial activation (Vargas, Nascimbene et al. 2005; Anderson, Hooker et al. 2008) demonstrated through increased glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression (Laurence and Fatemi 2005; Vargas, Nascimbene et al. 2005), alterations in aquaporins and connexins (Fatemi, Folsom et al. 2008) and mutant glial adhesion molecules (Lopez-Hernandez, Ridder et al. 2011).

The cerebellum has been one of the most studied targets in autism research and alterations in this structure are of high relevance to understand the autism neuropathology. Once cerebellar function is involved in relevant cognitive

pathways we investigated astrocytic alterations in VPA rats during early postnatal periods of development.

1. Material and methods

Subjects

Female Wistar rats were obtained from the local breeding colony (ICBS-Federal University of Rio Grande do Sul), with 12:12 light cycle (lights on at 7:00 and lights off at 19:00), controlled temperature ($22\pm 1^\circ\text{C}$), water and food *ad libitum*. They were handled in accordance to the governmental and Brazilian Experimental Biology Societies Federation guidelines. The estrous cycle was monitored and females were mated overnight. The first day of gestation was considered when spermatozoa were found in the vaginal smear. Valproic acid (Acros Organics, New Jersey, USA) was purchased as the sodium salt and dissolved in 0.9% saline for a concentration of 250 mg/mL. Females received a single intraperitoneal injection of valproic acid (600 mg/kg, 250 mg/mL diluted in NaCl 0.9%) in the 12.5th day of pregnancy and control females received physiological saline at the same time as previously described (Schneider and Przewlocki 2005; Bambini-Junior, Rodrigues et al. 2011). Females were housed individually and were allowed to raise their own litters. The offspring rats were housed separately by sex. Male pups from at least three different litters were killed by decapitation at postnatal day 4 (P4 group) or 15 (P15 group). The brains were removed and cerebellar samples were kept in -80°C until the assays were performed. Some animals were anaesthetized and transcardially perfused in order to perform immunofluorescence analysis as described ahead.

The number of animals used in each technique varied and is described in the following sections.

Glutamine synthetase activity

The enzymatic assay was performed as previously described (dos Santos, Nardin et al. 2006). Briefly, tissue homogenate (0.1 mL) from P4 (n=5 in both groups) and P15 (n=9 and n=7 for control and VPA groups, respectively) rats were added to 0.1 mL of the reaction mixture containing (in mM): 10 MgCl₂; 50 L-glutamate; 100 imidazole–HCl buffer (pH 7.4); 10 2-mercaptoethanol; 50 hydroxylamine–HCl; 10 ATP and incubated for 30 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 0.4 ml of a solution containing (in mM): 370 ferric chloride; 670 HCl; 200 trichloroacetic acid. After centrifugation, the supernatant's absorbance was measured at 530 nm and compared to the absorbance generated by standard quantities of γ -glutamylhydroxamate, treated with ferric chloride reagent.

Glutathione content

The GSH content was determined as described before (Browne and Armstrong 1998). Briefly, cerebellar samples obtained from P4 (n=6 and n=5 for control and VPA groups, respectively) and P15 (n=6 and n=10 for control and VPA groups, respectively) rats were homogenized in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) containing 5 mM EDTA and protein were precipitated with 1.7% meta-phosphoric acid. The supernatant was assayed with o-phthaldialdehyde (1 mg/mL of methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm, respectively. A calibration curve (0–500 μ M) was performed with standard GSH solution.

Protein determination

Protein content was determined as previously described (Lowry, Rosebrough et al. 1951), using bovine serum albumin as standard.

ELISA for GFAP and S100B

Cerebellar GFAP amounts were analyzed through ELISA which was carried out as previously described (Tramontina et al., 2007) by coating a microtiter plate with 100 μ L tissue homogenate samples which was incubated overnight at 4°C. Incubation with a rabbit polyclonal anti-GFAP for 2 hours was followed by 1 hour incubation with a peroxidase-conjugated secondary antibody at room temperature. The color reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm and the standard GFAP curve ranged from 0.1 to 10 ng/mL. The S100B concentration was determined in the incubation medium of slices at 1 h. The ELISA for S100B was carried out as described previously (Leite, Galland et al. 2008). Briefly, 50 μ L of sample plus 50 μ L of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B. Polyclonal anti-S100 was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. The color reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/mL.

GFAP and vimentin immunofluorescence

Rats were anesthetized (ketamine + xilazine mix) and transcardially perfused with 0.9%-NaCl solution followed by a 4%-paraformaldehyde solution before the removal of their brain. The brains were further post-fixed during 4 hours in a 4%-paraformaldehyde phosphate buffer saline (PBS) solution (pH 7.4) and were subsequently cryoprotected in 15% and 30%-sucrose PBS solutions until

they were completely submerged. After been freezed with cold isopentane, coronal slices (45 μm) were obtained using a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ cryostat (Leica Microsystems GmbH). Brain sections containing the cerebellar slices were arranged in microscopy slides which were washed six times with PBS at room temperature. Rabbit anti-GFAP (Dako, 1:3000) and goat anti-vimentin (Sigma, 1:2000) were diluted in a 2% bovine serum albumin 0,4% Triton X-100 PBS solution and incubated during 48h at 4°C . Secondary antibodies (AlexaFluor 488 anti-rabbit and 568 anti-goat, Molecular Probes, USA, 1:500) at room temperature for 60 min. Slides were then mounted with an antifading solution (Fluorsave, Calbiochem, USA) and coverslipped. Images were obtained in a confocal microscope and analyzed using the Image J software. The number of vimentin and GFAP immunoreactive astrocytes per field was counted in 5 sections/ rat (n=4 rats/group).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SE and were analyzed statistically by Student's *t* test and $P<0.05$ was considered as statistically significant. All analyses were carried out using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software.

2. Results

Glutamine synthetase activity

Figure 1 shows the activity of GS in P4 and P15 rats. In P4, GS activity did not differ between VPA and control groups (1.12 ± 0.16 and $1.54\pm 0.28\ \mu\text{mol/h/mg prot}$, respectively $P=0.41$). However, P15 VPA rats had a 24.6% decreased GS activity (1.93 ± 0.11) when compared to the control group (2.56 ± 0.23), $P=0.04$.

Glutathione content

As showed in Figure 2, no statistical significance was found in GSH activity (expressed as nmol/mg prot) between VPA and control groups, respectively, neither at P4 (4.87 ± 0.61 and 3.82 ± 0.42) nor at P15 (4.56 ± 0.79 and 2.94 ± 0.32).

GFAP and S100B amounts

The amount of cerebellar GFAP as shown in Figure 3 was expressed as ng/ μ g prot. A significant GFAP increase was observed in VPA group compared to the control at both P4 by 134% (from 2.11 ± 0.34 to 4.96 ± 0.71), $P=0.0069$ and P15 by 35% (from 53.15 ± 5.86 to 71.87 ± 4.46), $P=0.026$. No changes were observed in S100B levels (ng/ μ g prot) between control and VPA groups respectively at P4 (0.4 ± 0.09 and 0.30 ± 0.11) and at P15 (0.64 ± 0.02 and 0.64 ± 0.09) as demonstrated in Figure 4.

GFAP and vimentin immunofluorescence

Cerebellar sections from P4 and P15 animals were analyzed and the number of vimentin and GFAP immunoreactive astrocytes was counted. There was no difference in the number of vimentin immunoreactive astrocytes between VPA and control group neither at P4 (45.2 ± 11.8 versus 49.1 ± 9.6 astrocytes/field; $P=0.80$) nor at P15 (62.2 ± 24.9 versus 24 ± 13.4 astrocytes/field; $P=0.18$) (Figure 5A). While GFAP immunoreactive astrocytes counts were the same in VPA and control groups at P4 (16.2 ± 2.8 versus 29 ± 2.5 astrocytes/field; $P=0.09$), P15 VPA animals showed higher values when compared to control P15 ones (75.2 ± 22 versus 21.3 ± 8 astrocytes/field $P=0,002$) (Figure 5B).

DISCUSSION

The cerebellum, one of the most consistently altered brain regions in autism, establishes connections with cortical and subcortical structures been involved in

cognition, language, motor and emotional functions (Fatemi, Aldinger et al. 2012). This structure therefore deserves attention as cerebellar alterations contribute to many of the clinical features of autism.

Astrocytes display important roles in maintaining neuronal function (Wang and Bordey 2008; Nimmerjahn 2009), including the support for neuronal work and performance modulating firing rate, enzymatic activity and other (Araque, Carmignoto et al. 2001; Nimmerjahn 2009; Ortinski, Dong et al. 2010).

Therefore, the understanding of cerebellar alterations in the neuroglial system is of high priority in autism. Recently, glial cells have been gaining more attention in autism research influenced by the neuroimmunological hypothesis (Pardo, Vargas et al. 2005; Ashwood, Wills et al. 2006). Postmortem studies in brain from autistic patients demonstrated microglial and astrocytic activation, increased cytokines levels (Vargas, Nascimbene et al. 2005) and altered glial protein expression (Laurence and Fatemi 2005; Fatemi, Folsom et al. 2008). In the present work, using young male rats prenatally exposed to VPA, we demonstrated alterations in astrocytic parameters, including (a) GFAP and vimentin, two age-dependent cytoskeletal proteins; b) S100B, a calcium-binding protein expressed by astrocytes and c) GSH and GS, two proteins involved in astrocyte metabolism.

We have found higher cerebellar expression of GFAP in rats prenatally exposed to VPA, which is in agreement with the findings of increased GFAP expression in cerebellum from autistic patients (Laurence and Fatemi 2005). Our work therefore increases the construct validity of the VPA animal model of autism, which is a very important contribution to this field of research.

The astrocytic marker GFAP is a major component of the cytoskeleton protein. In the developing rat brain, however, vimentin is the main intermediate filament protein which will be later replaced by GFAP as development goes on (Gilyarov, Kprzhevskii et al. 2009). The switch between vimentin and GFAP occurs around the second postnatal week, which is the hallmark of glial maturation and this was the reason why we decided to analyze vimentin levels after we found increased GFAP expression in our samples. A first explanation to this finding could be that VPA structures were maturing in a different speed. In fact, we first expected to find a late vimentin replacement by GFAP since autism is a neurodevelopmental disorder, but this was not the case once we found higher GFAP values in VPA rats compared to control groups and it would therefore indicate the opposite case. Besides, the increased GFAP expression was not accompanied by a reduction in vimentin amounts in VPA group, which would be expected if prenatal VPA exposure triggered a faster astrocytic maturation. A second explanation would be that the cerebellum from prenatally VPA exposed rats is presenting a reactive gliosis scenario.

Immature and adult brain injuries as so as neurodegenerative diseases are often accompanied by a process known as reactive gliosis, which is characterized by morphological alterations in astrocytes and an increased expression of GFAP (Sofroniew and Vinters 2010). Although reactive gliosis occurs with any kind of insult to the CNS and is frequently taken as a negative event, its severity, developmental sequence and affected region vary depending on disease and type of lesion (Eng, Ghirnikar et al. 2000; Sofroniew and Vinters 2010).

We suggest our results show a mild to moderate reactive gliosis once we are working with young animals and that this may be the initial step of a severe gliosis in the future. This idea is reinforced by the fact that S100B, another astrocytic protein which has shown to be elevated in many clinical and experimental conditions of brain injury (Goncalves, Leite et al. 2008), was not altered in VPA animals.

At first glance, an increase in GFAP may seem not to have direct impact in brain function. However, other CNS pathologies that share symptoms with autism such as Alexander's Disease where there are feeding problems, macrocephaly, mental and physical retardation, seizures and death (Pekny and Pekna 2004), are characterized by increased GFAP amounts. Another example of the impact of increased GFAP expression may be seen in the neuronal abnormalities, characteristics of autism, that follow a neonatal Borna virus infection (Abdel-Rahman, Dechkovskaia et al. 2003). Besides, other experimental models on infections during pregnancy, mimicking one of the risk factors for autism, also trigger elevated GFAP levels in the offspring (Yu, Yuan et al. 2004; Hao, Hao et al. 2010).

What calls our attention is that when studying the hippocampus, striatum, prefrontal cortex (data not shown) and the cerebellum of VPA exposed rats, the latter structure was the only region presenting increased GFAP in P4 rats. This means that the cerebellum may be particularly vulnerable to autism neuropathology and this suggestion is supported by a *post mortem* study where cerebellar alterations were found to be the most prominent ones in the brain of autistic patients (Vargas, Nascimbene et al. 2005). Purkinje cells are known to be especially susceptible to injury once they are constantly stimulated and

present high metabolic demands. According to literature, this fact combined to their high calcium storage brings those cells into a risky context (Kern 2003), which can be an explanation to our findings.

Frequently, inflammatory backgrounds are paralleled by increased oxidative markers. This was not the case of GSH levels, which was found to be the same in control and VPA animals. However, we cannot take any conclusion about the oxidative status of the cerebellum using only GSH once we do not know how other oxidative markers are.

Interestingly, it has been shown that reactive gliosis inducts GS downregulation which, in turn, leads to a failure in the glutamate/glutamine cycle thereby impairing inhibitory transmission contributing for hyperexcitability (Ortinski, Dong et al. 2010). Based on this, the increased GFAP expression exhibited by P4 rats – which is maintained in P15 ones - may trigger the reduction in GS activity seen in 15 days old animals. Once VPA was shown to negatively alter GABAergic transmission in different brain structures (Dendrinou, Hemelt et al. 2011; Banerjee, Garcia-Oscos et al. 2012), this fact can be another way through which this drug impairs excitation/inhibition balance in the offspring.

Since P4 and P15 data represent the human prenatal period (Clancy, Darlington et al. 2001), our work demonstrates that the neuropathological alterations leading to autism may be present already in the fetus. And since the most part of autism research is made with children, adolescents and adults, our results start to fill this gap that exists concerning early autistic neuropathology. Our data show that the VPA exposed cerebellum presents a reactive astrogliosis scenario that seems to be one of the first changes in the autistic brain and that may have significant implications in autism physiopathology. Our

results also demonstrate age dependent variations, which is in accordance to clinical studies and reinforces the need for a better comprehension of glial cells development. Astrogliosis seems to be an initial step of autism neuropathology and may therefore be a new target to research and development of therapeutic or diagnostic strategies.

Figures

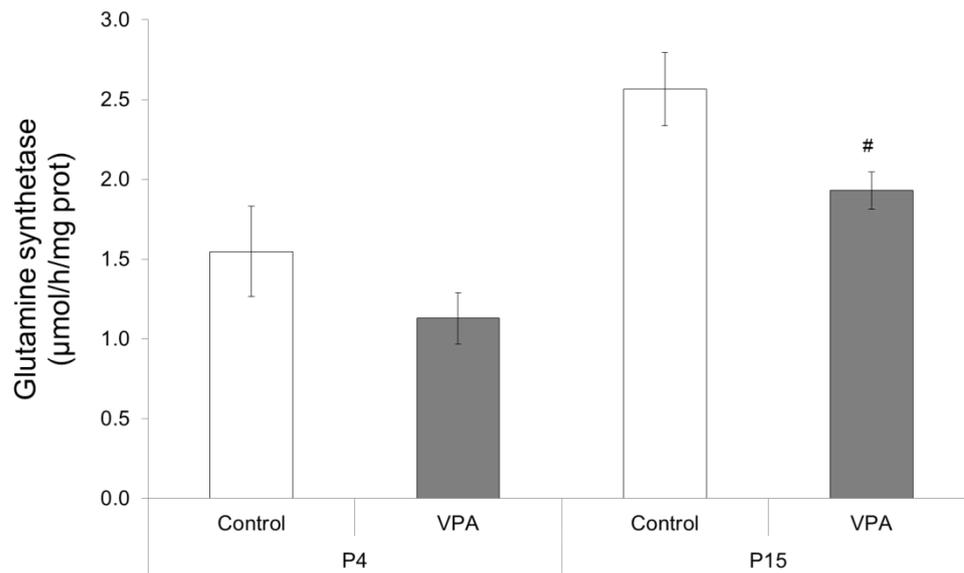


Figure 1. The effect of prenatal exposure to VPA on cerebellar GS activity.

Homogenized tissue samples were incubated as described in experimental procedure section. Each sample was measured in triplicate and data analysis was performed by Student's *t* test. Data represent the mean \pm SE values in P4 (n=5) and P15 (n=9 for control group and n=7 for VPA group) groups. Statistically significant difference from control values is indicated by [#] $P < 0.01$.

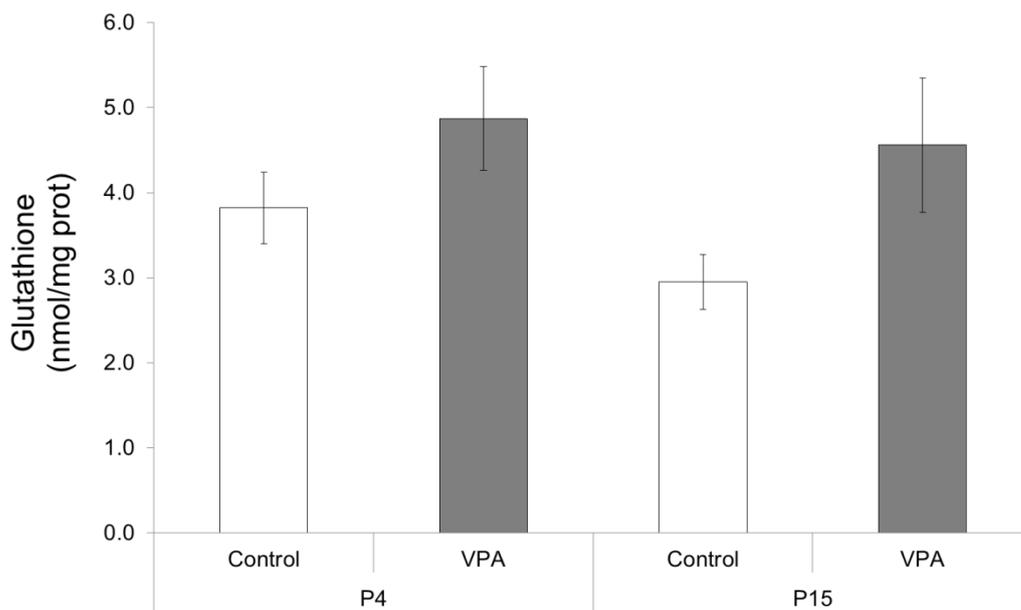


Figure 2. The effect of prenatal exposure to VPA on cerebellar GSH content.

Homogenized tissue samples were incubated as described in experimental procedure section. Each sample was measured in triplicate and data analysis was performed by Student's *t* test. Data represent the mean \pm SE values in P4 (n=6 for control group and n=5 for VPA group) and P15 (n=6 for control group and n=10 for VPA group) groups.

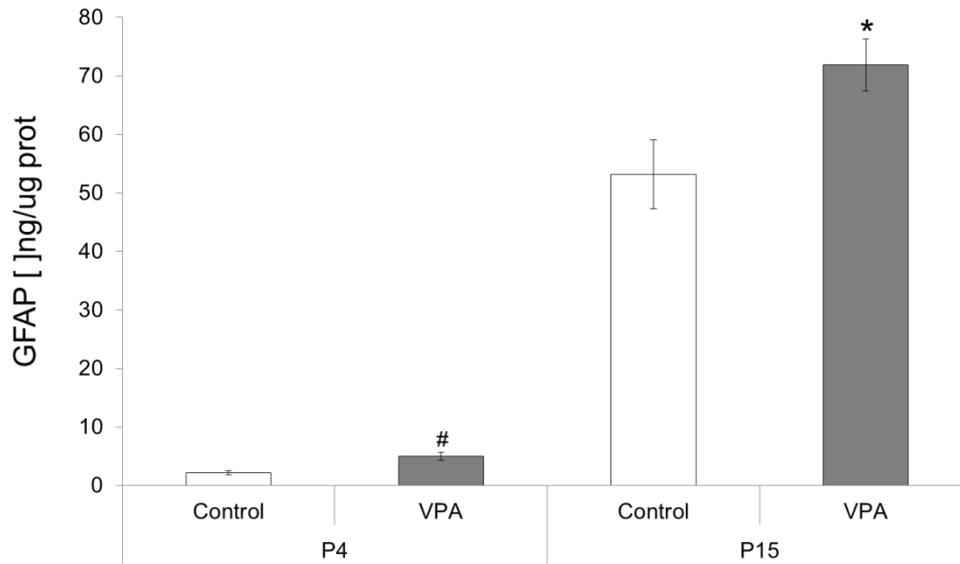


Figure 3. The effect of prenatal exposure to VPA on cerebellar GFAP content.

Homogenized tissue samples were incubated as described in experimental procedure section. Data analysis was performed by Student's *t* test. Data represent the mean \pm SE values in P4 (n=5) and P15 (n=5 for control group and n=7 for VPA group) groups. Statistically significant difference from control values is indicated by * $P < 0.05$ and # $P < 0.01$.

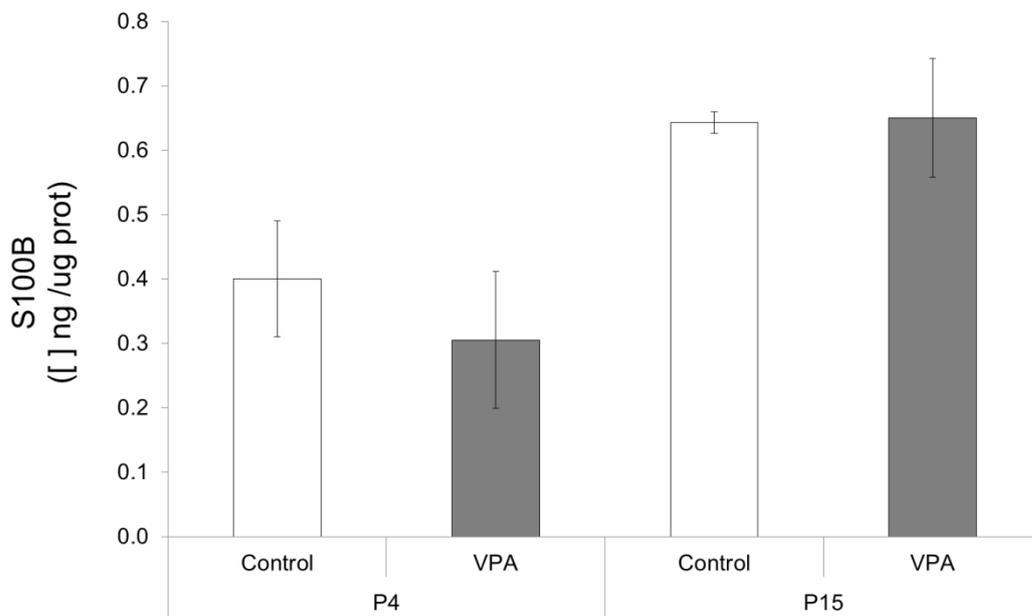


Figure 4. The effect of prenatal exposure to VPA on cerebellar S100B content.

Homogenized tissue samples were incubated as described in experimental procedure section. Each sample was measured in triplicate and data analysis was performed by Student's *t* test. Data represent the mean \pm SE values in P4 (n=5 for control group and n=3 for VPA group) and P15 (n=3 for control group and n=8 for VPA group) groups.

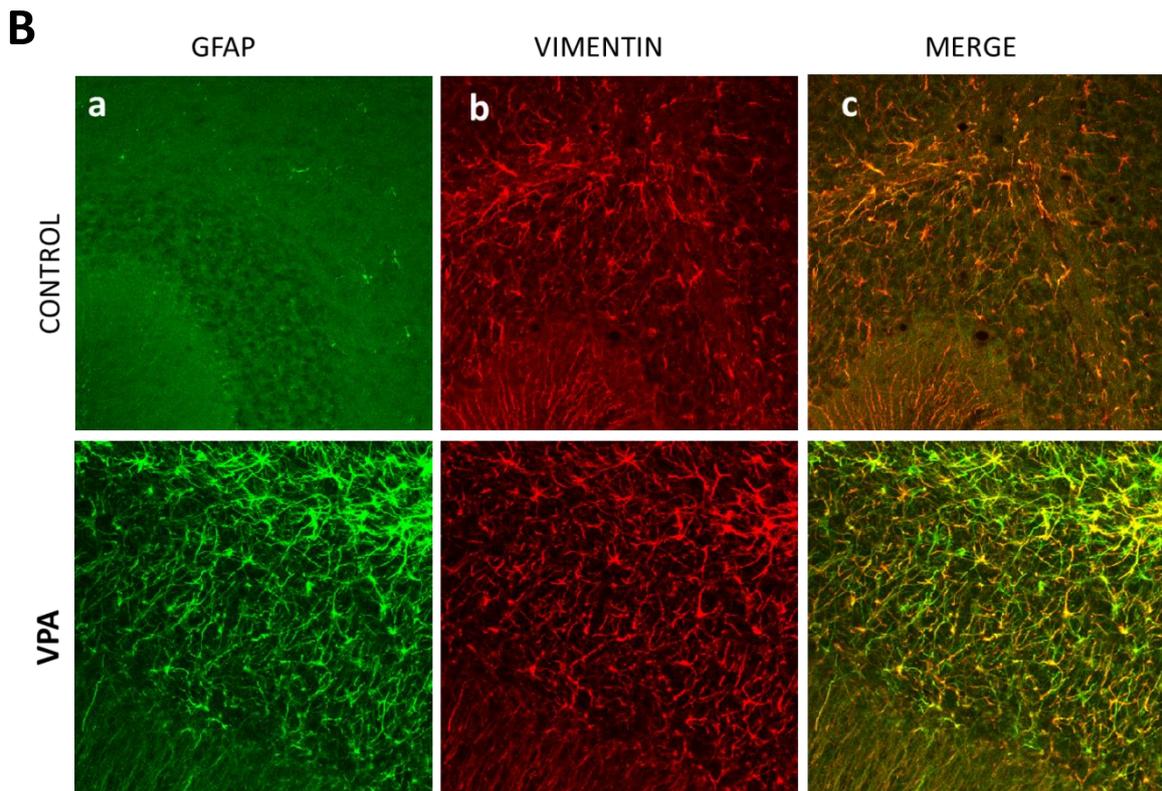
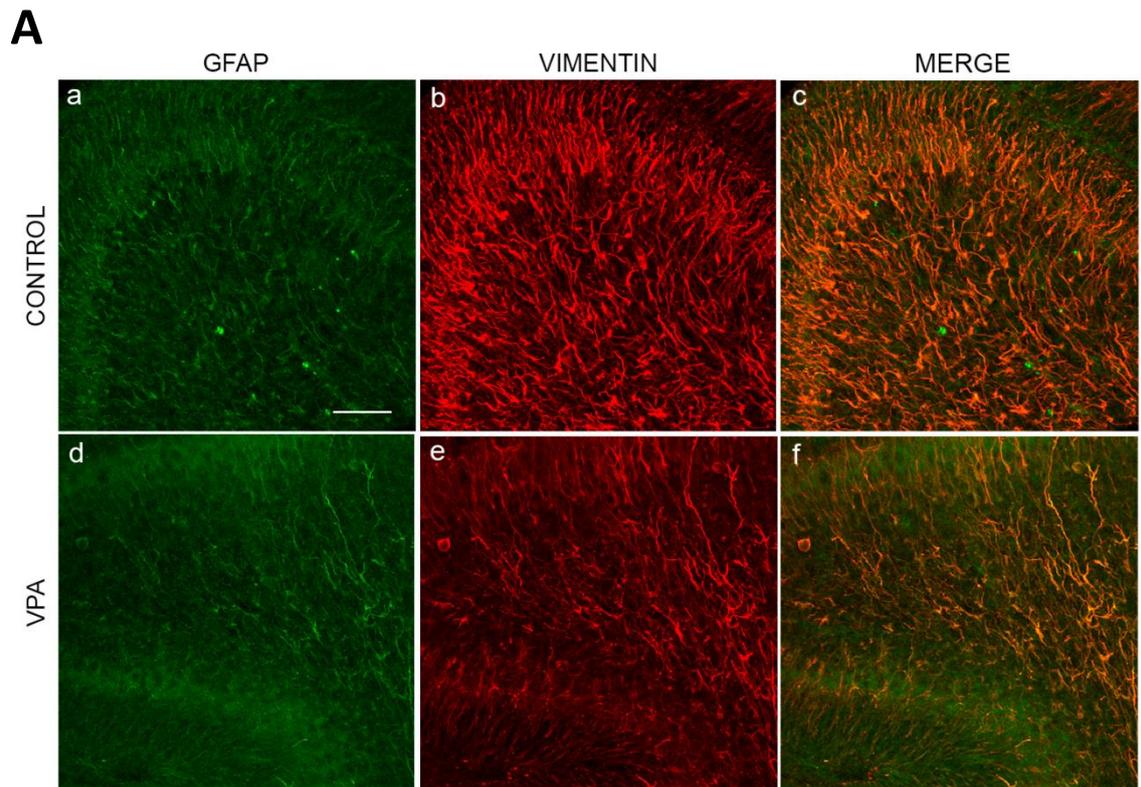


Figure 5. Representative photomicrography of astrocytes GFAP+ or vimentin+ in the cerebellum. A) Illustrative images from P4 groups. B) Illustrative images from P15 groups. Control (a, b, c) and VPA groups (d, e, f). Scale bar 50 μ m.

References

- Abdel-Rahman, A., A. Dechkovskaia, et al. (2003). "Increased expression of glial fibrillary acidic protein in cerebellum and hippocampus: differential effects on neonatal brain regional acetylcholinesterase following maternal exposure to combined chlorpyrifos and nicotine." J Toxicol Environ Health A 66(21): 2047-2066.
- Abrahams, B. S. and D. H. Geschwind (2008). "Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology." Nat Rev Genet 9(5): 341-355.
- Amaral, D. G., C. M. Schumann, et al. (2008). "Neuroanatomy of autism." Trends Neurosci 31(3): 137-145.
- Ameis, S. H. and P. Szatmari (2012). "Imaging-genetics in autism spectrum disorder: advances, translational impact, and future directions." Front Psychiatry 3: 46.
- Anderson, M. P., B. S. Hooker, et al. (2008). "Bridging from cells to cognition in autism pathophysiology: biological pathways to defective brain function and plasticity." American Journal of Biochemistry and Biotechnology 4(2): 10.
- Araque, A., G. Carmignoto, et al. (2001). "Dynamic signaling between astrocytes and neurons." Annu Rev Physiol 63: 795-813.
- Arndt, T. L., C. J. Stodgell, et al. (2005). "The teratology of autism." Int J Dev Neurosci 23(2-3): 189-199.
- Ashwood, P., S. Wills, et al. (2006). "The immune response in autism: a new frontier for autism research." J Leukoc Biol 80(1): 1-15.
- Bambini-Junior, V., L. Rodrigues, et al. (2011). "Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters." Brain Res 1408: 8-16.
- Banerjee, A., F. Garcia-Oscos, et al. (2012). "Impairment of cortical GABAergic synaptic transmission in an environmental rat model of autism." Int J Neuropsychopharmacol: 1-10.
- Browne, R. W. and D. Armstrong (1998). "Reduced glutathione and glutathione disulfide." Methods Mol Biol 108: 347-352.
- Clancy, B., R. B. Darlington, et al. (2001). "Translating developmental time across mammalian species." Neuroscience 105(1): 7-17.
- Courchesne, E. and K. Pierce (2005). "Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: local over-connectivity but long-distance disconnection." Curr Opin Neurobiol 15(2): 225-230.
- Dendrinis, G., M. Hemelt, et al. (2011). "Prenatal VPA Exposure and Changes in Sensory Processing by the Superior Colliculus." Front Integr Neurosci 5: 68.
- dos Santos, A. Q., P. Nardin, et al. (2006). "Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells." Arch Biochem Biophys 453(2): 161-167.
- Duchan, E. and D. R. Patel (2012). "Epidemiology of autism spectrum disorders." Pediatr Clin North Am 59(1): 27-43, ix-x.
- Dufour-Rainfray, D., P. Vourc'h, et al. (2011). "Fetal exposure to teratogens: evidence of genes involved in autism." Neurosci Biobehav Rev 35(5): 1254-1265.
- Eng, L. F., R. S. Ghirnikar, et al. (2000). "Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)." Neurochem Res 25(9-10): 1439-1451.
- Fatemi, S. H., K. A. Aldinger, et al. (2012). "Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism." Cerebellum 11(3): 777-807.
- Fatemi, S. H., T. D. Folsom, et al. (2008). "Expression of astrocytic markers aquaporin 4 and connexin 43 is altered in brains of subjects with autism." Synapse 62(7): 501-507.

- Fombonne, E. (2009). "Epidemiology of pervasive developmental disorders." Pediatr Res 65(6): 591-598.
- Gilyarov, A. V., D. E. Kprzhevskii, et al. (2009). "Change of Composition of Intermediate Filaments in Rat Telencephalon during Early Postnatal Period of Ontogenesis." Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 45(1): 147-155.
- Goncalves, C. A., M. C. Leite, et al. (2008). "Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury." Clin Biochem 41(10-11): 755-763.
- Grigorenko, E. L. (2009). "Pathogenesis of autism: a patchwork of genetic causes." Future Neurol 4(5): 591-599.
- Groen, W., M. Teluij, et al. (2010). "Amygdala and hippocampus enlargement during adolescence in autism." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 49(6): 552-560.
- Hao, L. Y., X. Q. Hao, et al. (2010). "Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in cognitive deficits in age-increasing offspring rats." Neuroscience 166(3): 763-770.
- Kern, J. K. (2003). "Purkinje cell vulnerability and autism: a possible etiological connection." Brain & Development 25: 377-382.
- Laurence, J. A. and S. H. Fatemi (2005). "Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects." Cerebellum 4(3): 206-210.
- Leite, M. C., F. Galland, et al. (2008). "A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein." J Neurosci Methods 169(1): 93-99.
- Levy, S. E., D. S. Mandell, et al. (2009). "Autism." Lancet 374(9701): 1627-1638.
- Lopez-Hernandez, T., M. C. Ridder, et al. (2011). "Mutant GlialCAM causes megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, benign familial macrocephaly, and macrocephaly with retardation and autism." Am J Hum Genet 88(4): 422-432.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem 193(1): 265-275.
- MMWR, S. S. (2012). Prevalence of autism spectrum disorders--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 sites, United States, 2008. MMWR Surveill Summ. 61: 1-19.
- Nimmerjahn, A. (2009). "Astrocytes going live: advances and challenges." J Physiol 587(Pt 8): 1639-1647.
- Ortinski, P. I., J. Dong, et al. (2010). "Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition." Nat Neurosci 13(5): 584-591.
- Pardo, C. A., D. L. Vargas, et al. (2005). "Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism." Int Rev Psychiatry 17(6): 485-495.
- Pekny, M. and M. Pekna (2004). "Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration." J Pathol 204(4): 428-437.
- Raymond, G. V., M. L. Bauman, et al. (1996). "Hippocampus in autism: a Golgi analysis." Acta Neuropathol 91(1): 117-119.
- Rutter, M. L. (2011). "Progress in understanding autism: 2007-2010." J Autism Dev Disord 41(4): 395-404.
- Schmitz, C. and P. Rezaie (2008). "The neuropathology of autism: where do we stand?" Neuropathol Appl Neurobiol 34(1): 4-11.
- Schneider, T. and R. Przewlocki (2005). "Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism." Neuropsychopharmacology 30(1): 80-89.
- Schumann, C. M. and D. G. Amaral (2006). "Stereological analysis of amygdala neuron number in autism." J Neurosci 26(29): 7674-7679.

- Simms, M. L., T. L. Kemper, et al. (2009). "The anterior cingulate cortex in autism: heterogeneity of qualitative and quantitative cytoarchitectonic features suggests possible subgroups." Acta Neuropathol 118(5): 673-684.
- Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters (2010). "Astrocytes: biology and pathology." Acta Neuropathol 119(1): 7-35.
- Vargas, D. L., C. Nascimbene, et al. (2005). "Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism." Ann Neurol 57(1): 67-81.
- Wang, D. D. and A. Bordey (2008). "The astrocyte odyssey." Prog Neurobiol 86(4): 342-367.
- Yu, H. M., T. M. Yuan, et al. (2004). "Expression of glial fibrillary acidic protein in developing rat brain after intrauterine infection." Neuropathology 24(2): 136-143.

Capítulo 3: Resultados adicionais

Este capítulo contém as análises realizadas com amostras de CPF e estriado de ratos P4 e P15 incluindo, portanto, resultados em português que serão destinados ao terceiro manuscrito. Além disso, são apresentados os resultados adicionais obtidos com amostras de hipocampo P4 e P15. A fim de possibilitar uma melhor compreensão dos dados e facilitar a leitura, os resultados de cada técnica são apresentados separadamente para cada estrutura analisada.

Material e métodos

Animais

Foram utilizadas ratas Wistar obtidas do biotério local mantidas em temperatura controlada ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), ciclo luminoso 12:12 (luzes ligadas às 7h e desligadas às 19h) e com livre acesso à água e ração. Os animais foram tratados de acordo com as diretrizes da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FesBE). O ciclo estral foi acompanhado e as fêmeas, quando em proestro, foram colocadas com um macho no período da noite. O dia em que a análise microscópica do esfregaço vaginal evidenciava presença de espermatozoides foi considerado como primeiro dia da gestação. O VPA (Acros Organics, New Jersey, USA) foi obtido como sal sódico e dissolvido em solução de NaCl 0,9% em uma concentração de 250 mg/mL. As fêmeas prenhes receberam uma única administração intraperitoneal de VPA (600 mg/kg, 250 mg/mL dissolvido em NaCl 0,9%) no 12,5^o dia da gestação e as fêmeas controle receberam uma injeção de solução de NaCl 0,9% no mesmo dia conforme descrito na literatura [48, 84]. As fêmeas foram acomodadas individualmente. As ninhadas foram separadas de acordo com o sexo e os filhotes machos foram submetidos à eutanásia no dia pós natal 4 (grupo P4) ou 15 (grupo P15).

Atividade da glutamina sintetase (GS)

O ensaio enzimático foi realizado conforme descrito anteriormente [184]. Brevemente, 100µl de homogenato tecidual de animais P4 e P15 foram adicionados à mistura de reação contendo (em mM): 10 de MgCl₂; 50 de L-glutamato; 100 de tampão imidazol-HCl (pH 7,4); 10 de 2-mercaptoetanol; 50 de hidroxilamina-HCl; 10 de ATP e incubados por 30 minutos a 37°C. A reação foi parada adicionando-se 0,4 mL de uma solução contendo (em mM): 370 de cloreto férrico; 670 de HCl; 200 de ácido tricloroacético. Após centrifugação, a absorvância do sobrenadante foi medida em 530 nm e comparada à absorvância gerada pela curva padrão de γ -glutamil-hidroxamato, tratada com reagente cloreto férrico.

Conteúdo de GSH

O conteúdo de GSH foi determinado conforme descrito na literatura [185]. Resumidamente, as amostras obtidas dos animais P4 e P15 foram homogeneizadas em tampão fosfato sódico (0,1 M, pH 8,0) contendo 5mM de EDTA e as proteínas foram precipitadas com ácido metafosfórico 1,7%. O sobrenadante recebeu o-ftaldialdeído (1mg/mL de metanol) em temperatura ambiente por 15 min e a fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 420 nm, respectivamente. Uma curva padrão foi feita com solução padrão de GSH (0-500µM).

Imunoquantificação de GFAP e S100B por ELISA

No dia 4 ou 15 pós natal, alguns animais foram decapitados e tiveram seus encéfalos removidos. As amostras de hipocampo, estriado e CPF foram armazenadas a -80°C até que os testes fossem realizados. O conteúdo de S100B foi analisado conforme descrito na literatura (Leite et al, 2008). Brevemente, 50 uL de amostra

homogeneizada foram incubados com 50 uL of tampão Tris durante 2 horas em microplaca de 96 poços previamente coberta com anticorpo monoclonal anti-S100B. O anticorpo anti-S100B polyclonal foi incubado por 30 minutos e então adicionou-se um anti IgG conjugado com peroxidase por mais 30 minutos. A reação colorimétrica com o o-phenylenediamina (OPD) foi medida a 492 nm e a curva padrão de S100B variou de 0,019 a 10 ng/mL. O ELISA para GFAP foi realizado conforme descrito anteriormente (Tramontina et al., 2007). Os poços da microplaca foram preenchidos com 100 µl de amostra incubados *overnight* a 4°C. A incubação com o anticorpo anti-GFAP policlonal durante 2 horas foi seguida de incubação com anti IgG conjugado com peroxidase por 1 hora em temperatura ambiente. A reação com OPD foi medida a 492 nm e a curva padrão para GFAP variou de 0,1 a 10 ng/mL.

Imunofluorescência

Quatro animais de cada grupo (VPA e controle) com 4 e 15 dias foram anestesiados (cetamina e xilasina) e perfundidos transcardialmente com solução 150 mL de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% e 150 mL de solução de paraformaldeído 4% [em salina tamponada com fosfato (PBS) com pH 7,4]. Os encéfalos foram removidos e pós-fixados em solução de paraformaldeído 4% (em PBS com pH 7,4) por 4 horas. Após, foram submergidos em solução de sacarose 15% e 30% para crioproteção até que afundassem totalmente. Depois disso, os encéfalos foram congelados em isopentano e fatiados em criostato (-20°C) a 45µm. As fatias contendo hipocampo dorsal foram colocadas em lâminas de microscopia previamente gelatinizadas e foram lavadas seis vezes com tampão PBS a temperatura ambiente. Os anticorpo anti-GFAP (Dako, 1:3000) e vimentina (Sigma, 1:2000) foram diluídos em solução de albumina bovina sérica 2% e Triton X-100 e incubados por 48h em câmara fria (4°C). Os anticorpos secundários (AlexaFluor 488 e 568, Molecular Probes, USA, 1:500) foram

incubados em temperatura ambiente por 1 hora. As lâminas receberam meio de montagem (Fluorsave, Calbiochem, USA) e foram cobertas com lamínulas. As imagens foram obtidas em microscópio confocal e analisadas utilizando o software Image J. O número de astrócitos positivos para GFAP e vimentina por campo foi analisado em 5 fatias por animal (n=4 animais por grupo).

Análise estatística

Os dados são apresentados como média±EP e foram analisados estatisticamente através do Teste *t* de Student. $P<0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software Statistical Package for Social Sciences (SPSS).

Resultados

Hipocampo

Atividade da Glutamina Sintetase. A Figura 1A mostra a atividade da GS em amostras de Hc obtidas de animais P4. Não houve diferença entre os grupos VPA ($1,12\pm 0,25$ $\mu\text{mol/h/mg prot}$) e controle ($1,33\pm 0,12$ $\mu\text{mol/h/mg prot}$), $P=0,74$.

Quantidade de glutathiona. Não houve diferença na quantidade de GSH entre os grupos VPA ($6,4\pm 2,73$ nmol/mg prot) e controle ($3,6\pm 0,69$ nmol/mg prot) em P4, $P=0,30$ (Figura 1.B).

Conteúdo de GFAP por ELISA. Em relação aos animais P4, não houve diferença no conteúdo de GFAP entre os grupos VPA ($2,14\pm 0,36$ ng/ $\mu\text{g prot}$) e controle ($3,09\pm 0,91$ ng/ $\mu\text{g prot}$), $P=0,35$. Quando analisadas as amostras de animais P15, o grupo VPA apresentou aumento de 37% ($31,22\pm 0,58$ ng/ $\mu\text{g prot}$) em relação ao grupo controle ($22,73\pm 3,64$ ng/ $\mu\text{g prot}$) $P=0,03$ (Figura 2.A).

Conteúdo de S100B por ELISA. Não houve diferença no conteúdo de S100B entre os grupos P4 VPA ($0,10 \pm 0,01$ ng/ μ g prot) e controle ($0,12 \pm 0,01$ ng/ μ g prot), $P=0,26$. O mesmo padrão foi encontrado nos animais P15, onde grupo VPA ($0,30 \pm 0,02$ ng/ μ g prot) e controle ($0,28 \pm 0,02$ ng/ μ g prot) apresentaram a mesma quantidade de S100B, $P=0,60$ (Figura 2.B).

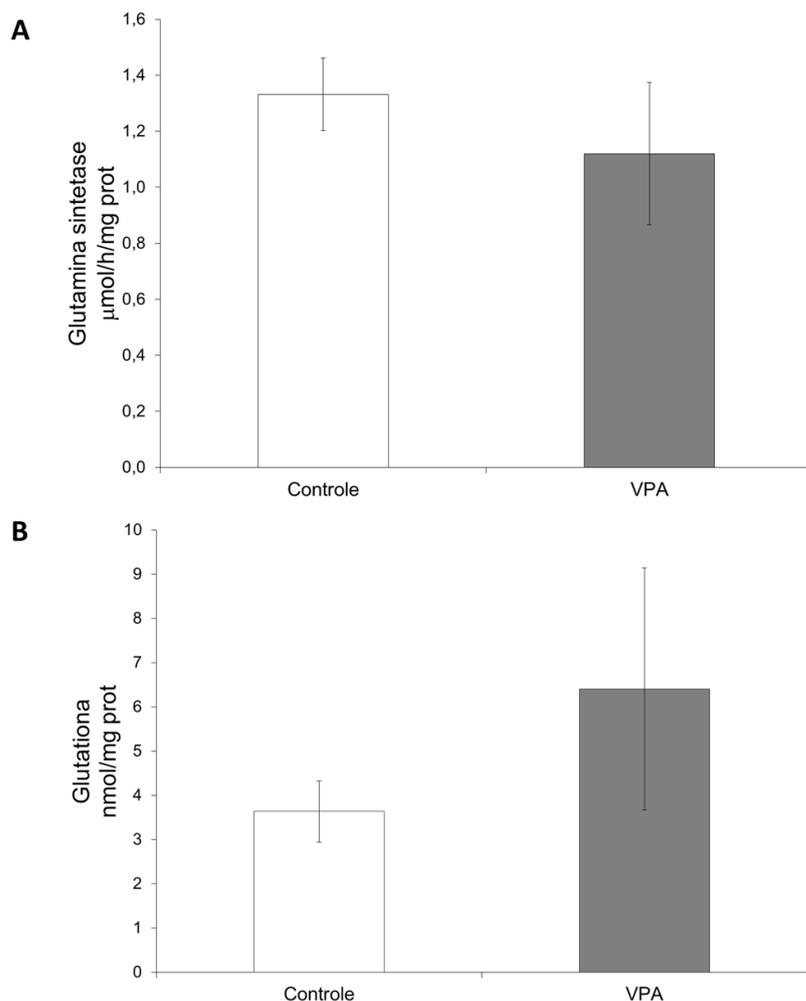


Figura 1. Efeito da exposição pré-natal ao VPA sobre a atividade da glutamina sintetase e conteúdo de GSH no hipocampo de ratos P4

As barras representam a média \pm EP. A) N=4 para grupo controle e n=3 para grupo VPA. B) N=3 para grupo controle e grupo VPA. As análises foram realizadas através do teste *t* de Student.

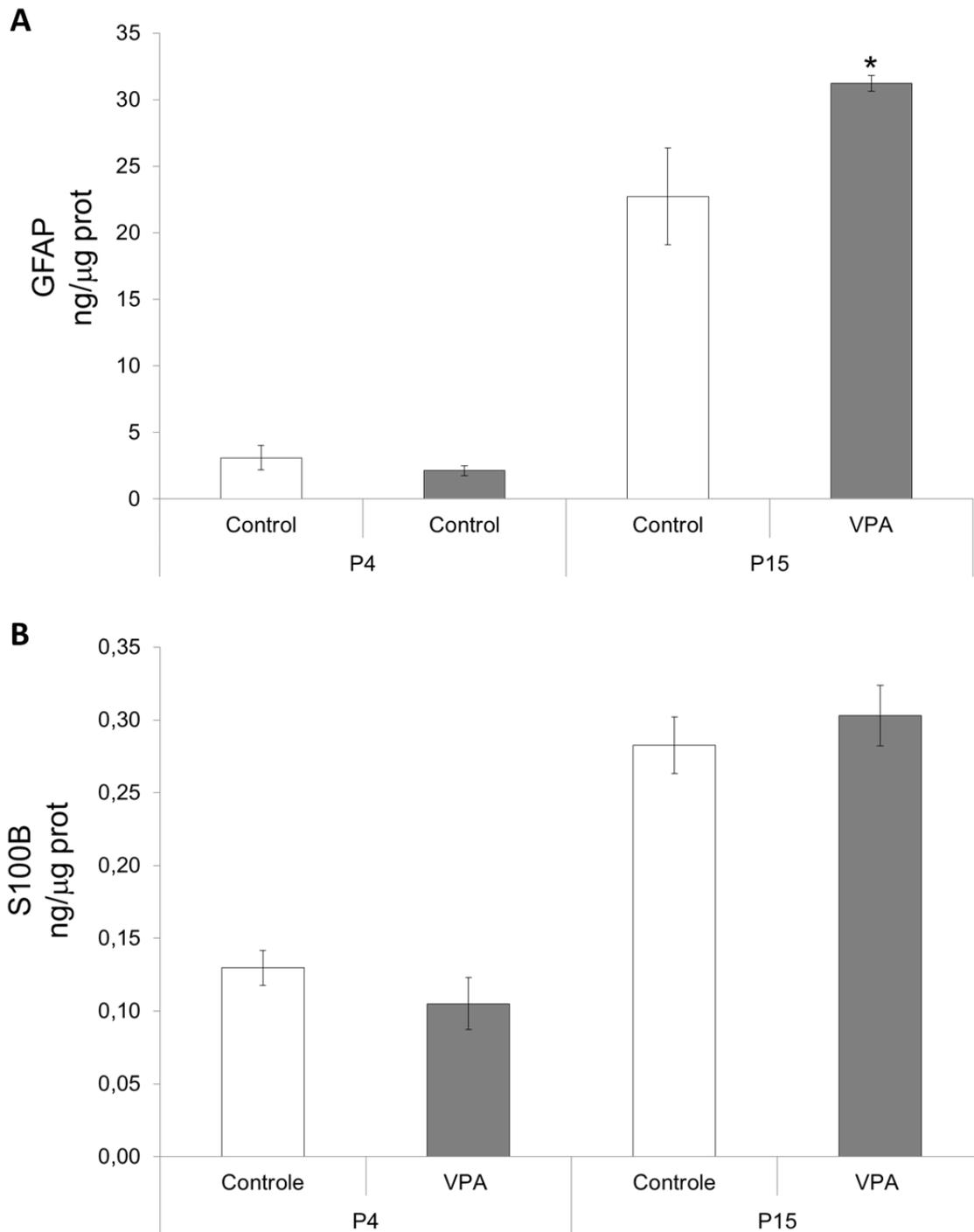


Figura 2. Efeito da exposição pré-natal ao VPA sobre o conteúdo de GFAP e S100B no hipocampo de ratos com 4 e 15 dias de idade.

As barras representam a média \pm EP. A) Grupos P4/Controle e VPA: n=5; P15/Controle: n=4; P15/VPA: n=6. B) Grupos P4/Controle: n=6; P4/VPA: n=5; P15/Controle: n=4; P15/VPA: n=6. As análises foram realizadas através do teste *t* de Student e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * $P=0,03$.

Quantificação de astrócitos imunoreativos para vimentina e GFAP. Foram analisadas fatias de Hc obtidas de animais P4 e P15. Não houve diferença tanto no número de astrócitos positivos para GFAP ($12 \pm 4,6$ versus $18 \pm 1,5$ astrócitos/campo nos grupos VPA e controle, respectivamente. $P=0,25$) quanto para vimentina ($26,5 \pm 7,9$ versus $25,6 \pm 0,5$ astrócitos/campo nos grupos VPA e controle, respectivamente. $P=0,91$) quando comparados os grupos P4 VPA e controle (Figura 3). No entanto, o quadro muda quando analisamos os animais P15 onde a exposição pré-natal ao VPA causou aumento no número de astrócitos positivos para GFAP ($59,5 \pm 10,2$ versus $23,5 \pm 8,1$ astrócitos/campo nos grupos VPA e controle, respectivamente. $P=0,03$) e também para vimentina ($56 \pm 7,9$ versus $11,5 \pm 4,2$ astrócitos/campo nos grupos VPA e controle, respectivamente. $P=0,002$) (Figura 4)

Estriado

Atividade da Glutamina Sintetase. A Figura 5.A mostra a atividade da GS em amostras de Es obtidas de animais P15. O grupo VPA apresentou menor atividade da GS ($1,80 \pm 0,13$ $\mu\text{mol/h/mg prot}$) quando comparado ao grupo controle ($2,22 \pm 0,10$ $\mu\text{mol/h/mg prot}$), $P=0,02$.

Quantidade de glutatona. Não houve diferenças no conteúdo de GSH entre os grupos VPA ($1,28 \pm 0,37$ nmol/mg prot) e controle ($1,22 \pm 0,55$ nmol/mg prot) nos animais P15, $P=0,96$ (Figura 5.B).

Conteúdo de GFAP por ELISA. Não foi encontrada diferença no conteúdo de GFAP no Es de animais P4 VPA ($0,31 \pm 0,04$ $\text{ng}/\mu\text{g prot}$) e controle ($0,42 \pm 0,11$ $\text{ng}/\mu\text{g prot}$), $P=0,34$. As análises de amostras de ratos P15 mostraram que o grupo VPA apresentou conteúdo de GFAP 2x maior ($13,32 \pm 0,86$ $\text{ng}/\mu\text{g prot}$) quando comparado ao grupo controle ($6,59 \pm 0,81$ $\text{ng}/\mu\text{g prot}$) $P=0,00009$ (Figura 6).

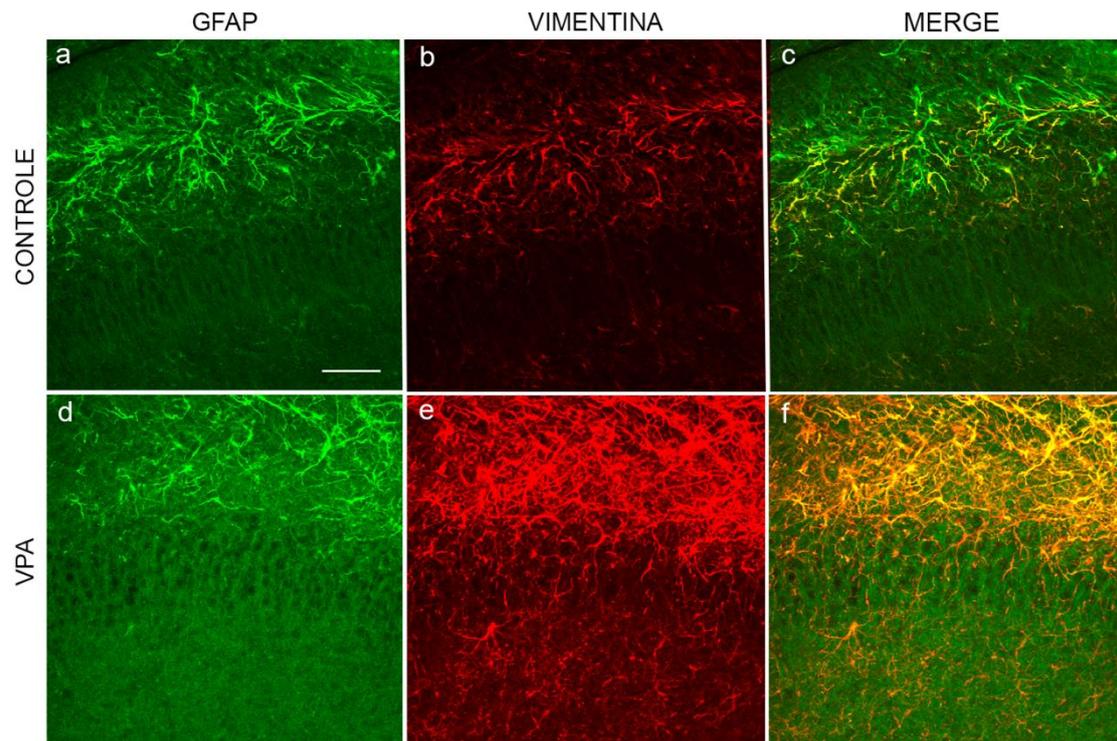


Figura 3. Fotomicrografia representativa de astrócitos GFAP+ e vimentina+ na região CA1 de ratos de 4 dias nos grupos controle e VPA.

Imagens representativas dos grupo controle (A B, C) e VPA (D, E, F)

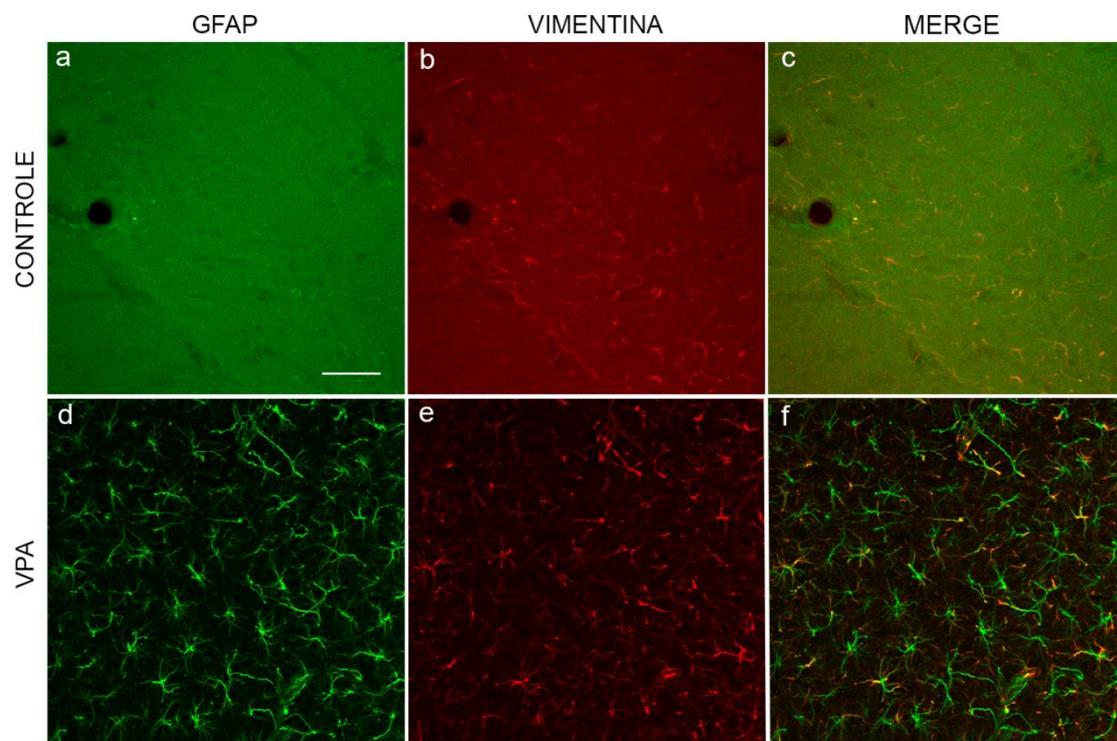


Figura 4. Fotomicrografia representativa de astrócitos GFAP+ e vimentina+ na região CA1 de ratos de 15 dias nos grupos controle e VPA.

Imagens representativas dos grupo controle (A B, C) e VPA (D, E, F).

Conteúdo de S100B por ELISA. As análises de amostras de Es obtidas de ratos P15 mostraram que o grupo VPA apresentou aumento de aproximadamente 3x no conteúdo de S100B ($0,45 \pm 0,09$ ng/ μ g prot) em relação ao grupo controle ($0,17 \pm 0,07$ ng/ μ g prot) $P=0,014$ (Figura 7).

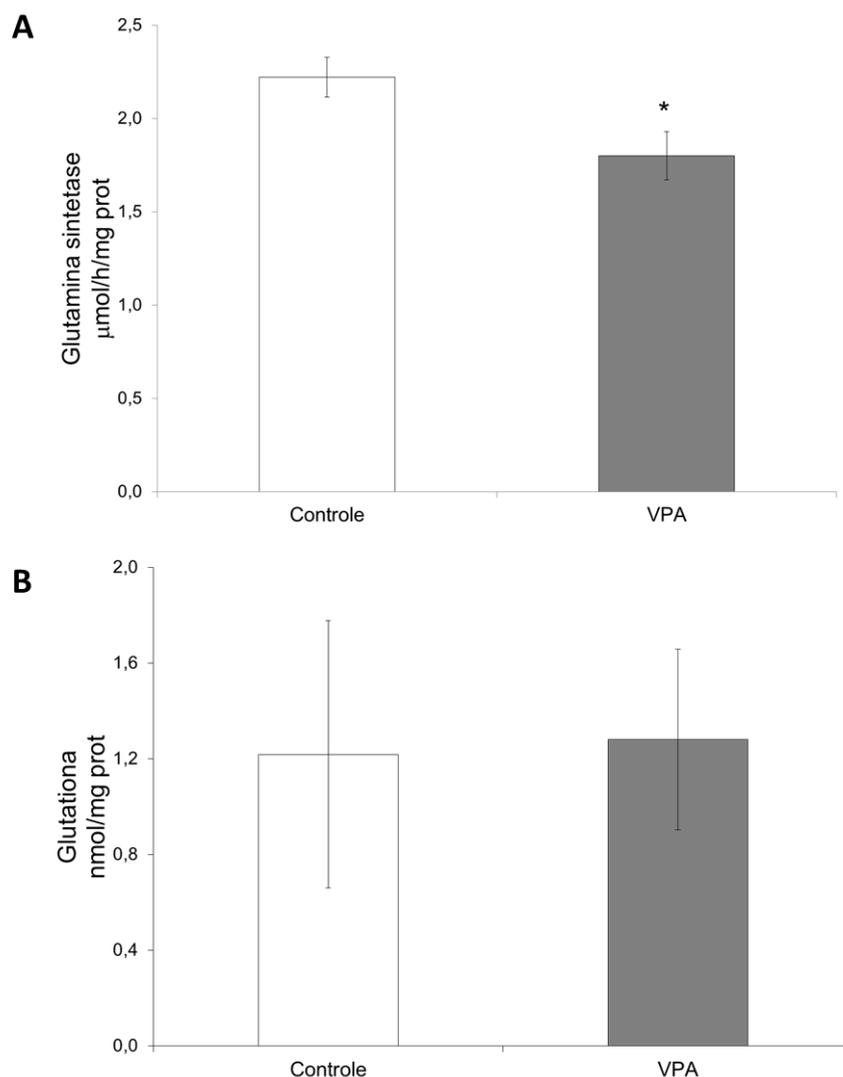


Figura 5. Efeito da exposição pré-natal ao VPA sobre a atividade da glutamina sintetase e conteúdo de GSH no estriado de ratos com 15 dias de idade.

As barras representam a média \pm EP. A) N=8 para grupo controle n=9 para grupo VPA. B) N=4 para grupo controle n=7 para grupo VPA. As análises foram realizadas através do teste *t* de Student e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * $P=0,02$.

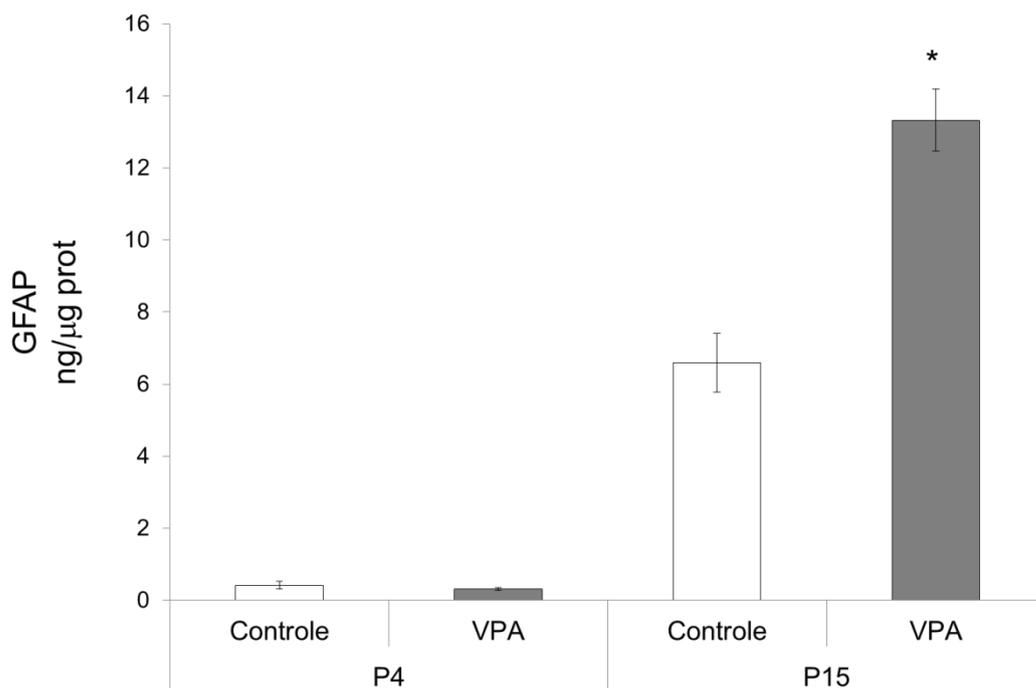


Figura 6. Efeito da exposição pré-natal ao VPA sobre o conteúdo de GFAP no estriado de ratos com 4 e 15 dias de idade.

As barras representam a média \pm EP. Em P4, n=4 para grupo controle n=5 para grupo VPA. Em P15, n=7 para grupo controle n=6 para grupo VPA. As análises foram realizadas através do teste *t* de Student e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * $P=0,00009$

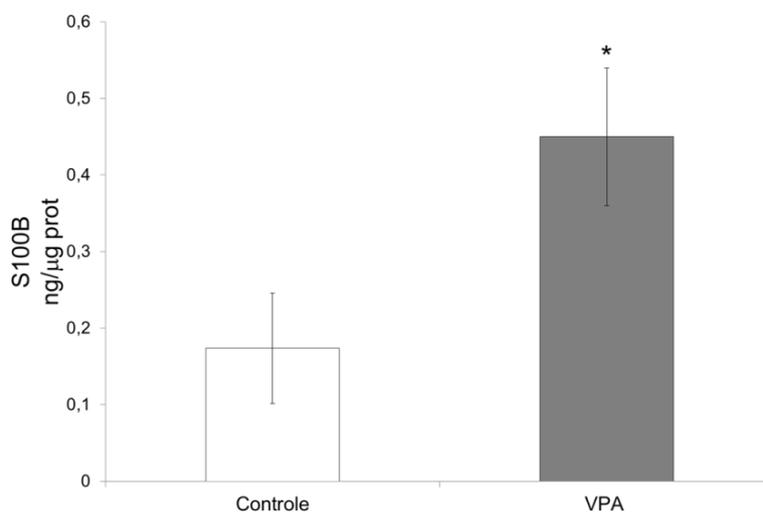


Figura 7. Efeito da exposição pré-natal ao VPA sobre o conteúdo de S100B no estriado de ratos com 15 dias de idade.

As barras representam a média \pm EP. N=3 para grupo controle n=6 para grupo VPA. As análises foram realizadas através do teste *t* de Student e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * $P=0,014$.

Córtex pré-frontal

Atividade da Glutamina Sintetase. Quando analisadas as amostras obtidas de animais de 4 dias de idade, não houve diferença entre os grupos VPA ($1,57 \pm 0,30 \mu\text{mol/h/mg prot}$) e controle ($1,14 \pm 0,08 \mu\text{mol/h/mg prot}$), $P=0,22$. O mesmo cenário foi encontrado em animais P15, onde o grupo VPA ($2,51 \pm 0,09 \mu\text{mol/h/mg prot}$) e o grupo controle ($2,27 \pm 0,17 \mu\text{mol/h/mg prot}$) não diferiram quanto à atividade da GS, $P=0,25$ (Figura 8.A).

Quantidade de glutathione. A Figura 8.B mostra o conteúdo de GSH em amostras de CPF. Quando analisadas as amostras obtidas de animais de 4 dias de idade, não houve diferença entre os grupos VPA ($4,47 \pm 0,46 \text{ nmol/mg prot}$) e controle ($4,0 \pm 0,27 \text{ nmol/mg prot}$), $P=0,37$. O mesmo padrão foi observado nos animais de 15 dias de idade, onde os grupos VPA ($2,56 \pm 0,52 \text{ nmol/mg prot}$) e controle ($2,23 \pm 0,37 \text{ nmol/mg prot}$) não apresentaram diferença significativa, $P=0,67$.

Conteúdo de GFAP por ELISA. Não houve diferença no conteúdo de GFAP entre os grupos VPA ($0,45 \pm 0,09 \text{ ng}/\mu\text{g prot}$) e controle ($0,25 \pm 0,12 \text{ ng}/\mu\text{g prot}$) quando analisadas as amostras de animais P4, $P=0,23$. No entanto, as análises das amostras de animais P15 mostraram que o grupo VPA apresentou aumento de 58% ($15,48 \pm 0,6 \text{ ng}/\mu\text{g prot}$) em relação ao grupo controle ($9,77 \pm 1,13 \text{ ng}/\mu\text{g prot}$) $P=0,002$ (Figura 9.A).

Conteúdo de S100B por ELISA. A Figura 9.B mostra que os grupos VPA ($0,05 \pm 0,009 \text{ ng}/\mu\text{g prot}$) e controle ($0,06 \pm 0,005 \text{ ng}/\mu\text{g prot}$) com 4 dias de idade não diferiram quanto ao conteúdo de S100B, $P=0,24$. Entretanto, quando analisadas as amostras dos animais P15, observou-se que o grupo VPA apresentou aumento de 88% ($0,47 \pm 0,02 \text{ ng}/\mu\text{g prot}$) em relação ao grupo controle ($0,25 \pm 0,03 \text{ ng}/\mu\text{g prot}$) $P=0,0004$ (Figura 9.B).

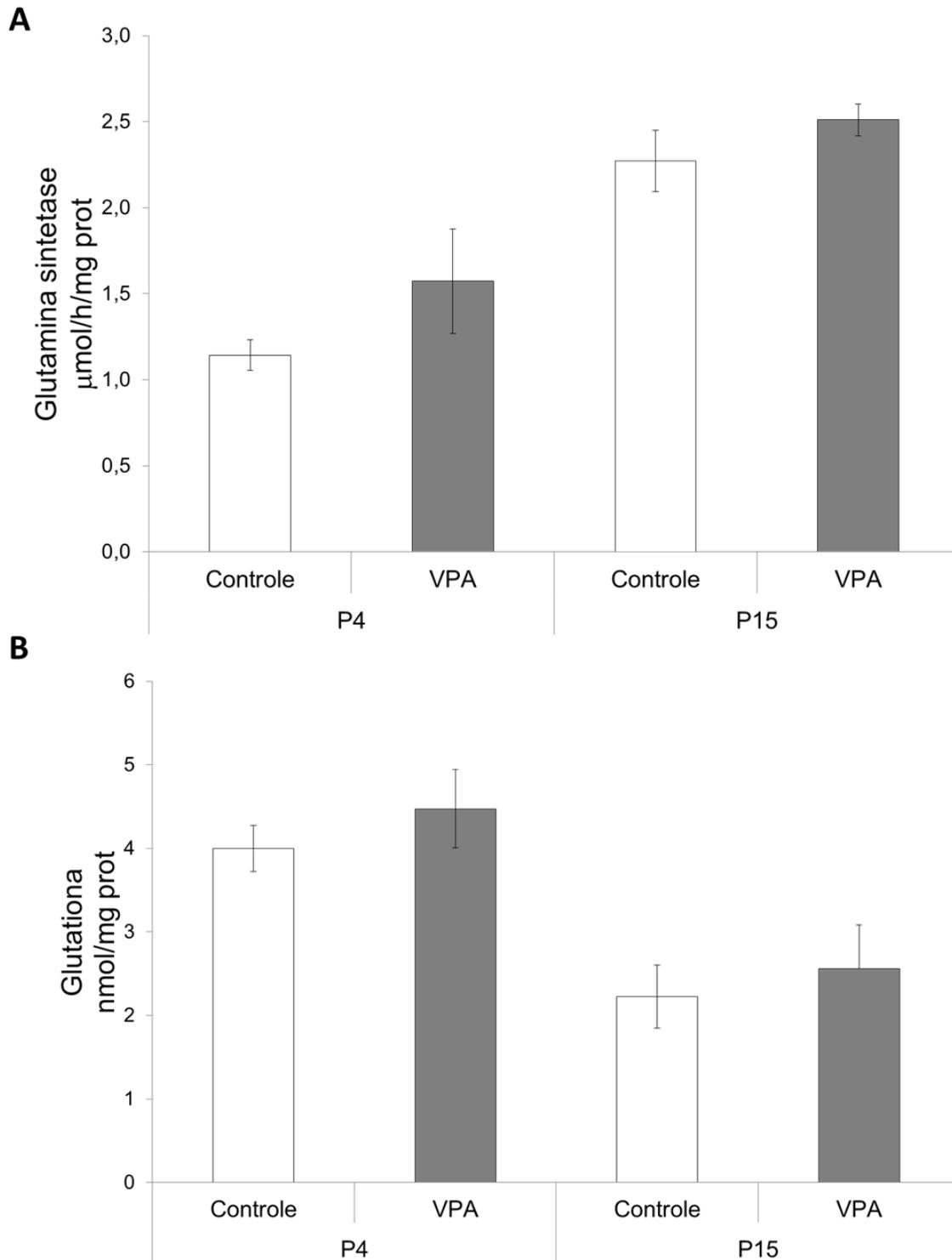


Figura 8. Efeito da exposição pré-natal ao VPA sobre a atividade da glutamina sintetase e conteúdo de GSH no córtex pré-frontal de ratos com 15 dias de idade.

As barras representam a média \pm EP. A) Grupos P4/Controle e VPA: n=4; P15/Controle: n=9; P15/VPA: n=8. B) Grupos P4/Controle: n=4; P4/ VPA: n=6; P15/Controle: n=6; P15/VPA: n=11.

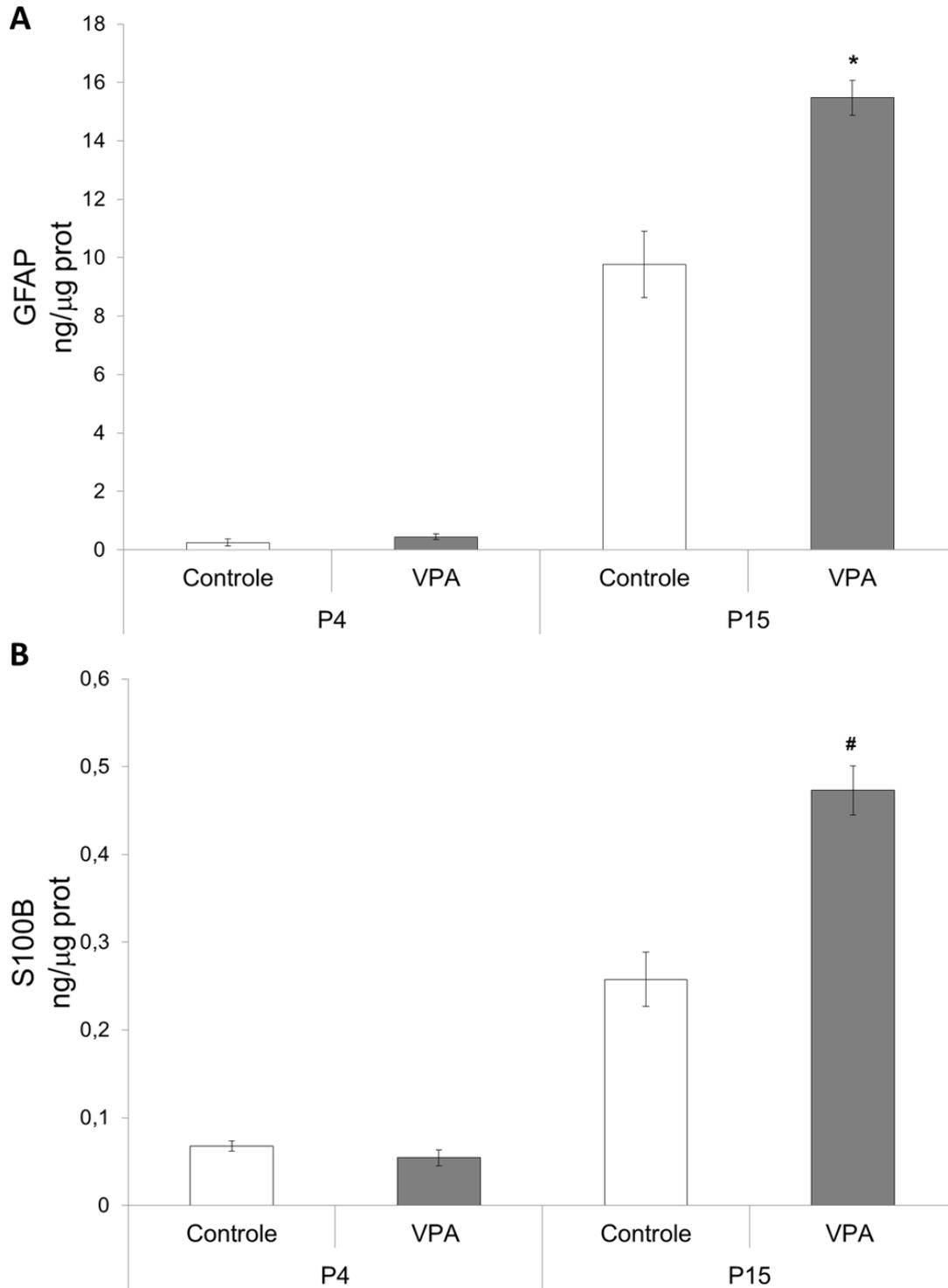


Figura 9. Efeito da exposição pré-natal ao VPA sobre o conteúdo de GFAP e S100B no córtex pré-frontal de ratos com 4 e 15 dias de idade.

As barras representam a média \pm EP. A) Grupos P4/Controle: n=3, P4/VPA: n=6; P15/Controle: n=6; P15/VPA: n=5. B) Grupos P4/Controle: n=6; P4/VPA: n=5; P15/Controle: n=5; P15/VPA: n=7. As análises foram realizadas através do teste *t* de Student e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * $P=0,002$ e # $P=0,0004$.

Discussão

Para a realização do presente trabalho, foram avaliadas três estruturas encefálicas-chave para o estudo do autismo: CPF, estriado e hipocampo. Não foram encontradas alterações nas amostras obtidas dos animais P4. No entanto, os ratos de 15 dias de idade que receberam VPA *in utero* apresentaram aumento da expressão de GFAP em todas as três estruturas (Figura 10). A GFAP é a principal proteína do citoesqueleto de astrócitos maduros e o aumento na sua expressão é característico de um processo chamado astrogliose reativa. A astrogliose reativa é uma resposta astrocitária a todo tipo de dano ao sistema nervoso e é marcada pela hipertrofia dos processos celulares que se dá pelo aumento na síntese de proteínas de filamentos intermediários, principalmente vimentina e GFAP [186]. Sugerimos, portanto, que o encéfalo dos animais P15 que receberam VPA *in utero* apresenta um quadro de astrogliose inicial cujo impacto no autismo será discutido mais detalhadamente na discussão geral desta tese.

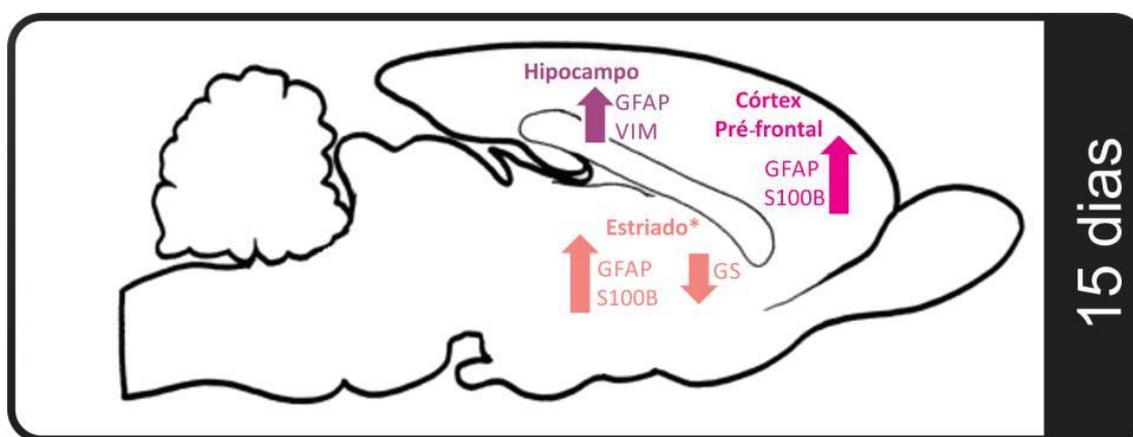


Figura 10. Resumo das alterações causadas pela exposição *in utero* ao VPA descritas no capítulo 3.

Somente o painel referente ao grupo P15 está sendo mostrado pois não foram encontradas diferenças nos animais P4. As setas indicam as alterações encontradas no grupo VPA quando comparado ao grupo controle. Setas para cima indicam aumento e setas para baixo indicam diminuição. *A atividade da glutamina sintetase (GS) e a quantidade de GSH não foram avaliadas no estriado dos animais de 4 dias.

A vimentina é o principal componente dos filamentos intermediários de astrócitos imaturos e durante a maturação dessas células existe uma substituição dessa proteína por GFAP. Apesar da expressão da vimentina reduzir a nível zero em alguns astrócitos com o passar do desenvolvimento, uma população dessas células co-expressa GFAP e vimentina no animal adulto [187]. Um exemplo são os astrócitos do hipocampo, justamente a única estrutura que mostrou aumento no número de astrócitos imunoreativos para vimentina.

Ainda, corroborando nossos resultados, a maior expressão de GFAP foi vista em outro modelo de autismo através da infecção pré-natal de camundongos com vírus influenza, onde foi encontrada suprarregulação do gene da GFAP no encéfalo dos animais no período pós-natal [188, 189]. Além disso, a densidade de células positivas para GFAP no hipocampo de camundongos de 14 dias, o que corresponde ao hipocampo de um rato com um pouco mais de 15 dias, também está aumentada no grupo infectado prenatalmente com o vírus quando comparada ao grupo controle. Da mesma forma, os animais cujas mães foram infectadas apresentaram contagem e densidade de células GFAP-positivas corticais maiores quando comparados aos animais controle [188].

A S100B é uma proteína ligadora de cálcio que é expressa em quantidades diferentes em tipos celulares específicos como, por exemplo, os astrócitos. A regulação da expressão do gene da S100B é complexa e permite expressão proteica controlada em tipos celulares específicos ou num mesmo tipo celular variando com o estado funcional ou o contexto [190]. Sabe-se que, em níveis micromolares, a S100B pode estimular a expressão de citocinas pró-inflamatórias e induzir a apoptose [191, 192]. Desta forma, esta proteína pode constituir um agravante no quadro inflamatório presente no estriado e nos córtices pré-frontal, onde seus níveis estão aumentados.

Diferentes moléculas, incluindo citocinas, podem também aumentar ou diminuir a expressão e/ou a secreção de S100B. Dentre as citocinas que agem sobre ela, o

TNF- α é um fator que causa aumento na sua secreção e, visto que existem níveis maiores desta citocina no córtex de pacientes com autismo [183] (Figura 12), isso pode ser uma das razões para a maior quantidade de S100B encontrada no CPF dos animais de 15 dias (Figura 10). Existem evidências de que a S100B seja liberada pelos astrócitos através da ativação do receptor metabotrópico de glutamato 3 (mGluR3) [193] e um trabalho que estudou a expressão desse receptor no encéfalo de rato mostrou que tanto o córtex quanto o estriado expressam esse receptor [194]. Sabe-se também que a S100B causa ativação da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em astrócitos [195] e se o aumento no conteúdo dessa proteína ocorrer no estriado e no córtex frontal de humanos conforme visto em nosso modelo, esse evento pode levar à ativação da iNOS que, por sua vez, causa acréscimo nos níveis de 3-NT documentados na literatura [196].

Além do aumento no conteúdo de S100B, encontramos redução na atividade da GS no estriado dos animais com 15 dias de idade (Figura 10). É interessante mencionar que, em relação a outras áreas encefálicas como CPF, córtex cingulado e cerebelo, o estriado tem recebido menos atenção daqueles que pesquisam o autismo. No entanto, os comportamentos repetitivos e interesses restritos são um dos requisitos clínicos para o diagnóstico de autismo e sabe-se que esse tipo de sintoma envolve o funcionamento de tratos córtico-estriatais e a circuitaria dos núcleos da base, da qual o estriado faz parte [197]. A maioria dos estudos clínicos que focou nessas estruturas buscou mudanças volumétricas ou de conectividade decorrentes do autismo e alguns resultados mostram que alterações funcionais e estruturais possuem correlação com a severidade de alguns sintomas, reforçando a necessidade de mais pesquisas com esse enfoque [198]. Em relação às alterações encontradas no estriado, alguns grupos sugerem que esses padrões não se tratem de simples diferenças no volume e na conectividade, mas sim, que essas mudanças reflitam um desenvolvimento anormal do estriado e estruturas associadas [137, 199, 200]. A astrogliose pode ser a causa

da menor atividade na GS vista no estriado, uma vez que foi documentada *downregulation* dessa enzima induzida por ativação astrocitária [201] e correlação inversa entre expressão de GFAP e atividade da GS [202]. A menor atividade da GS está associada ao desbalanço entre transmissão inibitória e excitatória o que deve ser relevante no estriado uma vez que esta estrutura é rica em neurônios GABAérgicos.

As células gliais são determinantes na formação, estabilização e eliminação de sinapses tanto no sistema nervoso central quanto no periférico [203]. Estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciam que os astrócitos exercem controle sobre a sinaptogênese e são necessários para a estabilidade e manutenção sináptica, processos que ocorrem durante o desenvolvimento de estruturas neurais [204-206]. Além disso, neurônios em co-cultura com astrócitos reativos apresentam número menor de contatos sinápticos quando comparados com aqueles co-cultivados com astrócitos menos reativos, reforçando o papel da GFAP na formação de sinapses [207]. Desta forma, as trajetórias alteradas de desenvolvimento do estriado e CPF bem como os defeitos sinápticos já relacionados com o autismo [208-210] podem ser consequências do processo de astrogliose ali estabelecido uma vez que anormalidades na função astrocítica podem afetar a trajetória dos circuitos neurais e a sinaptogênese.

4. RESUMO DOS RESULTADOS GERAIS

Tabela 3. Tabela indicando o efeito encontrado no grupo VPA em relação ao grupo controle, nas idades de 4, 15 e 120 dias pós-natal (P4, P15 e P120).

	P4				P15				P120
	Hc	Cb	CPF	Es	Hc	Cb	CPF	Es	Hc
Captação-glu	ND	ND	ND	ND	=	ND	ND	ND	↑
GS	=	=	=	ND	↑	↓	=	↓	↓
GSH	=	=	=	ND	=	↑	=	=	↑
EAAT1	ND	ND	ND	ND	=	ND	ND	ND	=
EAAT2	ND	ND	ND	ND	↓	ND	ND	ND	↑
GFAP	=	↑	=	=	↑	↑	↑	↑	ND
Astrócitos GFAP+	=	=	ND	ND	↑	↑	ND	ND	ND
Astrócitos vimentina+	=	=	ND	ND	↑	=	ND	ND	ND
S100B	=	=	=	=	=	=	↑	↑	ND

Hc, hipocampo; Cb, cerebelo; CPF, Córtex pré-frontal; Es, Estriado; glu, glutamato; GS, glutamina sintetase; GSH, glutaciona. =, não altera; ↑, aumenta; ↓, diminui; ND, não determinado.

5 DISCUSSÃO GERAL

O modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao VPA tem sido utilizado por diferentes grupos de pesquisa a fim de compreender os mecanismos subjacentes às manifestações clínicas do autismo bem como na tentativa de elucidar a causa desse transtorno. Sabe-se que o modelo em questão apresenta bons valores de face e de construto [150] servindo, portanto, como uma importante ferramenta para a busca de novas estratégias terapêuticas e/ou marcadores diagnósticos para o autismo.

Apesar do modelo de autismo induzido por VPA ter sido estabelecido há mais de 7 anos e diferentes parâmetros terem sido pesquisados ao longo desse tempo, a presente tese é o primeiro trabalho que avalia parâmetros gliais nesse modelo (Vide Tabela 1 e 2). Embora deva haver cautela na comparação entre dados obtidos com modelos animais e com humanos, é importante fazer um estudo translacional, unindo as duas áreas, para que se possa avançar com hipóteses, busca por estratégias farmacológicas, alvos etiológicos e de marcadores clínicos. Dessa forma, a discussão do presente trabalho relaciona as evidências oriundas tanto da pesquisa básica quanto da pesquisa clínica.

A escolha por animais de 4 e 15 dias de idade nos permite obter dados em períodos do desenvolvimento correspondentes ao sistema nervoso no período pré-natal humano. Utilizamos como base um trabalho descrito eletronicamente, que faz uma comparação entre espécies de mamíferos, dentre elas humanos e ratos, em relação a diferentes eventos do neurodesenvolvimento (<http://translatingtime.org/public/translate>) [211, 212]. Segundo este trabalho, os resultados referentes ao CPF dos nossos animais de 4 e 15 dias de idade representam os eventos corticais em um feto humano com 4,5 e 6,7 meses, respectivamente. Já os dados em relação ao hipocampo de ratos com 4 e 15 dias de

idade correspondem a estruturas límbicas em um feto de 3 e 5 meses. Além disso, o cerebelo e o estriado dos ratos de 4 dias são comparáveis às estruturas de um feto humano com 3,7 meses enquanto que as mesmas áreas encefálicas de animais de 15 dias representam aquelas de um feto de 5,5 meses. Nenhum outro trabalho utilizando a administração intraperitoneal de VPA fez uso de ratos com 4 dias de idade, o que nos permite observar esses animais em um ponto mais próximo ao provável início das alterações presentes no autismo.

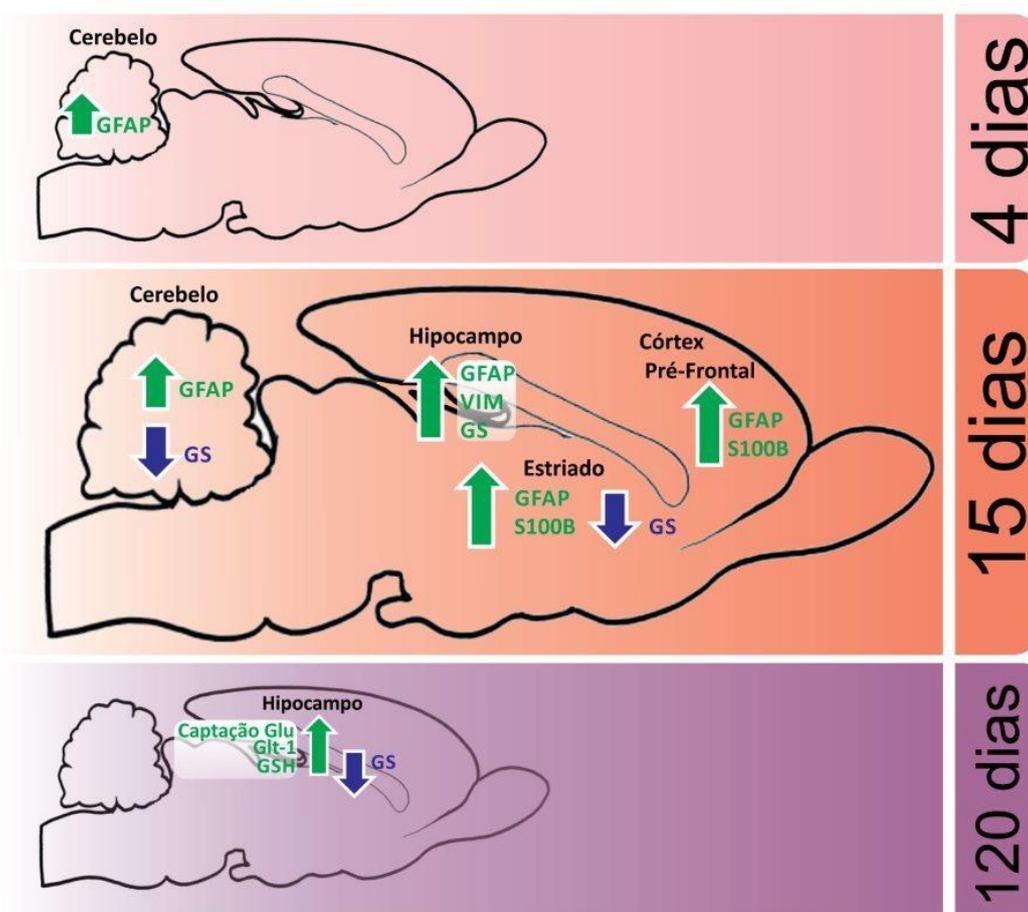


Figura 11. Resumo das alterações que observamos no encéfalo de ratos de 4 e 15 dias que foram expostos ao VPA no 12º dia gestacional.

As setas em azul indicam os parâmetros nos quais houve diminuição no grupo VPA quando comparado ao grupo controle. As setas verdes indicam os parâmetros que estavam aumentados no grupo VPA em comparação ao grupo controle. *A atividade da GS e a quantidade de GSH não foram avaliadas no estriado dos animais de 4 dias.

5.1 As alterações encefálicas observadas no modelo de autismo mudam de acordo com a idade

Nossos resultados mostram que o encéfalo exposto prenatalmente ao VPA apresenta alterações precoces uma vez que detectamos aumento da expressão de GFAP nos animais com apenas 4 dias de idade. Isso nos indica que podem existir anormalidades encefálicas já no segundo trimestre da gestação humana.

Além disso, o aumento na expressão da GFAP nos animais de 4 dias que foram expostos ao VPA foi visto somente no cerebelo, o que nos leva a crer que esta estrutura seja particularmente sensível às mudanças neuropatológicas que ocorrem no autismo (Figura 11). A ideia de que o cerebelo possa ser mais vulnerável é reforçada pelos resultados de uma pesquisa de alterações neurogliais no encéfalo *post mortem* de pacientes com autismo onde foi demonstrado que o cerebelo apresentou as mudanças mais proeminentes [177]. Ainda, ao encontro da ideia de vulnerabilidade cerebelar, existem evidências de que as Células de Purkinje sejam particularmente sensíveis a danos por serem elementos celulares que recebem estímulos constantemente e que possuem alta demanda metabólica. Segundo a literatura, este cenário somado ao fato dessas células possuírem grandes estoques e grande entrada de cálcio as coloca em situação de risco [213].

É interessante mencionar que, tanto em ratos quanto em humanos, o pico de neurogênese das Células de Purkinje e de núcleos profundos do cerebelo ocorre antes dos picos de neurogênese do caudado-putâmem, das regiões CA1 e CA2 do hipocampo e da maioria das camadas corticais [211]. Dessa forma, o curso normal do desenvolvimento neural e aspectos particulares das células de Purkinje tornam o cerebelo um forte candidato a ser um dos primeiros alvos a sofrer alterações na fisiopatologia do autismo.

5.2 O encéfalo de animais com 15 dias de idade apresenta astrogliose reativa e esta pode ter papel central no contexto fisiopatológico do autismo

Interessantemente, os ratos de 15 dias de idade que foram expostos ao VPA apresentaram aumento da expressão de GFAP em todas as estruturas encefálicas estudadas: CPF, estriado, hipocampo e cerebelo (Figura 11). Reforçando nossos resultados, o aumento na expressão de GFAP já foi documentado em outros modelos animais de autismo baseados na infecção pré-natal de roedores. Além da suprarregulação do gene da GFAP no período pós-natal [188, 189], a densidade de células positivas para GFAP no hipocampo e no córtex dos animais infectados é maior quando comparada aos animais controle [188]. O fato da exposição pré-natal ao VPA produzir aumento nas quantidades de GFAP nas 4 estruturas-alvo desta tese reforça o valor de construto do modelo que estamos utilizando, uma vez que os dois trabalhos que avaliaram diretamente a expressão de GFAP no encéfalo de pacientes com autismo documentaram aumento desta proteína no córtex frontal, parietal e cerebelar dos mesmos [176, 177] (Figura 12).

Qual é, no entanto, o significado desse aumento “generalizado” de GFAP? Sabe-se que o aumento de GFAP é característico de um processo denominado astrogliose reativa [214]. De acordo com a literatura, a definição de astrogliose reativa deve integrar os quatro aspectos-chave a seguir: (1) trata-se de um espectro de alterações nos astrócitos que ocorre em resposta a todas as formas e severidades de dano e doença do SNC, incluindo perturbações súbitas; (2) as alterações pelas quais os astrócitos reativos passam variam de acordo com a natureza e com a severidade do dano ao longo de um gradiente de alterações progressivas na expressão molecular, hipertrofia celular progressiva e, em casos severos, proliferação e formação de cicatriz glial; (3) as mudanças que ocorrem com a astrogliose são reguladas de uma maneira contexto-específica através de eventos sinalizadores que têm o potencial de modificar tanto a natureza quanto a magnitude dessas alterações; (4) as mudanças

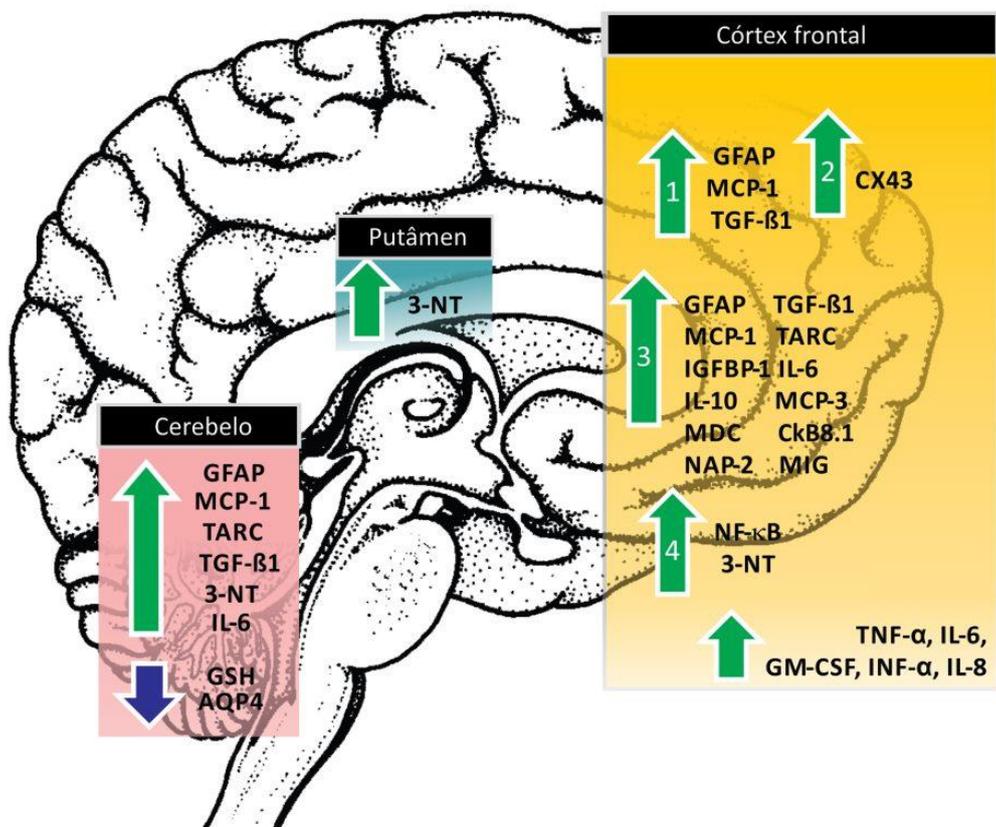


Figura 12. Algumas alterações gliais encontradas no encéfalo de pacientes com autismo.

A figura apresenta alguns dos achados documentados na literatura em relação a parâmetros gliais em pacientes com autismo. As setas em azul indicam os parâmetros nos quais houve diminuição no grupo VPA quando comparado ao grupo controle. As setas verdes indicam os parâmetros que estavam aumentados no grupo VPA em comparação ao grupo controle. Setas numeradas indicam regiões corticais específicas: 1, córtex frontal médio; 2, córtex frontal superior; 3 giro cingulado anterior; 4, cortex órbito-frontal. As fontes de cada dado estão citadas no corpo do texto. Siglas: 3-NT, 3-nitrotirosina; AQP4, aquaporina 4; CX43, conexina 43; Ck88-1/CCL23, quimiocina ligante 23; GFAP, proteína glial fibrilar ácida; GM-CSF, fator estimulador de colônias de granulócito e macrófagos; IGFBP-1, proteína ligadora de fator de crescimento semelhante à insulina; IL, interleucina; INF- α , interferon α ; MCP ou CCL-2, proteína quimioatratadora de monócitos; MDC/CCL22, quimiocina ligante 22; MIG/CXCL9, quimiocina 9 ligante da família CXC ; NAP-2, peptídeo atrator de neutrófilos-2; NF- κ B, fator nuclear kappa B; TARC/CCL17, quimiocina ligante 17; TGF- β 1, fator de crescimento tumora- β 1; TNF- α , fator de necrose tumoral α .

que ocorrem durante a astrogliose reativa têm potencial de alterar a atividade astrocítica tanto através do ganho quanto da perda de função, podendo promover uma resposta benéfica ou prejudicial sobre as células neurais ou não neurais vizinhas [215]. Com base no exposto acima, acreditamos que o processo de astrogliose reativa pode estar relacionado com o desenvolvimento do autismo e que este papel seja desempenhado conforme o raciocínio a seguir.

Dentre as características clínicas do autismo sabe-se que existe aumento da circunferência craniana entre 1 e 2 meses e entre 6 e 14 meses [216]. Além disso, aproximadamente 30-50% das crianças com autismo passam por uma regressão com perda de habilidades, incluindo a linguagem, entre 16 e 25 meses de idade [217]. O aumento da circunferência craniana parece acontecer, portanto, antes do período onde foram documentados os casos de regressão no desenvolvimento. Extrapolando nossos resultados – indicativos de eventos que ocorrem no período pré-natal – podemos sugerir que crianças com autismo apresentem níveis aumentados de GFAP já ao nascer. Esse aumento pode ser devido à astrogliose reativa que se iniciou *in utero* com a finalidade de conter uma proliferação neuronal excessiva que começou durante o período gestacional. Apoiando a existência dessa proliferação neural exagerada temos o relato de aumento no conjunto de progenitores neurais combinado à macrocefalia, ambos encontrados em ratos expostos pré-natalmente ao VPA [83]. Além disso, sabe-se que a existência de um número anormalmente grande de neurônios pode levar à astrogliose reativa através de, por exemplo, ativação de receptores purinérgicos astrocitários [218] ou pela maior liberação de glutamato ou noradrenalina [215]. Um estímulo como esses que leve à ativação dos astrócitos daria início às alterações moleculares da astrogliose reativa com objetivo de restaurar o neuroambiente normal. No entanto, o processo de astrogliose que se iniciou pode não ser suficiente para conter o aumento anormal no número de neurônios uma vez que a

proliferação destes continua até o período pós-natal, o que seria a origem do crescimento encefálico caracterizando a macrocefalia.

Na sua forma leve ou moderada, a astrogliose reativa exibe potencial de resolução se o mecanismo gerador for terminado, onde as células retornam à aparência similar àquela de um tecido saudável [215]. Como o estímulo inicial não foi retirado – a proliferação neuronal que não cessa -, a severidade da astrogliose aumenta e os astrócitos ativados liberam diversos fatores que modulam as respostas inflamatórias como citocinas, quimiocinas e metaloproteinases que exacerbam as reações imunológicas no SNC [181, 219]. Assim, a astrogliose passa a assumir um papel lesivo e desencadeia um processo de neurodegeneração que, por sua vez, seria responsável pela regressão no desenvolvimento [220, 221] e também pela estabilização da circunferência encefálica [95] nas crianças com autismo (Figura 13).

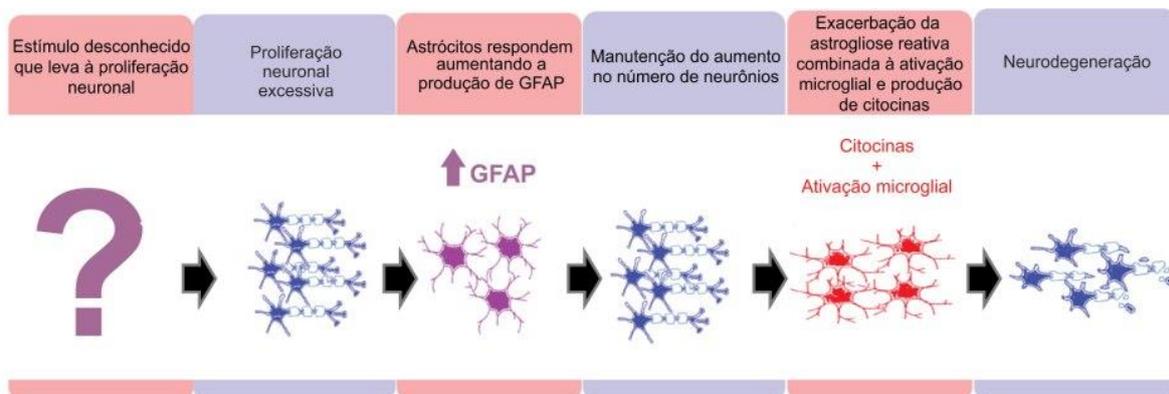


Figura 13. Papel da astrogliose reativa na sucessão de eventos propostos como processo neuropatológico no autismo.

Conforme descrito no corpo da discussão, propõe-se que a proliferação neuronal excessiva, iniciada por um mecanismo ainda desconhecido, seja o estímulo inicial para a ativação dos astrócitos que se manifesta através do aumento da GFAP. A astrogliose reativa não é suficiente para conter o aumento no número de neurônios que só cessa na infância devido à exacerbação da astrogliose que, através da neuroinflamação, ativação microglial e estresse oxidativo, leva à neurodegeneração que seria a causa da regressão vista em alguns indivíduos.

Outros dados da literatura reforçam esse pensamento, pois estudos mostram que o padrão mais anormal de supercrescimento ocorre em áreas do lobo frontal, cerebelo e estruturas límbicas [91, 216], que são áreas onde foi visto aumento de GFAP em nosso estudo.

Apoiando este raciocínio, vale citar um trecho da revisão intitulada “Imunidade, neuroglia e neuroinflamação no autismo” que diz: “A disfunção neuronal e as anormalidades na organização cortical que são vistas no autismo podem também ser responsáveis pelas respostas patofisiológicas que podem levar à ativação neuroglial, reações que podem, por sua vez, aumentar a disfunção neuronal” [222].

5.3 O encéfalo do indivíduo com autismo apresenta alterações região-específicas

Apesar de termos encontrado um aumento generalizado na GFAP, os outros parâmetros avaliados não mostraram um padrão de alteração homogêneo. Um dos estudos sobre marcadores gliais em indivíduos com autismo apresentou situação semelhante uma vez que analisando os córtices parietal, frontal superior e cerebelar de pacientes os autores encontraram expressão reduzida de aquaporina 4 somente no cerebelo e aumento na expressão de conexina 43 somente no córtex frontal superior [178] (Figura 12). Além disso, diferentes autores avaliaram mais de uma estrutura encefálica e encontraram aumento ou diminuição no volume ou no número de neurônios em apenas algumas áreas [223-225]. Esse tipo de resultado dificulta o avanço da pesquisa por um marcador diagnóstico e, portanto, a melhor compreensão sobre a base biológica dessa diversidade é requerida.

De acordo com a literatura, evidências apontam para heterogeneidade de astrócitos que derivam de diferentes áreas do SNC de maneira que a morfologia e a função dessas células varia de estrutura para estrutura [226]. Além disso, diferentes subclasses de astrócitos podem coexistir em uma mesma região encefálica. Nos

remetendo à segunda parte desta discussão, onde são descritas características-chave da astrogliose, encontramos o trecho que diz que “as mudanças que ocorrem com a astrogliose são reguladas de uma maneira *contexto-específica* através de eventos sinalizadores que têm o potencial de modificar *tanto a natureza quanto a magnitude* dessas alterações”. Isso nos faz concluir que, sendo os astrócitos parte desse *contexto* e a heterogeneidade fazendo parte do mesmo, a astrogliose reativa vai se dar de maneira diferente em estruturas encefálicas distintas gerando, assim, padrões específicos de alterações regionais.

Somados à diversidade dos astrócitos, padrões regionais distintos na expressão de receptores de citocinas também podem contribuir para as diferenças uma vez que essas moléculas influenciam o desenvolvimento do encéfalo [227]. Ainda, mudanças na integridade da barreira hemato-encefálica combinados com a presença ou não de mastócitos associados a ela são fatores que podem interferir na permeabilidade da barreira [228, 229]. Os mastócitos não estão distribuídos igualmente em todas as áreas encefálicas e, por responderem a algumas citocinas e exercerem influência sobre o trânsito de elementos entre sangue e encéfalo, estas células podem ser um determinante adicional dos padrões diferentes de achados nos modelos e na clínica do autismo.

5.4 Os astrócitos têm papel significativo nas alterações neuropatológicas e clínicas do autismo

Apesar da presente discussão ter como foco os astrócitos, não podemos esquecer que estas células não trabalham de maneira isolada. Existem evidências da participação da microglia no processo de gliose bem como de diferentes citocinas que permitem a comunicação entre os elementos envolvidos na resposta inflamatória que se estabelece no encéfalo do autista. A ação dos astrócitos consiste, portanto, em

uma das etapas de um processo complexo que conta com a participação de diversas células e mediadores químicos.

Em um dos trabalhos onde foi visto aumento da GFAP no encéfalo de pacientes com autismo, os autores também documentaram a presença de níveis anormais de diferentes citocinas. Um dos exemplos é a proteína CCL-2/MCP-1, que estava aumentada no cerebelo e no giro cingulado anterior dos pacientes [177]. Esta é uma citocina pró-inflamatória produzida por astrócitos ativos que facilita a infiltração de monócitos e macrófagos no SNC, o que resultou em resposta imune cerebelar, consistindo em uma das estratégias pelas quais os astrócitos causam dano neuronal. Além da CCL-2/MCP-1, níveis aumentados de TGF- β 1 foram encontrados no cerebelo, giro frontal médio e giro cingulado anterior no encéfalo de indivíduos com autismo [177]. O TGF- β 1 é uma citocina anti-inflamatória produzida principalmente por astrócitos reativos e neurônios, tendo papel complexo no SNC que varia de acordo com momento e com o contexto. O aumento nessa citocina, por exemplo, pode ter efeito protetor em resposta a um estado patológico mas também pode contribuir para a patologia da doença em si [230]. De acordo com a literatura, uma explicação possível é que a elevação do TGF- β 1 reflita uma tentativa de modular a neuroinflamação ou remodelar e reparar o tecido lesionado [177].

A IL-6 é outra citocina produzida pelos astrócitos que encontra-se aumentada no cerebelo [231], córtex frontal [183] e giro cingulado anterior [177] de pacientes com autismo. Tanto o aumento quanto a diminuição da IL-6 podem levar a disfunção neurológica. A superexpressão dessa citocina em camundongos causa tremor, ataxia e convulsões, além de alterações cognitivas. Interessantemente, mudanças nos níveis da IL-6 estão associadas ao comportamento social e à agressão, apoiando o papel desta molécula no autismo [230]. Foi documentado, também, aumento no IFN- γ no córtex frontal de pacientes com autismo, que é uma citocina que impacta sobre a morfologia dendrítica e formação de sinapses, levando a alterações na conectividade e

celular a longo prazo [183]. No entanto, o IFN- γ apresenta um padrão dual de funcionamento podendo, por exemplo, promover ou inibir o crescimento de dendritos dependendo das condições de cultura. É difícil, portanto, determinar se esta citocina tem um papel patogênico no autismo ou se representa uma resposta imune potencialmente benéfica [230].

Além das citocinas, existem evidências de aumento na expressão de NF-kB tanto em neurônios quanto astrócitos, mas principalmente na microglia ativada em amostras de córtex orbito-frontal de pacientes com autismo [232]. O NF-kB atua na regulação da resposta imune através da indução da expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias e, por sua vez, sendo induzido por elas estabelecendo uma alça de retroalimentação positiva. Desta forma, quando este se torna anormalmente ativo, ele tem o potencial de produzir inflamação crônica ou excessiva.

O estresse oxidativo é caracterizado pela aumento na quantidade de espécies reativas de oxigênio, seja por superprodução dessas ou pela menor capacidade de detoxificação. Níveis aumentados de moléculas quimicamente reativas contendo oxigênio ou nitrogênio aumentam o risco de danos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, um mecanismo frequentemente envolvido na neurodegeneração [233]. O estresse oxidativo e a inflamação são processos que seguidamente interagem uma vez que compartilham vias de sinalização e um pode levar à exacerbação do outro. A ativação da microglia, a qual frequentemente acompanha a ativação astrocitária e também foi documentada no autismo, produz um excesso de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, consistindo numa das interfaces entre inflamação e estresse oxidativo.

A pesquisa de um marcador de dano oxidativo a proteínas, a 3-nitrotirosina (3-NT), mostrou que existe aumento dessa molécula em regiões específicas - córtex órbito-frontal, cerebelo e putâmem - do encéfalo de pacientes com autismo [196]. Os autores comentam que essa sensibilidade região-específica pode ser determinada

pela presença de populações neuronais específicas como neurônios dopaminérgicos e colinérgicos, que são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo [196].

Para subsidiar ainda mais o potencial dos astrócitos na geração dos danos no autismo, é interessante mencionar aqui a forma neonatal da Doença de Alexander, uma gliopatia de origem genética caracterizada pelo acúmulo de GFAP que tem como manifestação clínica convulsões generalizadas frequentes e intratáveis [234]. Ou seja, uma alteração astrocítica como fenômeno neuropatológico primário de um quadro clínico debilitante.

Além da Doença de Alexander, as convulsões frequentes são a manifestação clássica da epilepsia, uma das comorbidades mais comuns no autismo [235]. Alguns experimentos com modelos animais apontam para um papel primordial dos astrócitos na geração de convulsões e focos encefálicos associados com a geração de convulsões são populados por números maiores de astrócitos como, por exemplo, o hipocampo [173]. Em camundongos epilépticos o hipocampo é importante para a geração de convulsões comportamentais. No entanto, nesse modelo não há lesão ou perda neuronal, mas sim uma maior expressão de astrócitos próximo à idade quando as convulsões aparecem [236].

Além de convulsões, pacientes com autismo podem apresentar outros sintomas tidos como resultado de “estados hiperexcitáveis” do encéfalo como agressão, ansiedade e hiperatividade. A presença desses sintomas somados a dados da literatura levantaram a hipótese de que um aumento na razão entre excitação e inibição durante um período crítico podem determinar um desenvolvimento disfuncional levando aos sintomas do autismo [237, 238]. Dado o papel dos astrócitos na manutenção dos níveis de glutamato e GABA, estas células são indispensáveis ao equilíbrio entre transmissão excitatória e inibitória.

De acordo com os resultados obtidos em P120, a transmissão glutamatérgica encontra-se alterada nesses animais uma vez que a captação de glutamato está

aumentada, assim como a expressão de GLT-1. Interessantemente, no hipocampo do grupo VPA, a atividade da GS está aumentada em P15 e diminuída em P120. Já no cerebelo e no estriado P15, a atividade da GS está aumentada, o que pode sugerir que as alterações ocorrem em velocidade diferente entre as estruturas uma vez que a redução na GS hipocampal parece ocorrer mais tardiamente. Não houve alteração da GS no CPF em P15 e, apesar de não haverem estudos clínicos que avaliem essa enzima no CPF em humanos, pode haver uma relação com ausência de alteração na GS numa região encefálica próxima (CCA) já documentada na literatura [239].

Estudos *post mortem* sugerem que disfunções no sistema glutamatérgico cerebelar podem estar envolvidos na patofisiologia do autismo [240]. Nossos dados mostram que a atividade da GS está diminuída no cerebelo P15, o que pode ser um indício de desajuste na razão excitação-inibição nessa estrutura.

Não podemos afirmar que a neurotransmissão mediada pelo glutamato também esteja alterada nos animais jovens, no entanto, as alterações encontradas na GS já fornecem evidências de um ciclo glutamina-glutamato-GABA disfuncional. Segundo a literatura, qualquer tipo de bloqueio farmacológico no ciclo glutamato-glutamina tanto no hipocampo quanto no hipotálamo, vai levar à falha de sinapses GABAérgicas dentro de minutos [241, 242]. Além disso, a diminuição da atividade da GS consequente da gliose causa déficit significativo na função sináptica inibitória mas não excitatória, ou seja, essa pode ser outra maneira pela qual os astrócitos contribuem para o quadro patológico e clínico do autismo.

5.5 Um novo paradigma

Na busca por um marcador diagnóstico para o autismo, muitos trabalhos utilizam tecnologias de imagem na tentativa de detectar algum padrão patológico específico do distúrbio. Alguns grupos fazem uso da tecnologia de Imagem de Tensor

de Difusão (ITD) que avalia parâmetros como a anisotropia fracional (AF) que é uma medida que reflete diferenças na densidade axonal, tamanho, mielinização e coerência na organização das fibras [243]. A maioria do grupos relata redução da AF em pacientes com autismo quando comparados aos indivíduos controle como resultado da desmielinização, degeneração ou desorganização estrutural [243]. No entanto, se deve mencionar que além do fato de alterações significativas na AF entre autistas e controles não serem sempre observadas, a maioria dos estudos foi realizada em crianças mais velhas ou adolescentes [4, 223]. Quando os dados são coletados em pacientes mais novos com autismo (por exemplo, 3 anos), um cenário diferente emerge. Dois grupos mostraram que as alterações na AF podem ser dinâmicas, exibindo aumentos iniciais relativos aos controles que podem diminuir com o passar da idade [244, 245]. Uma vez que o desenvolvimento típico da substância branca é caracterizado por aumento na AF [246] esses resultados agregam evidências de crescimento encefálico acelerado no autismo durante o período pós natal.

No entanto, em um belo trabalho realizado por Budde e colaboradores utilizando ITD após lesão traumática cortical no encéfalo de ratos, foi demonstrado que a reatividade astrocitária, principalmente o aumento na GFAP, está associada com aumento na AF e difusão axial. Os autores viram que tratos com origem na cápsula externa e no corpo caloso se propagaram em direção à área da lesão no córtex lesionado [247]. Essa constatação traz à tona algumas questões: 1) Se o encéfalo adulto com autismo apresenta uma situação de gliose crônica e essa gliose aumenta a AF da substância branca, não é possível que as alterações no encéfalo autista estejam sendo subdetectadas? 2) O aumento na AF no encéfalo de crianças com autismo que normalmente é tido como reflexo do maior crescimento encefálico não pode também ser consequência do aumento de GFAP? 3) Extrapolando nossos resultados sugerimos que o indivíduo com autismo tenha níveis aumentados de GFAP já ao nascimento. Se a ITD identifica áreas de gliose através de aumento da AF, esta

ferramenta não poderia, então, fornecer indícios do aumento de GFAP no encéfalo de bebês?

6 CONCLUSÕES

Os dados apresentados nesta tese incluem o período gestacional humano (P4 e P15 do rato) e o pós-natal (P120 do rato), correspondente ao adulto humano e mostram, portanto, que as alterações neuropatológicas que levam ao autismo podem estar presentes já no feto. Nossos resultados consistem em informações relevantes ao estudo do autismo uma vez que a maioria das pesquisas básicas utiliza animais adultos e estudos clínicos apresentam dados de humanos em idade infantil, escolar, adolescente ou adulta. Tal fato torna difícil que nossos dados sejam extrapolados, mas reforçam a relevância da presente tese.

O encéfalo dos animais expostos ao VPA apresenta um quadro de astrogliose reativa. Sugere-se que esse processo tenha papel significativo na fisiopatologia do autismo uma vez que este parece ser uma das primeiras alterações a serem identificadas. Além disso, existem alterações regionais específicas que parecem ser consequência da heterogeneidade nas populações de astrócitos em diferentes estruturas encefálicas. Nossos resultados reforçam, portanto, a conclusão de que um processo inflamatório em andamento está presente em várias áreas do encéfalo, porém em diferentes níveis de expressão.

Os dados indicam, também, efeito da exposição ao VPA *in utero* sobre a transmissão glutamatérgica uma vez que a atividade da GS foi afetada em três regiões encefálicas dos animais P15 e no hipocampo de animais P120. Apesar desse efeito, não houve impacto sobre as concentrações de GSH nos animais P15, quadro esse que pode ser revertido com o passar da idade conforme visto pelo aumento nesse peptídeo em animais mais velhos.

O estudo mostra que os resultados variam de acordo com a idade tornando necessária uma melhor compreensão sobre o curso das células gliais ao longo do desenvolvimento bem como o papel das citocinas em diferentes fases da maturação

do sistema nervoso. A astrogliose parece ser um ponto inicial na neuropatologia do autismo e pode, portanto, servir como alvo de estratégias terapêuticas ou diagnósticas conforme discutido anteriormente. De qualquer maneira, são necessários mais estudos para melhor caracterizar o papel dos astrócitos e de outras células gliais no estabelecimento do autismo.

7 PERSPECTIVAS

- Quantificar S100B, GSH e atividade da GS em amostras de estriado de animais P4
- Avaliar GSH, GS, GFAP, S100B em amostras de cerebelo, estriado e CPF de animais P120
- Repetir as análises em animais de idades intermediárias entre 15 e 120 dias para verificar quando ocorrem as primeiras alterações, bem como, qual é a sequência de eventos neuropatológicos
- Avaliar níveis encefálicos de citocinas e integridade da barreira hematoencefálica
- Avaliar o comportamento dos animais jovens expostos ao VPA e pesquisar correlação com os achados
- Avaliar ativação e número de células microgliais através de imunofluorescência
- Analisar a morfologia e o número de espinhos dendríticos nas estruturas estudadas
- Realizar contagem e avaliar densidade de células vimentina⁺ e GFAP⁺ no CPF e estriado

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Manning-Courtney, P., et al., *Autism spectrum disorders*. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care, 2013. **43**(1): p. 2-11.
2. Abrahams, B.S. and D.H. Geschwind, *Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(5): p. 341-55.
3. Grigorenko, E.L., *Pathogenesis of autism: a patchwork of genetic causes*. Future Neurol, 2009. **4**(5): p. 591-599.
4. Ameis, S.H. and P. Szatmari, *Imaging-genetics in autism spectrum disorder: advances, translational impact, and future directions*. Front Psychiatry, 2012. **3**: p. 46.
5. Duketis, E. and R. Waltes, *Genetics of autistic disorders: review and clinical implications*. European Child and Adolescent Psychiatry, 2010. **19**: p. 169-78.
6. Ronald, A. and R.A. Hoekstra, *Autism spectrum disorders and autistic traits: a decade of new twin studies*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2011. **156B**(3): p. 255-74.
7. Arndt, T.L., C.J. Stodgell, and P.M. Rodier, *The teratology of autism*. Int J Dev Neurosci, 2005. **23**(2-3): p. 189-99.
8. Dufour-Rainfray, D., et al., *Fetal exposure to teratogens: evidence of genes involved in autism*. Neurosci Biobehav Rev, 2011. **35**(5): p. 1254-65.
9. Kanner, L., *Autistic disturbances of affective contact*. Nerv. Child, 1943. **2**: p. 217-250.
10. Honda, H., *How can epidemiological studies contribute to understanding autism spectrum disorders?* Brain Dev, 2013. **35**(2): p. 102-5.
11. AutismSpeaks. *What is autism?* 2012 [cited 2012 02/05/13].
12. Kim, Y.S., et al., *Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample*. Am J Psychiatry, 2011. **168**(9): p. 904-12.
13. Zahorodny, W., et al., *Increasing autism prevalence in metropolitan New Jersey*. Autism, 2012.
14. Duchan, E. and D.R. Patel, *Epidemiology of autism spectrum disorders*. Pediatr Clin North Am, 2012. **59**(1): p. 27-43, ix-x.
15. Fombonne, E., *Epidemiology of pervasive developmental disorders*. Pediatr Res, 2009. **65**(6): p. 591-8.
16. Goldman, S., et al., *Motor stereotypies in children with autism and other developmental disorders*. Dev Med Child Neurol, 2009. **51**(1): p. 30-8.
17. Mefford, H.C., M.L. Batshaw, and E.P. Hoffman, *Genomics, intellectual disability, and autism*. N Engl J Med, 2012. **366**(8): p. 733-43.
18. Bauman, M.L., *Medical comorbidities in autism: challenges to diagnosis and treatment*. Neurotherapeutics, 2010. **7**(3): p. 320-7.
19. Nazeer, A. and M. Ghaziuddin, *Autism spectrum disorders: clinical features and diagnosis*. Pediatr Clin North Am, 2012. **59**(1): p. 19-25, ix.
20. Kaplan, G. and J.T. McCracken, *Psychopharmacology of autism spectrum disorders*. Pediatr Clin North Am, 2012. **59**(1): p. 175-87, xii.
21. Silver, W.G. and I. Rapin, *Neurobiological basis of autism*. Pediatr Clin North Am, 2012. **59**(1): p. 45-61, x.
22. Grandin, T., *Visual abilities and sensory differences in a person with autism*. Biol Psychiatry, 2009. **65**(1): p. 15-6.
23. Ben-Sasson, A., L. Hen, and R. Fluss, *A meta-analysis of sensory modulation symptoms in individuals with autism spectrum disorders*. J Autism Dev Disord, 2009. **39**(1): p. 1-11.

24. Kern, J.K., et al., *Sensory correlations in autism*. Autism, 2007. **11**(2): p. 123-124.
25. Hughes, J.R., *Update on autism: a review of 1300 reports published in 2008*. Epilepsy Behav, 2009. **16**(4): p. 569-89.
26. Klintwall, L., et al., *Sensory abnormalities in autism. A brief report*. Res Dev Disabil, 2011. **32**(2): p. 795-800.
27. Falkmer, T., et al., *Diagnostic procedures in autism spectrum disorders: a systematic literature review*. Eur Child Adolesc Psychiatry, 2013.
28. Huerta, M. and C. Lord, *Diagnostic evaluation of autism spectrum disorders*. Pediatr Clin North Am, 2012. **59**(1): p. 103-11, xi.
29. Tchaconas, A. and A. Adesman, *Autism spectrum disorders: a pediatric overview and update*. Curr Opin Pediatr, 2013. **25**(1): p. 130-44.
30. Greenberg, D.A., et al., *Excess of twins among affected sibling pairs with autism: implications for the etiology of autism*. Am J Hum Genet, 2001. **69**: p. 1062-1067.
31. Levy, D., et al., *Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders*. Neuron, 2011. **70**(5): p. 886-97.
32. Geschwind, D.H., *Genetics of autism spectrum disorders*. Trends Cogn Sci, 2011. **15**(9): p. 409-16.
33. Gilman, S.R., et al., *Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses*. Neuron, 2011. **70**(5): p. 898-907.
34. Marshall, C.R. and S.W. Scherer, *Detection and characterization of copy number variation in autism spectrum disorder*. Methods Mol Biol, 2012. **838**: p. 115-35.
35. Ivarsson, S.A., et al., *Autism as one of several disabilities in two children with congenital cytomegalovirus infection*. Neuropediatrics, 1990. **21**: p. 102-103.
36. Glasson, E.J., et al., *Perinatal factors and the development of autism: a population study*. Arch Gen Psychiatry, 2004. **61**(6): p. 618-27.
37. Patterson, P.H., *Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness*. Curr Opin Neurobiol, 2002. **12**(1): p. 115-8.
38. Moore, S.J., et al., *A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes*. J Med Genet, 2000. **37**(7): p. 489-97.
39. Williams, G., et al., *Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association*. Dev Med Child Neurol, 2001. **43**(3): p. 202-6.
40. Stromland, K., et al., *Autism in thalidomide embryopathy: a population study*. Dev Med Child Neurol, 1994. **36**(4): p. 351-6.
41. Gardener, H., D. Spiegelman, and S. Buka, *Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis*. Br J Psychiatry, 2009. **195**: p. 7-14.
42. Baron-Cohen, S., *The extreme male brain theory of autism*. Trends Cogn Sci, 2002. **6**(6): p. 248-254.
43. Schmitz, C. and P. Rezaie, *The neuropathology of autism: where do we stand?* Neuropathol Appl Neurobiol, 2008. **34**(1): p. 4-11.
44. Peca, J., et al., *Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction*. Nature, 2011. **472**(7344): p. 437-42.
45. Umeda, T., et al., *Evaluation of Pax6 mutant rat as a model for autism*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15500.
46. Narita, M., et al., *Nonexploratory movement and behavioral alterations in a thalidomide or valproic acid-induced autism model rat*. Neurosci Res, 2010. **66**(1): p. 2-6.
47. Rodier, P.M., et al., *Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism*. Reprod Toxicol, 1997. **11**(2-3): p. 417-22.

48. Schneider, T. and R. Przewlocki, *Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism*. *Neuropsychopharmacology*, 2005. **30**(1): p. 80-9.
49. Chateauvieux, S., et al., *Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid*. *J Biomed Biotechnol*, 2010. **2010**.
50. Ximenes, J.C., et al., *Valproic acid: an anticonvulsant drug with potent antinociceptive and anti-inflammatory properties*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2013.
51. Dalens, B., E.J. Raynaud, and J. Gaulme, *Teratogenicity of valproic acid*. *J Pediatr*, 1980. **97**(2): p. 332-3.
52. DiLiberti, J.H., et al., *The fetal valproate syndrome*. *Am J Med Genet*, 1984. **19**(3): p. 473-81.
53. Christianson, A.L., N. Chesler, and J.G. Kromberg, *Fetal valproate syndrome: clinical and neuro-developmental features in two sibling pairs*. *Dev Med Child Neurol*, 1994. **36**(4): p. 361-9.
54. Malm, H., et al., *Valproate embryopathy in three sets of siblings: further proof of hereditary susceptibility*. *Neurology*, 2002. **59**(4): p. 630-3.
55. Kozma, C., *Valproic acid embryopathy: report of two siblings with further expansion of the phenotypic abnormalities and a review of the literature*. *Am J Med Genet*, 2001. **98**(2): p. 168-75.
56. Rasalam, A.D., et al., *Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder*. *Dev Med Child Neurol*, 2005. **47**(8): p. 551-5.
57. Williams, P.G. and J.H. Hersh, *A male with fetal valproate syndrome and autism*. *Dev Med Child Neurol*, 1997. **39**(9): p. 632-4.
58. Bromley, R.L., et al., *Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs*. *Neurology*, 2008. **71**(23): p. 1923-4.
59. Rodier, P.M., et al., *Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei*. *J Comp Neurol*, 1996. **370**(2): p. 247-61.
60. Schneider, T., et al., *Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid*. *Psychoneuroendocrinology*, 2008. **33**(6): p. 728-40.
61. Sui, L. and M. Chen, *Prenatal exposure to valproic acid enhances synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex and fear memories*. *Brain Res Bull*, 2012. **87**(6): p. 556-63.
62. Altman, J. and S.A. Bayer, *Development of the cranial nerve ganglia and related nuclei in the rat*. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 1982. **74**: p. 1-90.
63. Wang, Z., et al., *Demethylation of specific Wnt/beta-catenin pathway genes and its upregulation in rat brain induced by prenatal valproate exposure*. *Anat Rec (Hoboken)*, 2010. **293**(11): p. 1947-53.
64. Banerjee, A., et al., *Impairment of cortical GABAergic synaptic transmission in an environmental rat model of autism*. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2012: p. 1-10.
65. Schneider, T., et al., *Prenatal exposure to valproic acid disturbs the enkephalinergic system functioning, basal hedonic tone, and emotional responses in an animal model of autism*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2007. **193**(4): p. 547-55.
66. Ingram, J.L., et al., *Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism*. *Neurotoxicol Teratol*, 2000. **22**(3): p. 319-24.
67. Sandhya, T., J. Sowjanya, and B. Veeresh, *Bacopa monniera (L.) Wettst ameliorates behavioral alterations and oxidative markers in sodium valproate induced autism in rats*. *Neurochem Res*, 2012. **37**(5): p. 1121-31.
68. Silvestrin, R., et al., *Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Altered glutamate metabolism in the hippocampus*. *Brain Research*, 2013: p. 52-60.

69. Dufour-Rainfray, D., et al., *Behavior and serotonergic disorders in rats exposed prenatally to valproate: a model for autism*. *Neurosci Lett*, 2010. **470**(1): p. 55-9.
70. Dendrinou, G., M. Hemelt, and A. Keller, *Prenatal VPA Exposure and Changes in Sensory Processing by the Superior Colliculus*. *Front Integr Neurosci*, 2011. **5**: p. 68.
71. Lin, H.C., et al., *The amygdala excitatory/inhibitory balance in a valproate-induced rat autism model*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e55248.
72. Snow, W.M., K. Hartle, and T.L. Ivanko, *Altered morphology of motor cortex neurons in the VPA rat model of autism*. *Dev Psychobiol*, 2008. **50**(7): p. 633-9.
73. Kim, P., et al., *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*, 2013. **51**: p. 288-96.
74. Rinaldi, T., C. Perrodin, and H. Markram, *Hyper-connectivity and hyper-plasticity in the medial prefrontal cortex in the valproic Acid animal model of autism*. *Front Neural Circuits*, 2008. **2**: p. 4.
75. Rinaldi, T., et al., *Elevated NMDA receptor levels and enhanced postsynaptic long-term potentiation induced by prenatal exposure to valproic acid*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(33): p. 13501-6.
76. Mychasiuk, R., et al., *Effects of rat prenatal exposure to valproic acid on behaviour and neuro-anatomy*. *Dev Neurosci*, 2012. **34**(2-3): p. 268-76.
77. Tashiro, Y., et al., *Morphological abnormalities of embryonic cranial nerves after in utero exposure to valproic acid: implications for the pathogenesis of autism with multiple developmental anomalies*. *Int J Dev Neurosci*, 2011. **29**(4): p. 359-64.
78. Rouillet, F.I., et al., *Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid*. *Neuroscience*, 2010. **170**(2): p. 514-22.
79. Kolozsi, E., et al., *Prenatal exposure to valproic acid leads to reduced expression of synaptic adhesion molecule neuroligin 3 in mice*. *Neuroscience*, 2009. **163**(4): p. 1201-10.
80. Kuwagata, M., et al., *Observation of fetal brain in a rat valproate-induced autism model: a developmental neurotoxicity study*. *Int J Dev Neurosci*, 2009. **27**(4): p. 399-405.
81. Oyabu, A., et al., *Morphology of the facial motor nuclei in a rat model of autism during early development*. *Int J Dev Neurosci*, 2013. **31**(2): p. 138-44.
82. Miyazaki, K., N. Narita, and M. Narita, *Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: implication for pathogenesis of autism*. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2005. **23**(2-3): p. 287-97.
83. Go, H.S., et al., *Prenatal exposure to valproic acid increases the neural progenitor cell pool and induces macrocephaly in rat brain via a mechanism involving the GSK-3b/b-catenin pathway*. *Neuropharmacology*, 2012. **63**.
84. Bambini-Junior, V., et al., *Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters*. *Brain Res*, 2011. **1408**: p. 8-16.
85. Schneider, T., J. Turczak, and R. Przewlocki, *Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism*. *Neuropsychopharmacology*, 2006. **31**(1): p. 36-46.
86. Kim, K.C., et al., *The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague-Dawley rats*. *Toxicol Lett*, 2011. **201**(2): p. 137-42.
87. Ritvo, E.R., et al., *Lower Purkinje cell counts in the cerebella of four autistic subjects: initial findings of the UCLA-NSAC Autopsy Research Report*. *Am J Psychiatry*, 1986. **143**(7): p. 862-6.

88. Bauman, M. and T.L. Kemper, *Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism*. *Neurology*, 1985. **35**(6): p. 866-74.
89. Bauman, M.L. and T.L. Kemper, *Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions*. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2005. **23**(2-3): p. 183-7.
90. Courchesne, E. and K. Pierce, *Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: local over-connectivity but long-distance disconnection*. *Curr Opin Neurobiol*, 2005. **15**(2): p. 225-30.
91. Courchesne, E. and K. Pierce, *Brain overgrowth in autism during a critical time in development: implications for frontal pyramidal neuron and interneuron development and connectivity*. *Int J Dev Neurosci*, 2005. **23**(2-3): p. 153-70.
92. Casanova, M.F., *White matter volume increase and minicolumns in autism*. *Ann Neurol*, 2004. **56**(3): p. 453; author reply 454.
93. Kosaki, Y. and S. Watanabe, *Dissociable roles of the medial prefrontal cortex, the anterior cingulate cortex, and the hippocampus in behavioural flexibility revealed by serial reversal of three-choice discrimination in rats*. *Behav Brain Res*, 2012. **227**(1): p. 81-90.
94. Lalonde, R., *The neurobiological basis of spontaneous alternation*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2002. **26**(1): p. 91-104.
95. Amaral, D.G., C.M. Schumann, and C.W. Nordahl, *Neuroanatomy of autism*. *Trends Neurosci*, 2008. **31**(3): p. 137-45.
96. Chomiak, T. and B. Hu, *Alterations of neocortical development and maturation in autism: Insight from valproic acid exposure and animal models of autism*. *Neurotoxicol Teratol*, 2012.
97. Casanova, M.F., D. Buxhoeveden, and J. Gomez, *Disruption in the inhibitory architecture of the cell minicolumn: implications for autism*. *Neuroscientist*, 2003. **9**(6): p. 496-507.
98. Oblak, A.L., et al., *Altered posterior cingulate cortical cytoarchitecture, but normal density of neurons and interneurons in the posterior cingulate cortex and fusiform gyrus in autism*. *Autism Res*, 2011. **4**(3): p. 200-11.
99. Jacot-Descombes, S., et al., *Decreased pyramidal neuron size in Brodmann areas 44 and 45 in patients with autism*. *Acta Neuropathol*, 2012. **124**(1): p. 67-79.
100. Greimel, E., et al., *Changes in grey matter development in autism spectrum disorder*. *Brain Structure & Function*, 2012. **[Epub ahead of print]**.
101. Zikopoulos, B. and H. Barbas, *Changes in prefrontal axons may disrupt the network in autism*. *J Neurosci*, 2010. **30**(44): p. 14595-609.
102. Schumann, C.M., et al., *Longitudinal magnetic resonance imaging study of cortical development through early childhood in autism*. *J Neurosci*, 2010. **30**(12): p. 4419-27.
103. Courchesne, E., et al., *Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism*. *JAMA*, 2011. **306**(18): p. 2001-10.
104. Just, M.A., et al., *Cortical activation and synchronization during sentence comprehension in high-functioning autism: evidence of underconnectivity*. *Brain*, 2004. **127**(Pt 8): p. 1811-21.
105. Koshino, H., et al., *Functional connectivity in an fMRI working memory task in high-functioning autism*. *Neuroimage*, 2005. **24**(3): p. 810-21.
106. Villalobos, M.E., et al., *Reduced functional connectivity between V1 and inferior frontal cortex associated with visomotor performance in autism*. *Neuroimage*, 2005. **25**(3): p. 916-25.
107. Castelli, F., et al., *Autism, Asperger syndrome and brain mechanisms for the attribution of mental states to animated shapes*. *Brain*, 2002. **125**(Pt 8): p. 1839-49.

108. Pierce, K., et al., *The brain response to personally familiar faces in autism: findings of fusiform activity and beyond*. Brain, 2004. **127**(Pt 12): p. 2703-16.
109. Kennedy, D.P., E. Redcay, and E. Courchesne, *Failing to deactivate: resting functional abnormalities in autism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(21): p. 8275-80.
110. Watanabe, T., et al., *Diminished medial prefrontal activity behind autistic social judgments of incongruent information*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39561.
111. Voineagu, I., et al., *Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology*. Nature, 2011. **474**(7351): p. 380-4.
112. Bailey, A., et al., *A clinicopathological study of autism*. Brain, 1998. **121** (Pt 5): p. 889-905.
113. Allman, J.M., et al., *The anterior cingulate cortex. The evolution of an interface between emotion and cognition*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **935**: p. 107-17.
114. Simms, M.L., et al., *The anterior cingulate cortex in autism: heterogeneity of qualitative and quantitative cytoarchitectonic features suggests possible subgroups*. Acta Neuropathol, 2009. **118**(5): p. 673-84.
115. Di Martino, A., et al., *Functional brain correlates of social and nonsocial processes in autism spectrum disorders: an activation likelihood estimation meta-analysis*. Biol Psychiatry, 2009. **65**(1): p. 63-74.
116. Fan, J., et al., *Functional deficits of the attentional networks in autism*. Brain Behav, 2012. **2**(5): p. 647-60.
117. Yip, J., J.J. Soghomonian, and G.J. Blatt, *Decreased GAD67 mRNA levels in cerebellar Purkinje cells in autism: pathophysiological implications*. Acta Neuropathol, 2007. **113**(5): p. 559-68.
118. Palmen, S.J., et al., *Neuropathological findings in autism*. Brain, 2004. **127**(Pt 12): p. 2572-83.
119. Fatemi, S.H., et al., *Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism*. Cerebellum, 2012. **11**(3): p. 777-807.
120. Tan, G.C., et al., *Normal variation in fronto-occipital circuitry and cerebellar structure with an autism-associated polymorphism of CNTNAP2*. Neuroimage, 2010. **53**(3): p. 1030-42.
121. Hong, S.E., et al., *Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations*. Nat Genet, 2000. **26**(1): p. 93-6.
122. Aldinger, K.A., et al., *Cerebellar and posterior fossa malformations in patients with autism-associated chromosome 22q13 terminal deletion*. Am J Med Genet A, 2013. **161**(1): p. 131-6.
123. Groen, W., et al., *Amygdala and hippocampus enlargement during adolescence in autism*. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2010. **49**(6): p. 552-60.
124. Rojas, D.C., et al., *Hippocampus and amygdala volumes in parents of children with autistic disorder*. Am J Psychiatry, 2004. **161**(11): p. 2038-44.
125. Nordahl, C.W., et al., *Increased rate of amygdala growth in children aged 2 to 4 years with autism spectrum disorders: a longitudinal study*. Arch Gen Psychiatry, 2012. **69**(1): p. 53-61.
126. Dalton, K.M., et al., *Gaze-fixation, brain activation, and amygdala volume in unaffected siblings of individuals with autism*. Biol Psychiatry, 2007. **61**(4): p. 512-20.
127. Schumann, C.M. and D.G. Amaral, *Stereological analysis of amygdala neuron number in autism*. J Neurosci, 2006. **26**(29): p. 7674-9.
128. Swartz, J.R., et al., *Amygdala habituation and prefrontal functional connectivity in youth with autism spectrum disorders*. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2013. **52**(1): p. 84-93.

129. Murphy, E.R., et al., *Atypical Functional Connectivity of the Amygdala in Childhood Autism Spectrum Disorders during Spontaneous Attention to Eye-Gaze*. *Autism Res Treat*, 2012. **2012**: p. 652408.
130. Langen, M., et al., *Caudate nucleus is enlarged in high-functioning medication-naive subjects with autism*. *Biol Psychiatry*, 2007. **62**(3): p. 262-6.
131. Qiu, A., et al., *Basal ganglia shapes predict social, communication, and motor dysfunctions in boys with autism spectrum disorder*. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2010. **49**(6): p. 539-51, 551 e1-4.
132. Stanfield, A.C., et al., *Towards a neuroanatomy of autism: a systematic review and meta-analysis of structural magnetic resonance imaging studies*. *Eur Psychiatry*, 2008. **23**(4): p. 289-99.
133. Takarae, Y., et al., *Atypical involvement of frontostriatal systems during sensorimotor control in autism*. *Psychiatry Res*, 2007. **156**(2): p. 117-27.
134. Hollander, E., et al., *Striatal volume on magnetic resonance imaging and repetitive behaviors in autism*. *Biol Psychiatry*, 2005. **58**(3): p. 226-32.
135. Dapretto, M., et al., *Understanding emotions in others: mirror neuron dysfunction in children with autism spectrum disorders*. *Nat Neurosci*, 2006. **9**(1): p. 28-30.
136. Shafritz, K.M., et al., *The neural circuitry mediating shifts in behavioral response and cognitive set in autism*. *Biol Psychiatry*, 2008. **63**(10): p. 974-80.
137. Di Martino, A., et al., *Aberrant striatal functional connectivity in children with autism*. *Biol Psychiatry*, 2011. **69**(9): p. 847-56.
138. van Kooten, I.A., et al., *Neurons in the fusiform gyrus are fewer and smaller in autism*. *Brain*, 2008. **131**(Pt 4): p. 987-99.
139. Critchley, H.D., et al., *The functional neuroanatomy of social behaviour: changes in cerebral blood flow when people with autistic disorder process facial expressions*. *Brain*, 2000. **123** (Pt 11): p. 2203-12.
140. Pierce, K., et al., *Face processing occurs outside the fusiform 'face area' in autism: evidence from functional MRI*. *Brain*, 2001. **124**(Pt 10): p. 2059-73.
141. Hadjikhani, N., et al., *Anatomical differences in the mirror neuron system and social cognition network in autism*. *Cereb Cortex*, 2006. **16**(9): p. 1276-82.
142. Verhoeven, J.S., et al., *Neuroimaging of autism*. *Neuroradiology*, 2010. **52**(1): p. 3-14.
143. Zafeiriou, D.I., A. Ververi, and E. Vargiami, *The serotonergic system: its role in pathogenesis and early developmental treatment of autism*. *Curr Neuropharmacol*, 2009. **7**(2): p. 150-7.
144. Kane, M.J., et al., *Mice genetically depleted of brain serotonin display social impairments, communication deficits and repetitive behaviors: possible relevance to autism*. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. e48975.
145. McDougle, C.J., et al., *Effects of tryptophan depletion in drug-free adults with autistic disorder*. *Arch Gen Psychiatry*, 1996. **53**(11): p. 993-1000.
146. Coon, H., et al., *Possible association between autism and variants in the brain-expressed tryptophan hydroxylase gene (TPH2)*. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2005. **135B**(1): p. 42-6.
147. Pinto, D., et al., *Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders*. *Nature*, 2010. **466**(7304): p. 368-72.
148. Yang, S.Y., et al., *Association with tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphisms and autism spectrum disorders in Korean families*. *Neurosci Res*, 2012. **73**(4): p. 333-6.
149. Lam, K.S., M.G. Aman, and L.E. Arnold, *Neurochemical correlates of autistic disorder: a review of the literature*. *Res Dev Disabil*, 2006. **27**(3): p. 254-89.
150. Belzung, C., et al., *Rodent models for autism: A critical review*. *Drug Discovery Today*, 2005. **2**(2): p. 93-101.

151. Posey, D.J., et al., *Antipsychotics in the treatment of autism*. J Clin Invest, 2008. **118**(1): p. 6-14.
152. Aldred, S., et al., *Plasma amino acid levels in children with autism and their families*. J Autism Dev Disord, 2003. **33**(1): p. 93-7.
153. Shinohe, A., et al., *Increased serum levels of glutamate in adult patients with autism*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2006. **30**(8): p. 1472-7.
154. Page, L.A., et al., *In Vivo 1H-Magnetic Resonance Spectroscopy Study of Amygdala-Hippocampal and Parietal Regions in Autism*. American Journal of Psychiatry, 2006. **163**: p. 2189-2192.
155. Bernardi, S., et al., *In vivo 1H-magnetic resonance spectroscopy study of the attentional networks in autism*. Brain Research, 2011. **22**.
156. DeVito, T.J., et al., *Evidence for cortical dysfunction in autism: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study*. Biol Psychiatry, 2007. **61**(4): p. 465-73.
157. Choudhury, P.R., S. Lahiri, and U. Rajamma, *Glutamate mediated signaling in the pathophysiology of autism spectrum disorders*. Pharmacol Biochem Behav, 2011. **100**(4): p. 841-9.
158. Purcell, A.E., et al., *Postmortem brain abnormalities of the glutamate neurotransmitter system in autism*. Neurology, 2001. **57**(9): p. 1618-28.
159. Essa, M.M., et al., *Excitotoxicity in the Pathogenesis of Autism*. Neurotox Res, 2012.
160. Coghlan, S., et al., *GABA system dysfunction in autism and related disorders: from synapse to symptoms*. Neurosci Biobehav Rev, 2012. **36**(9): p. 2044-55.
161. Durand, C.M., et al., *SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism*. Mol Psychiatry, 2012. **17**(1): p. 71-84.
162. Chugani, D.C., *Neuroimaging and neurochemistry of autism*. Pediatr Clin North Am, 2012. **59**(1): p. 63-73, x.
163. Oblak, A.L., T.T. Gibbs, and G.J. Blatt, *Decreased GABA(B) receptors in the cingulate cortex and fusiform gyrus in autism*. J Neurochem, 2010. **114**(5): p. 1414-23.
164. Chugani, D.C., et al., *Evidence of altered energy metabolism in autistic children*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 1999. **23**(4): p. 635-41.
165. Otsuka, H., et al., *Brain metabolites in the hippocampus-amygdala region and cerebellum in autism: an 1H-MR spectroscopy study*. Neuroradiology, 1999. **41**(7): p. 517-9.
166. Hisaoka, S., et al., *Regional magnetic resonance spectroscopy of the brain in autistic individuals*. Neuroradiology, 2001. **43**(6): p. 496-8.
167. Araque, A. and M. Navarrete, *Glial cells in neuronal network function*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010. **365**(1551): p. 2375-81.
168. Santello, M., C. Cali, and P. Bezzi, *Gliotransmission and the tripartite synapse*. Adv Exp Med Biol, 2012. **970**: p. 307-31.
169. Perea, G., M. Navarrete, and A. Araque, *Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information*. Trends Neurosci, 2009. **32**(8): p. 421-31.
170. Parpura, V., et al., *Glial cells in (patho)physiology*. J Neurochem, 2012. **121**(1): p. 4-27.
171. Wang, D.D. and A. Bordey, *The astrocyte odyssey*. Prog Neurobiol, 2008. **86**(4): p. 342-67.
172. Verkhratsky, A. and V. Parpura, *Recent advances in (patho)physiology of astroglia*. Acta Pharmacol Sin, 2010. **31**(9): p. 1044-54.
173. Verkhratsky, A., et al., *Neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism*. ASN Neuro, 2012. **4**(3).
174. Sofroniew, M.V. and H.V. Vinters, *Astrocytes: biology and pathology*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(1): p. 7-35.

175. Morgan, J.T., et al., *Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism*. Biol Psychiatry, 2010. **68**(4): p. 368-76.
176. Laurence, J.A. and S.H. Fatemi, *Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects*. Cerebellum, 2005. **4**(3): p. 206-10.
177. Vargas, D.L., et al., *Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism*. Ann Neurol, 2005. **57**(1): p. 67-81.
178. Fatemi, S.H., et al., *Expression of astrocytic markers aquaporin 4 and connexin 43 is altered in brains of subjects with autism*. Synapse, 2008. **62**(7): p. 501-7.
179. Tetreault, N.A., et al., *Microglia in the cerebral cortex in autism*. J Autism Dev Disord, 2012. **42**(12): p. 2569-84.
180. Morgan, J.T., et al., *Abnormal microglial-neuronal spatial organization in the dorsolateral prefrontal cortex in autism*. Brain Res, 2012. **1456**: p. 72-81.
181. Bauer, J., H. Rauschka, and H. Lassmann, *Inflammation in the nervous system: the human perspective*. Glia, 2001. **36**(2): p. 235-43.
182. Chez, M.G., et al., *Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children*. Pediatr Neurol, 2007. **36**(6): p. 361-5.
183. Li, X., et al., *Elevated immune response in the brain of autistic patients*. J Neuroimmunol, 2009. **207**(1-2): p. 111-6.
184. dos Santos, A.Q., et al., *Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells*. Arch Biochem Biophys, 2006. **453**(2): p. 161-7.
185. Browne, R.W. and D. Armstrong, *Reduced glutathione and glutathione disulfide*. Methods Mol Biol, 1998. **108**: p. 347-52.
186. Middeldorp, J. and E.M. Hol, *GFAP in health and disease*. Prog Neurobiol, 2011. **93**(3): p. 421-43.
187. Lazarides, E., *Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins*. Annu Rev Biochem, 1982. **51**: p. 219-50.
188. Fatemi, S.H., et al., *Human influenza viral infection in utero alters glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the developing brains of neonatal mice*. Mol Psychiatry, 2002. **7**(6): p. 633-40.
189. Fatemi, S.H., et al., *Glial fibrillary acidic protein and glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are increased in brains of neonatal BALB/c mice following viral infection in utero*. Schizophr Res, 2004. **69**(1): p. 121-3.
190. Donato, R., et al., *S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(6): p. 1008-22.
191. Van Eldik, L.J. and M.S. Wainwright, *The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain*. Restor Neurol Neurosci, 2003. **21**(3-4): p. 97-108.
192. Donato, R., *S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(7): p. 637-68.
193. Sakatani, S., et al., *Neural-activity-dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations in vivo*. J Neurosci, 2008. **28**(43): p. 10928-36.
194. Mudo, G., et al., *Cellular localization of mGluR3 and mGluR5 mRNAs in normal and injured rat brain*. Brain Res, 2007. **1149**: p. 1-13.
195. Hu, J., et al., *S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes*. J Biol Chem, 1996. **271**(5): p. 2543-7.

196. Sajdel-Sulkowska, E.M., et al., *Brain region-specific changes in oxidative stress and neurotrophin levels in autism spectrum disorders (ASD)*. *Cerebellum*, 2010. **10**(1): p. 43-8.
197. Langen, M., et al., *The neurobiology of repetitive behavior: of mice*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2011. **35**(3): p. 345-55.
198. Langen, M., et al., *The neurobiology of repetitive behavior: ...and men*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2011. **35**(3): p. 356-65.
199. Estes, A., et al., *Basal ganglia morphometry and repetitive behavior in young children with autism spectrum disorder*. *Autism Res*, 2011. **4**(3): p. 212-20.
200. Langen, M., et al., *Changes in the developmental trajectories of striatum in autism*. *Biol Psychiatry*, 2009. **66**(4): p. 327-33.
201. Ortinski, P.I., et al., *Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(5): p. 584-91.
202. Weir, M.D. and D.G. Thomas, *Effect of dexamethasone on glutamine synthetase and glial fibrillary acidic protein in normal and transformed astrocytes*. *Clin Neuropharmacol*, 1984. **7**(4): p. 303-6.
203. Diniz, L.P., et al., *Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor beta signaling through modulation of D-serine levels in cerebral cortex neurons*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(49): p. 41432-45.
204. Ullian, E.M., K.S. Christopherson, and B.A. Barres, *Role for glia in synaptogenesis*. *Glia*, 2004. **47**(3): p. 209-16.
205. Anton, E.S., J.A. Kreidberg, and P. Rakic, *Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex*. *Neuron*, 1999. **22**(2): p. 277-89.
206. Kucukdereli, H., et al., *Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(32): p. E440-9.
207. Emirandetti, A., et al., *Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy*. *Brain Res*, 2006. **1095**(1): p. 35-42.
208. Garcia-Penas, J.J., J. Dominguez-Carral, and E. Pereira-Bezanilla, *[Abnormalities of synaptogenesis in autism. Pathogenic and therapeutic implications]*. *Rev Neurol*, 2012. **54 Suppl 1**: p. S41-50.
209. Bourgeron, T., *A synaptic trek to autism*. *Curr Opin Neurobiol*, 2009. **19**(2): p. 231-4.
210. Spooren, W., et al., *Synapse dysfunction in autism: a molecular medicine approach to drug discovery in neurodevelopmental disorders*. *Trends in Pharmacological Science*, 2012. **33**(12): p. 669-84.
211. Clancy, B., R.B. Darlington, and B.L. Finlay, *Translating developmental time across mammalian species*. *Neuroscience*, 2001. **105**(1): p. 7-17.
212. Nagarajan, R., et al., *ttime: an R package for translating the timing of brain development across mammalian species*. *Neuroinformatics*, 2010. **8**(3): p. 201-5.
213. Kern, J.K., *Purkinje cell vulnerability and autism: a possible etiological connection*. *Brain & Development*, 2003. **25**: p. 377-382.
214. Pekny, M. and M. Nilsson, *Astrocyte activation and reactive gliosis*. *Glia*, 2005. **50**(4): p. 427-34.
215. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astroglia and glial scar formation*. *Trends in Neuroscience*, 2009. **32**(12): p. 638-647.
216. Courchesne, E., E. Redcay, and D.P. Kennedy, *The autistic brain: birth through adulthood*. *Curr Opin Neurol*, 2004. **17**(4): p. 489-96.
217. Lord, C., C. Shulman, and P. DiLavore, *Regression and word loss in autistic spectrum disorders*. *J Child Psychol Psychiatry*, 2004. **45**(5): p. 936-55.

218. Franke, H., et al., *P2 receptor-types involved in astrogliosis in vivo*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(6): p. 1180-9.
219. Rosenberg, G.A., *Matrix metalloproteinases in neuroinflammation*. Glia, 2002. **39**(3): p. 279-91.
220. Wiggins, L.D., C.E. Rice, and J. Baio, *Developmental regression in children with an autism spectrum disorder identified by a population-based surveillance system*. Autism, 2009. **13**(4): p. 357-374.
221. Rogers, S., *Developmental regression in autism spectrum disorders*. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2004. **10**(2): p. 139-143.
222. Pardo, C.A., D.L. Vargas, and A.W. Zimmerman, *Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism*. Int Rev Psychiatry, 2005. **17**(6): p. 485-95.
223. Anagnostou, E. and M.J. Taylor, *Review of neuroimaging in autism spectrum disorders: what have we learned and where we go from here*. Mol Autism, 2011. **2**(1): p. 4.
224. Herbert, M.R., et al., *Dissociations of cerebral cortex, subcortical and cerebral white matter volumes in autistic boys*. Brain, 2003. **126**(Pt 5): p. 1182-92.
225. Brun, C.C., et al., *Mapping brain abnormalities in boys with autism*. Hum Brain Mapp, 2009. **30**(12): p. 3887-900.
226. Oberheim, N.A., S.A. Goldman, and M. Nedergaard, *Heterogeneity of astrocytic form and function*. Methods Mol Biol, 2012. **814**: p. 23-45.
227. Garay, P.A. and A.K. McAllister, *Novel roles for immune molecules in neural development: implications for neurodevelopmental disorders*. Front Synaptic Neurosci, 2010. **2**: p. 136.
228. Theoharides, T.C. and B. Zhang, *Neuro-inflammation, blood-brain barrier, seizures and autism*. J Neuroinflammation, 2011. **8**: p. 168.
229. Theoharides, T.C. and D.E. Cochrane, *Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress*. J Neuroimmunol, 2004. **146**(1-2): p. 1-12.
230. Goines, P.E. and P. Ashwood, *Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): Possible role of the environment*. Neurotoxicol Teratol, 2012.
231. Wei, H., et al., *Brain IL-6 elevation causes neuronal circuitry imbalances and mediates autism-like behaviors*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(6): p. 831-42.
232. Young, A.M., et al., *Aberrant NF-kappaB expression in autism spectrum condition: a mechanism for neuroinflammation*. Front Psychiatry, 2011. **2**: p. 27.
233. Gandhi, S. and A.Y. Abramov, *Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration*. Oxid Med Cell Longev, 2012. **2012**: p. 428010.
234. Singh, N., et al., *Alexander's disease: reassessment of a neonatal form*. Childs Nerv Syst, 2012. **28**(12): p. 2029-31.
235. Tuchman, R. and M. Cuccaro, *Epilepsy and autism: neurodevelopmental perspective*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2011. **11**(4): p. 428-34.
236. Drage, M.G., G.L. Holmes, and T.N. Seyfried, *Hippocampal neurons and glia in epileptic EL mice*. J Neurocytol, 2002. **31**(8-9): p. 681-92.
237. Gogolla, N., et al., *Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism*. J Neurodev Disord, 2009. **1**(2): p. 172-81.
238. Rubenstein, J.L. and M.M. Merzenich, *Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems*. Genes Brain Behav, 2003. **2**(5): p. 255-67.
239. Shimmura, C., et al., *Enzymes in the glutamate-glutamine cycle in the anterior cingulate cortex in postmortem brain of subjects with autism*. Mol Autism, 2013. **4**(1): p. 6.
240. Fatemi, S.H., et al., *Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices*. Biol Psychiatry, 2002. **52**(8): p. 805-10.

241. Yang, S. and C.L. Cox, *Attenuation of inhibitory synaptic transmission by glial dysfunction in rat thalamus*. Synapse, 2011. **65**(12): p. 1298-308.
242. Fricke, M.N., D.M. Jones-Davis, and G.C. Mathews, *Glutamine uptake by System A transporters maintains neurotransmitter GABA synthesis and inhibitory synaptic transmission*. J Neurochem, 2007. **102**(6): p. 1895-904.
243. Keller, T.A., R.K. Kana, and M.A. Just, *A developmental study of the structural integrity of white matter in autism*. Neuroreport, 2007. **18**.
244. Wolff, J.J., et al., *Differences in white matter fiber tract development present from 6 to 24 months in infants with autism*. Am J Psychiatry, 2012. **169**(6): p. 589-600.
245. Ben Bashat, D., et al., *Accelerated maturation of white matter in young children with autism: a high b value DWI study*. Neuroimage, 2007. **37**(1): p. 40-7.
246. Gao, W., et al., *Temporal and spatial development of axonal maturation and myelination of white matter in the developing brain*. AJNR Am J Neuroradiol, 2009. **30**(2): p. 290-6.
247. Budde, M.D., et al., *The contribution of gliosis to diffusion tensor anisotropy and tractography following traumatic brain injury: validation in the rat using Fourier analysis of stained tissue sections*. Brain, 2011. **134**(Pt 8): p. 2248-60.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito da exposição pré-natal ao VPA sobre a atividade da glutamina sintetase e conteúdo de GSH no hipocampo de ratos P4	71
Figura 2. Efeito da exposição pré-natal ao VPA sobre o conteúdo de GFAP e S100B no hipocampo de ratos com 4 e 15 dias de idade.	72
Figura 3. Fotomicrografia representativa de astrócitos GFAP+ e vimentina+ na região CA1 de ratos de 4 dias nos grupos controle e VPA.....	74
Figura 4. Fotomicrografia representativa de astrócitos GFAP+ e vimentina+ na região CA1 de ratos de 15 dias nos grupos controle e VPA.	74
Figura 5. Efeito da exposição pré-natal ao VPA sobre a atividade da glutamina sintetase e conteúdo de GSH no estriado de ratos com 15 dias de idade.	75
Figura 6. Efeito da exposição pré-natal ao VPA sobre o conteúdo de GFAP no estriado de ratos com 4 e 15 dias de idade.	76
Figura 7. Efeito da exposição pré-natal ao VPA sobre o conteúdo de S100B no estriado de ratos com 15 dias de idade.	76
Figura 8. Efeito da exposição pré-natal ao VPA sobre a atividade da glutamina sintetase e conteúdo de GSH no córtex pré-frontal de ratos com 15 dias de idade.	78
Figura 9. Efeito da exposição pré-natal ao VPA sobre o conteúdo de GFAP e S100B no córtex pré-frontal de ratos com 4 e 15 dias de idade.....	79
Figura 10. Resumo das alterações causadas pela exposição in utero ao VPA descritas no capítulo 3.....	80
Figura 11. Resumo das alterações que observamos no encéfalo de ratos de 4 e 15 dias que foram expostos ao VPA no 12º dia gestacional.	86
Figura 12. Algumas alterações gliais encontradas no encéfalo de pacientes com autismo.....	89
Figura 13. Papel da astrogliose reativa na sucessão de eventos propostos como processo neuropatológico no autismo.	91